

Phytophthora nicