

# Morte de árvores de plátano causada por *Phytophthora cinnamomi*

Flávia Santos<sup>1</sup> , Álvaro Figueredo dos Santos<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal do Paraná, rua dos Funcionários, 1540, Cabral, 80035-050, Curitiba, PR, Brasil.

<sup>2</sup>Embrapa Florestas, Guaraituba, Estrada da Ribeira, km 111, 83411-000, Colombo, PR, Brasil. Bolsista CNPq.

Autor para correspondência: Álvaro Figueredo dos Santos (alvaro.santos@embrapa.br)

Data de chegada: 26/10/2017. Aceito para publicação em: 04/02/2019.

10.1590/0100-5405/187118

## RESUMO

Santos, F.; Santos, A.F. Morte de árvores de plátano causada por *Phytophthora cinnamomi*. *Summa Phytopathologica*, v.45, n.2, p.179-185, 2019.

Em 2016, em isolamentos provenientes de amostras de árvores de plátano (*Platanus acerifolia*) na região de Curitiba, estado do Paraná (Brasil), foram obtidos quatro isolados do oomiceto *Phytophthora*. Os isolados obtidos foram caracterizados a partir de análises morfológica e molecular visando sua identificação específica. Avaliou-se o crescimento micelial dos isolados em oito temperaturas, formação e dimensões de estruturas sexuadas e assexuadas e foi realizada a análise molecular com base na região ITS do DNA. Realizou-se, também, teste de patogenicidade em mudas de araucária, plátano e frutos de abacate. Os isolados apresentaram crescimento ótimo na faixa de 20 - 28°C e não foi verificado crescimento micelial a 8 e 36°C. As colônias dos quatro isolados apresentaram-se cotonosas com micélio

pouco denso. Os quatro isolados produziram esporângios persistentes, predominantemente elipsoides, sem papilas com média de 32,5 x 24,2 µm. Observou-se a formação de clamidósporos globosos e terminais com diâmetro médio de 38,4 µm. Todos os isolados apresentaram-se heterotáticos do tipo de compatibilidade A2, com oósporos de anterídio anfígeno medindo em média 30 µm. A análise molecular realizada demonstrou 99% de similaridade de um dos isolados de plátano com as sequências disponíveis no GenBank e Phytophthora-ID para *Phytophthora cinnamomi*. Com base nestes caracteres os isolados foram identificados como *Phytophthora cinnamomi* Rands. Este é o primeiro relato desta espécie causando morte de árvores de plátano no Brasil.

**Palavras-chave:** Taxonomia, Oomiceto, Doença, *Platanus*, ITS

## ABSTRACT

Santos, F.; Santos, A.F. Death of plane trees caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Summa Phytopathologica*, v.45, n.2, p.179-185, 2019.

In 2016, four isolates of *Phytophthora* oomycete were obtained from samples of plane trees (*Platanus acerifolia*) in the region of Curitiba, Paraná State (Brazil). The obtained isolates were characterized by morphological and molecular analyzes for specific identification. The mycelial growth of isolates at eight temperatures was evaluated, as well as the formation and the dimensions of sexual and asexual structures, while molecular analysis was performed based on the ITS region of the DNA. Pathogenicity test was also carried out for araucaria and plane seedlings and avocado fruits. The isolates presented optimum mycelial growth in the range of 20-28°C and no mycelial growth occurred at 8 and 36 °C. The colonies of the four isolates were classified as cotton-like, presenting

mycelium of low-density. The four isolates produced persistent sporangia, predominantly ellipsoid, with no papillae and a mean of 32.5 x 24.2 µm. Formation of globose and terminal chlamydo spores with an average diameter of 38.4 µm was observed. All isolates were heterothallic and of the A2 type of compatibility, presenting oospores with amphigenous antheridia and measuring on average 30 µm. Molecular analysis showed 99% similarity between one of the plane tree isolates and the sequences available for *Phytophthora cinnamomi* in Phytophthora-ID and GenBank. Based on these characters, plane tree isolates were identified as *Phytophthora cinnamomi* Rands. This is the first report of this pathogen causing the death of plane trees in Brazil.

**Keywords:** Taxonomy, Oomycete, Disease, *Platanus*, ITS

O plátano, *Platanus acerifolia* Willd., é originário do hemisfério norte e pertence à família Platanaceae que possui apenas um gênero, *Platanus*. É uma espécie florestal de utilização mundial, principalmente como árvore ornamental na arborização de ruas, parques e praças e também como quebra-vento (17). Pode também ser empregada na carpintaria, na fabricação de móveis e pisos devido à qualidade de sua madeira. É uma espécie resistente à poluição urbana e se adapta bem a solos compactados. O uso extensivo do gênero se dá principalmente na Europa, embora seja também encontrado na América do Norte, México e Índia (19). No Brasil, a espécie mais utilizada é o *Platanus acerifolia*, que tem sido utilizada preferencialmente para arborização urbana e plantios ornamentais, sendo que o seu cultivo ocorre principalmente em regiões de clima frio, como as do sul do país.

O gênero *Phytophthora* é amplamente conhecido por sua

importância histórica na fitopatologia, principalmente devido à *Phytophthora infestans*, espécie que devastou os batatais europeus em 1845 e nos anos seguintes, principalmente na Irlanda e na Inglaterra, onde a batata era o alimento básico da população (8). Como consequência do enorme impacto social e econômico provocado pela doença, cerca de quinhentos mil irlandeses morreram na época e mais de um milhão deles emigrou para outros países. Patógenos do gênero *Phytophthora* estão distribuídos em todas as áreas geográficas do mundo e dentre as plantas catalogadas como hospedeiras de uma ou mais espécies de *Phytophthora* estão as espécies florestais (21). O gênero *Phytophthora* compreende aproximadamente 100 espécies, sendo sua maioria fitopatogênica (15), com cerca de 24 espécies ocorrendo no Brasil (20). Dentre as espécies do gênero, *Phytophthora cinnamomi* Rands se destaca por ser considerado como um dos

patógenos mais devastadores, sendo capaz de infectar uma ampla gama de hospedeiros, dentre estas espécies florestais, arbustos e cultivos agrícolas, (29). A “Global Invasive Species Database” lista esta espécie como uma das 100 espécies invasoras mais destrutivas mundialmente, sendo o único oomiceto e o único patógeno de plantas presente na lista. *P. cinnamomi* tem destaque também na literatura mundial devido ao grande impacto econômico e ambiental provocado no oeste da Austrália, como o responsável pelo declínio da floresta de eucaliptos e de mais de 90 espécies de plantas naquela região (16). O patógeno já foi descrito causando doença e morte de árvores de plátano (*Platanus* sp.) na Argentina (10), Estados Unidos (6), Austrália (13) e, mais recentemente, na Itália (18).

No Brasil existem relatos de *P. cinnamomi* em vários cultivos agrícolas como cebola, abacaxi, maracujá, citros, abacate e em algumas espécies florestais como a araucária (20, 21). Recentemente, tem sido observada a morte de árvores de plátano em vários locais na região metropolitana de Curitiba, Paraná, Brasil. Nos isolamentos realizados em amostras provenientes dessas árvores, constatou-se a presença do oomiceto *Phytophthora*. O presente estudo teve por objetivo identificar o agente causal da morte de árvores de plátano por meio de análise morfofisiológica, patogênica e molecular. Trata-se de uma contribuição a já extensa lista de hospedeiros deste patógeno no Brasil e também de grande auxílio ao estudo da distribuição desta espécie mundialmente.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Isolamento

Para isolamento do patógeno foram usadas amostras de solo e raízes das árvores sintomáticas no município de Curitiba-PR e região metropolitana. As amostras foram coletadas à cerca de 20 centímetros de distância do tronco e 20 centímetros de profundidade do solo. As amostras, de cerca de 1 Kg, foram enviadas ao Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas (Colombo-PR). O solo e as raízes foram homogeneizados e uma subamostra foi colocada em um recipiente plástico devidamente desinfestado com álcool 70% e, logo após, foi utilizado o método de isca de frutos de abacate descrito por Zentmyer (30). Os fragmentos oriundos de frutos sintomáticos foram transferidos para placas de Petri (90 mm de diâmetro) com meio ágar-água 2% suplementado com antibióticos (ampicilina 80 ppm e cloranfenicol 40 ppm). As placas foram colocadas em câmara BOD à 24°C por quatro dias, no escuro. Após esse período os quatro isolados obtidos foram repicados para placas de Petri contendo meio V8-ágar (22). Depois de purificados os isolados foram incorporados à coleção de Fungos e Oomicetos Florestais da Embrapa Florestas, Colombo-PR e mantidos pelo método Castelani (9) e óleo mineral (8).

### Teste de Patogenicidade

O teste de patogenicidade foi conduzido em mudas de plátano e também em mudas de araucária (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) e em frutos de abacate (*Persea americana* Mill.). Foram utilizadas mudas de plátano e de araucária de aproximadamente seis meses, e frutos de abacate sadios. Para o teste, os isolados foram crescidos em placas de Petri contendo meio V8-ágar por cinco dias. Nas mudas de plátano e araucária os isolados foram inoculados utilizando-se o método de disco inserido no colo da planta descrito por Siviero et al. (24). As avaliações foram realizadas semanalmente durante um mês. No teste com frutos de abacate, os frutos foram lavados e desinfestados com álcool 70% e lavados com água ultrapurificada

e, posteriormente, procedeu-se o mesmo método de inoculação nos frutos. Estes foram acondicionados em caixas plásticas contendo papel filtro umedecido com água ultrapurificada e incubado no ambiente de laboratório sob luz contínua por sete dias. A avaliação consistiu na determinação do tamanho da lesão e observação de sintomas e sinais. O teste de patogenicidade foi conduzido em diferentes hospedeiros para comparação de sintomas e sinais, uma vez que araucária e abacate também são hospedeiros de *P. cinnamomi*.

### Crescimento micelial e aspecto das colônias

Foram realizados ensaios de curva de crescimento micelial nas temperaturas de 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 e 36 °C (30). Os isolados foram crescidos em meio V8-ágar por cinco dias e, posteriormente, foram repicados discos de meio com micélio de cinco mm de diâmetro para placas contendo o mesmo meio. O crescimento foi mensurado ao terceiro, quinto e sétimo dia após a instalação utilizando-se um paquímetro digital (Starrett, série 799). Foi avaliado o aspecto da colônia levando em consideração os padrões estabelecidos por Erwin e Ribeiro (8) como rosáceo, cotonoso e estrelado. Foram utilizados isolados de *P. cinnamomi* de araucária provenientes de Colombo-PR, previamente caracterizados para comparação de crescimento micelial com os isolados obtidos neste trabalho.

### Características morfológicas das estruturas sexuadas e assexuadas

Os procedimentos para a caracterização foram realizados de acordo com Zentmyer (32) e Erwin e Ribeiro (8). Foram avaliadas as estruturas assexuadas, esporângios e clamidósporos e estruturas sexuadas, gametângios e oósporos dos quatro isolados. Para a produção de esporângios, os isolados foram crescidos em meio V8-ágar por sete dias e posteriormente foram transferidos oito discos de cinco mm de diâmetro contendo micélio de cada isolado para placas de Petri contendo extrato de solo filtrado não esterilizado (8). Após 72 horas avaliou-se por meio de lâminas em microscópio óptico a formação de esporângio. Para cada isolado avaliou-se dimensões, ausência de papilas e forma das estruturas.

Para a produção de oósporos, os isolados foram pareados com dois isolados padrões de *Phytophthora frigida*, dos tipos de compatibilidade A1 e A2. Após cinco dias, procedeu-se o preparo de lâminas, raspando-se a superfície do meio de cultivo na região de contato entre os isolados e a compatibilidade dos isolados foi avaliada pela presença ou ausência de oósporos (21).

As medições das estruturas foram realizadas em microscópio ZEISS Axio Scope no aumento de 400x, sendo realizadas medições de 50 estruturas sexuadas e assexuadas para cada isolado. Foram utilizados isolados de *P. cinnamomi* de araucária e abacate previamente caracterizados para comparação de dimensão de estruturas com os isolados obtidos neste trabalho.

### Caracterização molecular

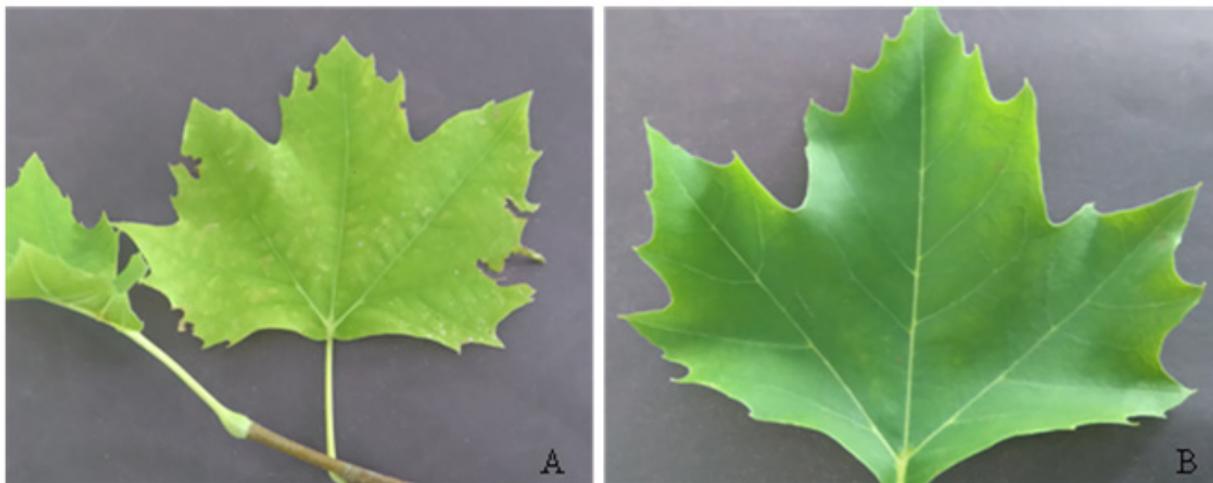
Para a identificação molecular dos isolados, o DNA foi extraído com o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Para a identificação dos isolados, foram amplificadas as regiões ITS1, ITS2 e gene 5.8S do DNA ribossômico empregando-se os pares de primers ITS6/ITS4 (28). A reação de PCR para a região ITS dos isolados foi realizada com um volume final de 15 µL sendo tampão de reação 1X, cloreto de magnésio à 1,5 mM, DNTP à 0,2 mM, primers à 0,4 mM e 0,75 U de Taq polimerase. Para a amplificação foram realizados 35 ciclos

que consistiam de 1 minuto a 94 °C para desnaturação, 1 min a 55 °C para anelamento e 1 min a 72 °C para extensão com 10 min de extensão final. Os produtos da PCR foram submetidos à análise em gel de agarose 1,5% para a visualização dos fragmentos amplificados de interesse. Após a PCR, os fragmentos foram purificados e procedeu-se o sequenciamento utilizando-se o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing, conforme recomendações do fabricante. O sequenciamento foi realizado em sequenciador ABI 3500 (Applied Biosystems), na UFPR. As seqüências obtidas foram comparadas com acessos depositados no GenBank utilizando-se o “Nucleotide BLAST” no servidor do NCBI e com seqüências depositadas na *Phytophthora*-ID, para identificação.

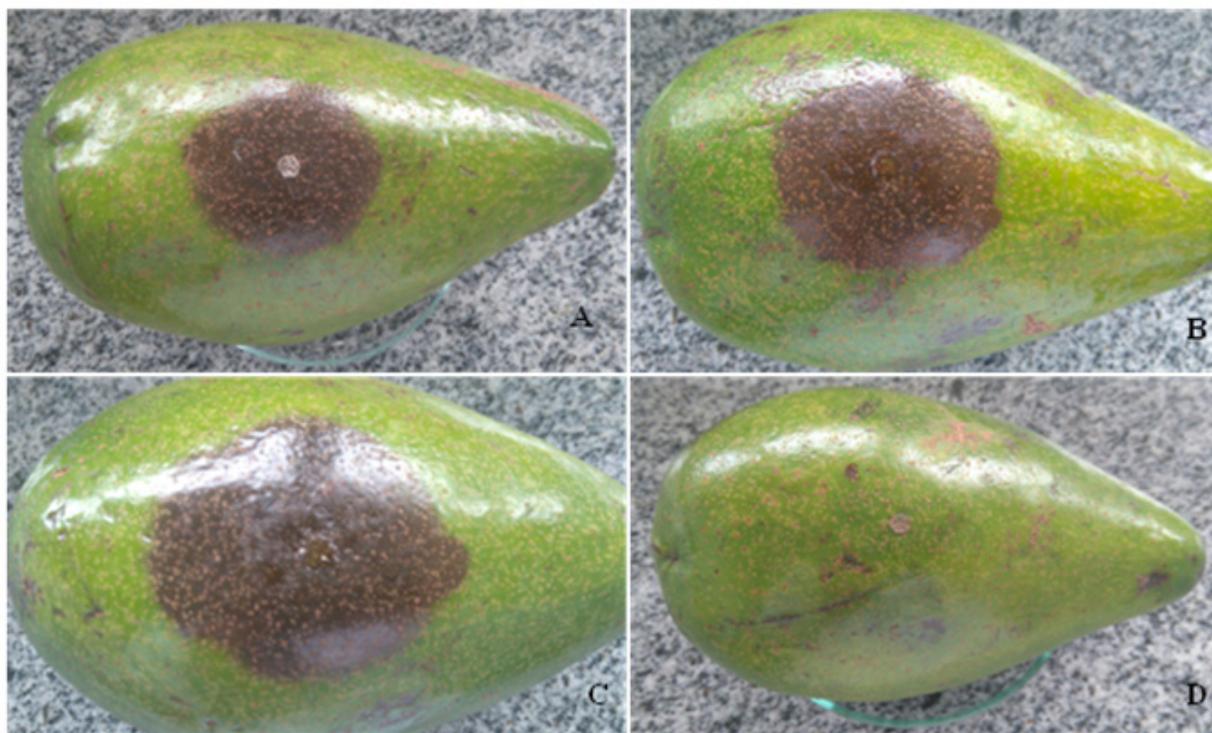
## RESULTADOS

Dos isolamentos realizados foram obtidos quatro isolados de *Phytophthora* sp. No teste de patogenicidade, em mudas de plátano, foram observados sintomas de murcha e amarelecimento após um mês da inoculação de *Phytophthora* sp. (Figura 1).

Para as mudas de araucária os isolados não foram patogênicos. Nos frutos de abacate inoculados com os isolados de *Phytophthora* sp., os sintomas já eram visíveis aos quatro dias após a inoculação, caracterizando-se pelo escurecimento da região colonizada por *Phytophthora* sp. Neste período as lesões tinham cerca de 41,8 mm de diâmetro (Figura 2). Na segunda avaliação, sete dias após a instalação,



**Figura 1.** Teste de patogenicidade com isolado de plátano de *Phytophthora cinnamomi* em mudas de plátano. Folha com sintoma de amarelecimento 30 dias após inoculação (A) e folha de planta sem inoculação (B).

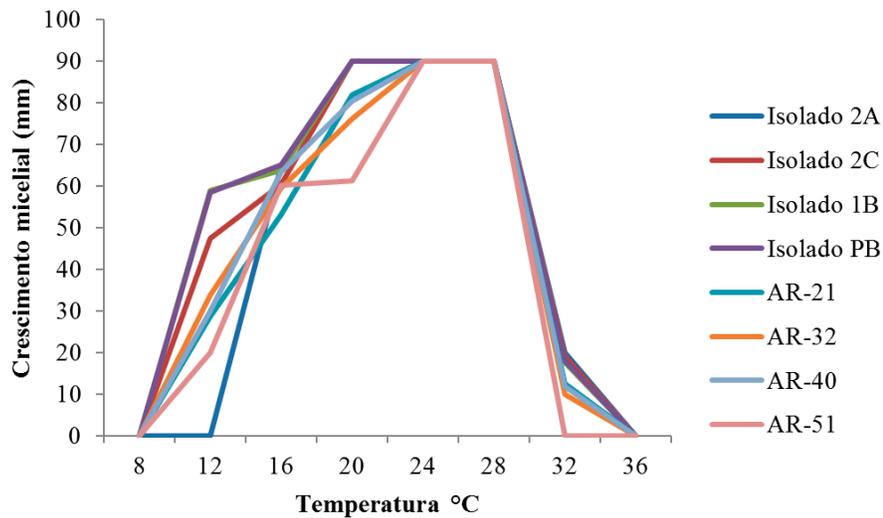


**Figura 2.** Teste de patogenicidade de isolados de *Phytophthora cinnamomi* de plátano em frutos de abacate. Lesões em frutos inoculados (A, B e C); Fruto não inoculado (D).

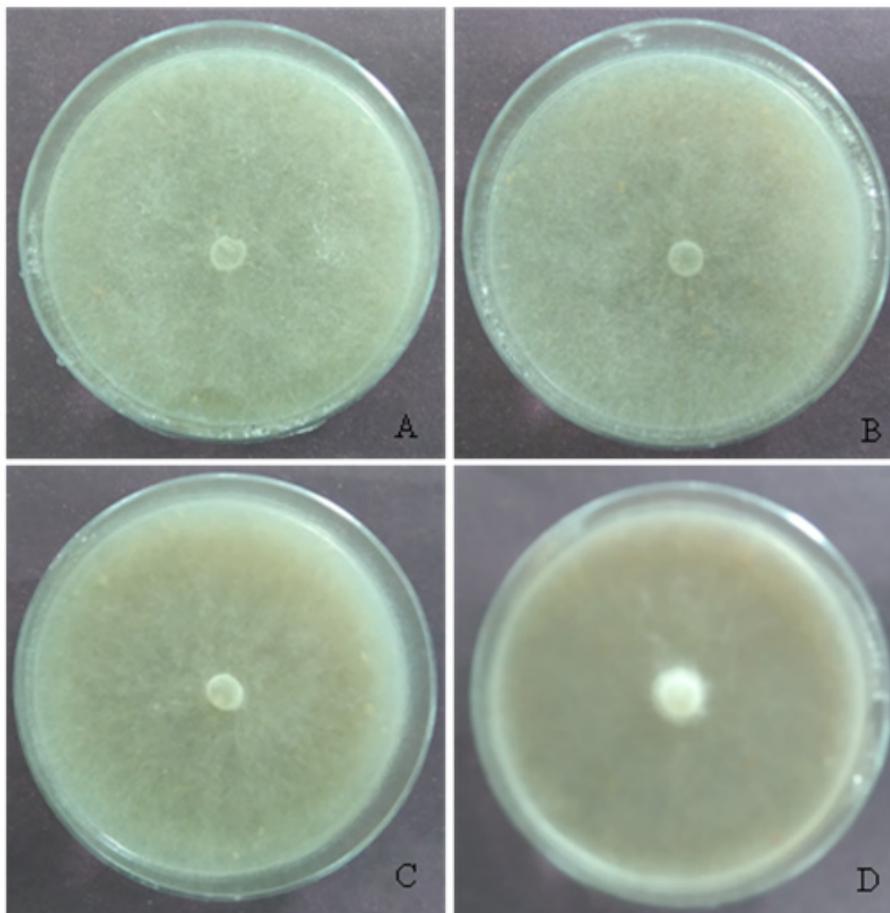
os frutos já estavam enegrecidos e totalmente colonizados pelo patógeno.

O crescimento micelial e o aspecto morfológico das culturas foram similares para os quatro isolados. Não houve crescimento micelial para nenhum dos isolados a 8 e 36 °C e para um dos

isolados a 12 °C. O maior diâmetro de crescimento micelial das colônias foi observado nas temperaturas de 20, 24 e 28 °C (Figura 3). Os quatro isolados apresentaram colônias com micélio aéreo, pouco denso e de aspecto cotonoso (Figura 4).



**Figura 3.** Curvas de crescimento micelial em 8 temperaturas de 4 isolados de *Phytophthora cinnamomi* de plátano (2A, 2C, 1B e PB) e de 4 isolados de *P. cinnamomi* de araucária (AR-21, AR-32, AR-40 e AR-51).



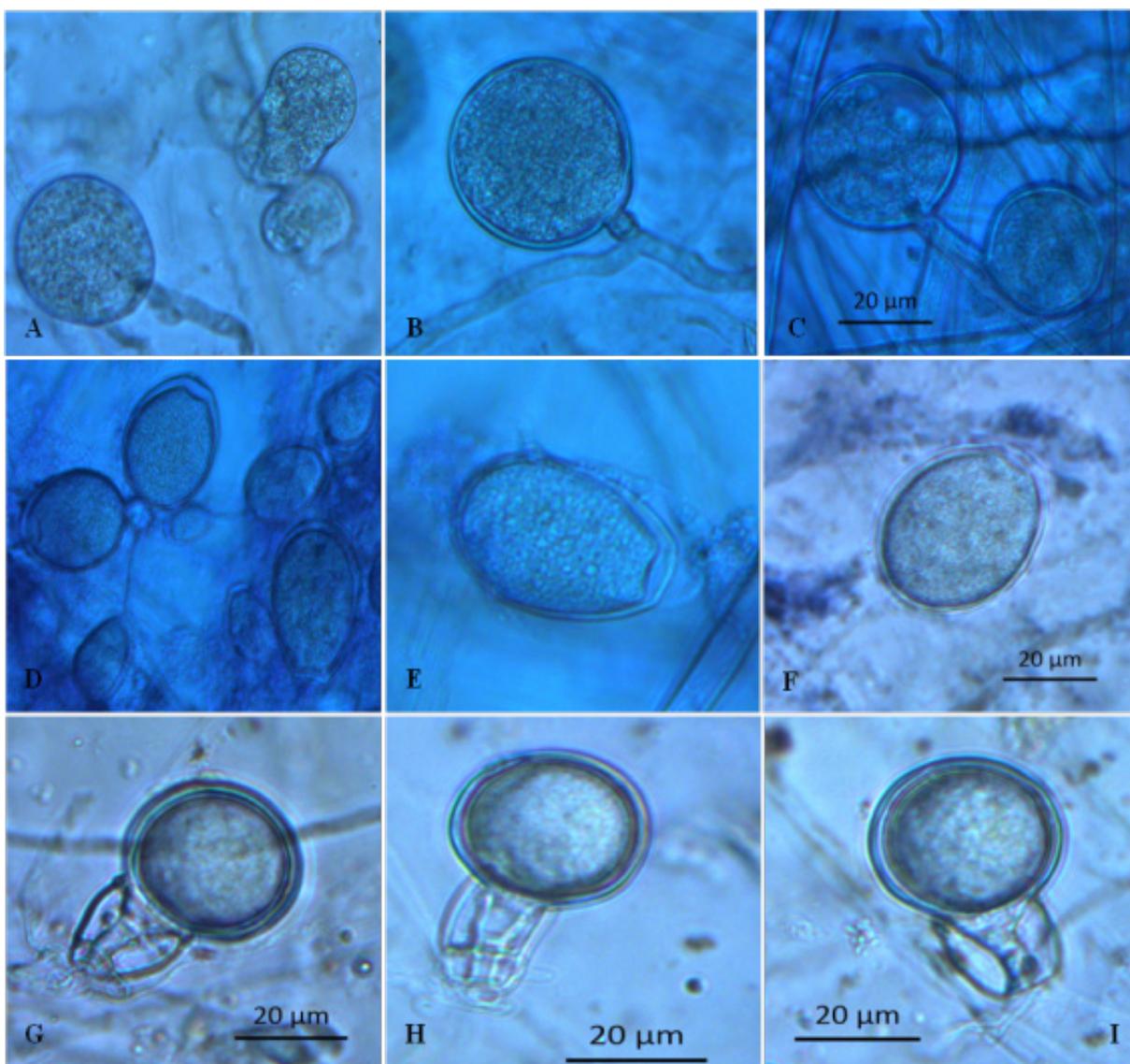
**Figura 4.** Aspecto das colônias de quatro isolados de *Phytophthora cinnamomi* de plátano: isolados 1B (A), 2C (B), 2A (C), e PB (D).

Os isolados obtidos apresentaram micélio hialino, com hifas cenocíticas do tipo coraloide, e presença de hifas com dilatações (Figura 5), que foram grandes e globosas, produzindo uma colônia compacta. Para melhor comparação e avaliação das estruturas sexuadas e assexuadas, foram utilizados isolados de *P. cinnamomi* já identificados, provenientes de isolamentos feitos de árvores de araucária. Todos os isolados avaliados apresentaram produção abundante de esporângios em extrato de solo não-autoclavado sob luz contínua, sendo estes persistentes, sem papilas, formados individualmente (Figura 5). Não houve produção de esporângios em meio de cultura sólido. Os esporângios apresentaram-se predominantemente elipsoides, embora outras formas também estivessem presentes tais como globoso e obovoide. As medidas dos esporângios estão representadas na Tabela 1, onde foram consideradas as medidas de comprimento (C) e largura (L) dos esporângios as quais variaram de 16,7 x 12 µm até 49,3 x 38,5 µm com média de 32,5 x 24,2 µm e a relação C/L variou de 1,4 à 1,7. Foi observada a formação de clamidósporos globosos em todos os isolados,

sendo que estes apresentaram-se terminais com diâmetro variando de 25,5 – 51,3 µm com média de 38,4 µm e espessura da parede variando de 1,3 – 4,7 µm com média 2,5 µm (Tabela 1).

Em relação à compatibilidade dos isolados, todos apresentaram-se heterotáticos e pertencentes ao tipo A2. Após cinco dias do pareamento com isolados do tipo A1 houve produção abundante de oósporos globosos, apleróticos, de anterídio anfigeno e sem ornamentações (Figura 5). Os oósporos tiveram seu diâmetro variando de 19,2 – 30 µm com média de 25 µm e o oogônio variou de 23,3 – 33,9 µm, com média de 30 µm.

A comparação das sequências da região ITS-5.8S do rDNA do isolado sequenciado com sequências dessa região gênica disponíveis no GenBank para espécies de *Phytophthora* revelou maior similaridade com a espécie *P. cinnamomi*. Os índices de similaridade variaram de 98 a 99 % em relação aos depósitos de *P. cinnamomi* (AY96410). Na comparação realizada no Phytophthora- ID foi encontrado índice de 99% de similaridade com depósitos de *Phytophthora cinnamomi* (GU191210.1).



**Figura 5.** Características morfológicas de isolados de *Phytophthora cinnamomi* de plátano (aumento de 400X). Dilatações de hifas do isolado 2A (A); Clamidósporos terminais dos isolados PB (B) e 1B (C);Esporângios elipsoides dos isolados 2C (D), 2A (E) e 1B (F); Oósporos globosos com anterídios anfigenos dos isolados 2C (G), PB (H) e 1B (I).

**Tabela 1.** Dimensões de esporângios, clamidósporos e oósporos de 4 isolados de *Phytophthora cinnamomi* de plátano (1B, 2A, 2C e PB) e de 4 isolados de *P. cinnamomi* de araucária (AR-21, AR-32, AR-40 e AR-51).

Isolado	Esporângios		Clamidósporos		Oósporo (µm)	Oogônio (µm)
	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Diâmetro (µm)	Parede (µm)		
1B	17 <sup>A</sup> -32,7 <sup>B</sup> -49 <sup>C</sup> (±8) <sup>D</sup>	12-24,3-38,5 (±6,1)	30,5-39,8-49,7 (±4,7)	1,5-2,4-4,7 (±0,9)	20,3-24-27 (±2)	25,5-29-32 (±2)
2A	26,6-36-47,5 (±6,7)	30,6-26,4-34 (±4,3)	25,5-36,6-47,5 (±6,5)	1,3-2,4-4,6 (±0,8)	20,1-24,8-30 (±2)	23-29,9-32,9 (±2)
2C	16,7-30,8-47 (±7,5)	12,4-22-36,7 (±5,7)	26-38-51,3 (±5,8)	1,5-2,6-3,6 (±0,7)	22-25,4-29,5 (±2)	26,7-30-33,9 (±2)
PB	18,6-30,5-47 (±6)	13-23,2-35,3 (±5)	27,2-39-48,7 (±5)	1,5-2,5-4,2 (±0,7)	19,2-24-28,2 (±2)	23,8-29-33 (±2)
AR-21	31,3-43,6-62,5 (±7,34)	21,3-28,8-36 (±3,8)	28,8-38,8-50 (±3,8)	1,3-1,5-2,5 (±0,5)	21,2-24,9-28 (±1,8)	22-26,8-31,3 (±2,1)
AR-32	27,5-39-56,3 (±6,4)	18,8-25,2-40 (±4,5)	30-32,7-37,5 (±1,9)	1,3-1,3-1,3 (±0)	23,8-26-31,3 (±1,8)	21-24,6-28,8 (±1,7)
AR-40	27,5-36,9-52,5 (±5,2)	18,8-23,9-35 (±3,4)	30-35,4-51,6 (±3,9)	1,3-2-3,8 (±0,8)	21,3-25,3-30 (±1,9)	22,5-26,8-31 (±1,9)
AR-51	30-39,3-53,8 (±4,2)	20-25,5-31,3 (±2)	35-42,4-50 (±4,9)	1,2-1,4-2,5 (±4,9)	23,8-25-27,5 (±1,2)	25-26-28,8 (±1,2)

<sup>A</sup> Limite inferior; <sup>B</sup> Média de 50 esporângios; <sup>C</sup> Limite superior; <sup>D</sup> Desvio-padrão

## DISCUSSÃO

Com base nos caracteres morfológicos, fisiológicos e moleculares, os isolados de *Phytophthora* sp. provenientes de árvores de plátano foram identificados como *Phytophthora cinnamomi* Rands, pertencente ao Grupo VI de Waterhouse (27) e clado 7b, como o descrito por Blair et al. (3). Este é o primeiro relato desta espécie em árvores de plátano no Brasil. Este trabalho contribui com informações sobre a distribuição desta espécie no mundo, assim como, para a lista de seus hospedeiros no Brasil.

Na caracterização fisiológica dos isolados de plátano, não se verificou crescimento dos isolados nas temperaturas de 8 e 36 °C, sendo que estes apresentaram ótimo de crescimento na faixa de 20 a 28 °C, similar aos isolados de *P. cinnamomi* de araucária utilizados como padrões neste estudo. As temperaturas que limitaram o crescimento micelial dos isolados foram semelhantes às temperaturas também limitantes para *P. cinnamomi* (29). Em estudo realizado por Solana (25) foram encontrados resultados similares para isolados de *P. cinnamomi* provenientes de *Quercus* spp. na Espanha. Isolados de *P. cinnamomi* da África do Sul e da Austrália também obtiveram seu crescimento ótimo a 24 °C (14). Segundo Erwin e Ribeiro (8), a variável temperatura, é um critério bastante utilizado na caracterização de *Phytophthora*, uma vez que as espécies possuem diferentes temperaturas máximas e mínimas de crescimento, de forma que essa característica pode auxiliar a separar espécies morfológicamente semelhantes. Zentmeyer (29) relatou que as colônias do patógeno dessa espécie tem seu crescimento máximo entre os 24 a 27 °C e tem seu crescimento afetado acima de 33 °C e abaixo de 10 °C.

O aspecto das colônias não variou entre os isolados, sendo todos classificados como cotonoso de micélio pouco denso. Dentre os caracteres de maior relevância na taxonomia do gênero *Phytophthora* encontram-se a morfologia e dimensão das estruturas sexuadas e assexuadas. Observou-se a formação, em extrato de solo, de esporângios não papilados e predominantemente ovoides e elipsoides, sendo estes persistentes. As hifas apresentaram-se não septadas havendo a formação abundante de dilatações nas hifas e também a formação de clamidósporos globosos. Estas características correspondem às descritas por vários autores para a espécie *P. cinnamomi* Rands (8,11,12,23,26) e corroboram com as características definidas por Waterhouse (27) para *P. cinnamomi*

As dimensões dos esporângios dos isolados de *Phytophthora* sp. deste estudo foram em média de 32,5 x 24,2 µm assemelhando-se com os padrões de isolados de araucária de *P. cinnamomi* utilizados neste estudo. Zentmeyer et al. (30) definiram para *P. cinnamomi* os valores de 43 – 75 x 24 – 47 µm para estas estruturas. Estes autores ressaltam que pode haver uma grande variação quanto a estes parâmetros morfológicos para esta espécie, uma vez que os mesmos não permanecem estáveis. Resultados similares foram encontrados por Eggers et al. (7), estudando isolados de *P. cinnamomi* provenientes de árvores de carvalho (*Quercus* spp.) na Austrália.

Os clamidósporos são estruturas de sobrevivência produzida por algumas espécies de *Phytophthora*, havendo 35 espécies que formam esta estrutura dentre todas as descritas para o gênero (8). Os clamidósporos de *P. cinnamomi* são globosos e se caracterizam por apresentar paredes que são consideradas mais espessas quando comparadas a outras espécies deste gênero (29). Foi observada a formação de clamidósporos globosos e terminais nos quatro isolados, com diâmetro de em média 38,4 µm, assemelhando-se com isolados de araucária de *P. cinnamomi* utilizados como padrões neste estudo. Em isolados de *P. cinnamomi* obtidos de árvores de *Platanus acerifolia* na Itália valores de dimensões aproximados para esporângios e clamidósporos foram encontrados (18).

Em relação às estruturas sexuadas, os quatro isolados em estudo apresentaram-se heterotáticos, produzindo o tipo de compatibilidade A2. De acordo com Zentmeyer (29), o tipo A2 está amplamente distribuído, enquanto que o tipo A1 não é muito frequente. Os oósporos formados apresentaram-se apleróticos, de anterídio anfígeno de diâmetro de em média 25 µm e oogônio medindo em média 30 µm. Estes mesmos resultados foram encontrados por outros autores em outros hospedeiros (2,7,26). Segundo Erwin e Ribeiro (8), os oósporos variam de 19 – 54 µm e o oogônio, aplerótico, varia de 21 - 58 µm, sendo uma estrutura formada pelo pareamento de dois tipos de compatibilidade diferentes (A1 e A2).

O sequenciamento da região ITS de um dos isolados revelou 99% de similaridade do isolado em estudo com *Phytophthora cinnamomi*. As sequências de nucleotídeos das regiões ITS1 e ITS2 do gene ribossomal 5.8S do rDNA têm sido utilizadas na taxonomia de *Phytophthora* visando um rápido diagnóstico. Estas regiões são amplamente utilizadas para estudos filogenéticos por apresentarem variações entre espécies dentro do gênero, mas nenhuma ou muita

variação intraespecífica (4). As regiões ITS1 e ITS2 divergem o suficiente para ser informativas na distinção de espécies de *Phytophthora* (5). Além disso, estas regiões foram extensivamente sequenciadas para a maioria das espécies de *Phytophthora* e outros fungos relacionados (5). Estudos comparativos das sequências nucleotídicas de genes do RNA ribossomal permitem analisar e classificar isolados de espécies fúngicas com base filogenética em vários níveis taxonômicos (28). Estes estudos têm elucidado a ligação evolucionária de muitas espécies de oomicetos e permitem um estudo mais criterioso sobre a evolução de muitas destas espécies (1,8).

## REFERÊNCIAS

- Appiah, A.A.; Flood, J.; Archer, S.A.; Bridge, P.D. Molecular analysis of the major *Phytophthora* species on cocoa. **Plant Pathology**, Cambridge, v. 53, n.2, p. 209-219, 2004
- Besoain, X.; Arena, C.; Salgado, E.; Latorre, B.A. Efecto del periodo de inundación en el desarrollo de la tristeza del palto (*Persea americana*), causada por *Phytophthora cinnamomi*. **Ciencia e Investigación Agraria**, Chile, v.32, n.2, p. 97-103, 2005.
- Blair, J.E.; Coffey, M.D.; Park, S.Y.; Geiser, D.M.; Kang, S. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. **Fungal Genetics and Biology**, USA, v. 45, n. 3, p.266-277, 2008.
- Chowdappa, P.; Brayford, D.; Smith, J.; Flood, J. Identification of *Phytophthora* species affecting plantation crops by RFLP of PCR-amplified internal transcribed spacer regions of ribosomal RNA. **Current Science**, v. 85, p34-36, 2003.
- Cooke, D.E.L.; Drenth, A.; Duncan, J.M.; Wagels, G.; Brasier, C.M. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. **Fungal Genetics and Biology**, USA, v. 30, p.17-32, 2000.
- Crandall, B.S. Root disease of some conifers and hardwoods caused by *Phytophthora cambivora* (*P. cinnamomi*). **Plant Disease Reporter**, USA, v. 20, p. 202-204, 1936.
- Eggers, J.E.; Balci, Y.; MacDonald, W.L. Variation among *Phytophthora cinnamomi* isolates from oak forest soils in the eastern United States. **Plant Disease**, USA, v. 96, n.11, p. 1608-1614, 2012.
- Erwin, D.C.; Ribeiro, O.K. **Phytophthora diseases worldwide**. St. Paul: The American Phytopathological Society (APS Press), 1996. 562p.
- Figueiredo, M.B. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos de plantas. **O Biológico**, São Paulo, v. 33, p. 9-13, 1967
- Frezzi, M.J. Las especies de *Phytophthora* en la Argentina. **Revista de Investigación Agraria y Ambiental**, Argentina, v. 4, p. 47-133, 1950.
- Gallegly, M.E.; Hong, C. **Phytophthora: identifying species by morphology and DNA fingerprints**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 2008. 158p.
- Gallegos, T.; Diana, E. Identificación Molecular de *Phytophthora* spp. en el cultivo de aguacate (*Persea americana* M.), de las principales zonas productoras del Ecuador. 2013. 70f. Tesis, Facultad de Ingeniería Agronómica, Universidad Central del Ecuador, Quito.
- Greenhalgh, F.C., Challen, D.I. Trunk rot of oriental plane trees caused by *Phytophthora cinnamomi*. **Australasian Plant Pathology**, v. 8, n. 4, p. 50, 1979.
- Hüberli, D.; Tommerup, I.C.; Dobrowolski, M.P.; Calver, M.C.; Hardy, G.E. Phenotypic variation in a clonal lineage of two *Phytophthora cinnamomi* populations from Western Australia. **Mycological Research**, United Kingdom, v.105, n.9 p. 1053-1064, 2001.
- Kroon, L.P.N.M.; Brouwer, H.; Cock, A.W.A.M.; Govers, F. The Genus *Phytophthora* Anno 2012. **Phytopathology**, USA, v.102, n.4, p.348-364, 2012.
- Newhook, F.J.; Podger, F.D. The role of *Phytophthora cinnamomi* in Australian and New Zealand forests. **Annual Review of Phytopathology**, Australia, v.10, p. 299-326, 1972.
- Ono, E.O.; Barros S.A. de, Rodrigues, J.D.; Pinhos, Z. Enraizamento de estacas de *Platanus acerifolia*, tratadas com auxinas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29, n. 9, p. 1373-1380, 1994.
- Pilotti, M.; Di Lernia, G.; Lumia, V.; Riccioni, L. *Phytophthora cinnamomi* causing stem canker and root rot of nursery-grown *Platanus × acerifolia*: first report in the Northern hemisphere. **Phytopathologia Mediterranea**, Roma, v.53, n 1, p. 75, 2014.
- Rehder, A. **Manual of cultivated trees and shrubs**, New York ed, The Macmillan Company, 1927, v.1, 558-578
- Santos, A.F. dos; Luz, E.D.M.N.; Reis, A. *Phytophthora* spp.: distribuição e associação com espécies florestais. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 47, 2014. **Anais**: Londrina: SBF, 2014.
- Santos, M.V.O. *Phytophthora cinnamomi* na rizosfera de cultivos agrícolas no Sul da Bahia. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n.1, p.92, 2014.
- Schmitthenner, A. F.; Bhat, R. G. **Useful methods for studying Phytophthora in the laboratory**. OARDC, Wooster, OH. 1994. 10 p.
- Sepúlveda-Chavera, G.; Salvatierra-Martínez, R.; Bilbao-Apata, C.; Sepúlveda-Ramírez, P.; Allende-Castro, M.; Alache-González, J. Presence of *Phytophthora cinnamomi* Rands in avocado orchards in Azapa and Copda valleys, Chile. **IDESIA**, v. 31, n.2, p. 41-47, 2013.
- Siviero, A.; Furtado, E.L.; Boava, L.P.; Barbasso, D.V.; Machado, M.A. Avaliação de métodos de inoculação de *Phytophthora parasitica* em plântulas e plantas jovens de citros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 574-580, 2002.
- Solana, J.E.; Rebollo, M.P.F.; Cerillo, R.M.N.; Casas, A.T. Incidencia de la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamom* en masas de *Quercus* en Andalucía. **Boletín de sanidad vegetal**, Espanha, v. 29, n. 1, p. 87-108, 2003.
- Tziros, G.T.; Diamandis, S. Identification of *Phytophthora cinnamomi* as the cause of decline and death in *Taxus baccata* in Greece. **Australasian Plant Disease Notes**, Australia, v. 8, n 1, p. 153-155, 2013.
- Waterhouse, G.M. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Commonwealth Mycological Institute, Kew, U.K. **Mycological Papers**, v. 92, p. 22, 1963.
- White, T.J.; Bruns T.; Lee, S.; Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J. eds. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-322.
- Zentmyer, G.A. The World of *Phytophthora*. In: Erwin, D.C.; Bartnicki-Garcia, S.; Tsao, P.H. **Phytophthora: Its Biology, taxonomy, ecology and pathology**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1983. p.1-7.
- Zentmyer, G.A. **Phytophthora cinnamomi and the diseases it causes**. Monograph n° 10. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1980. 96p.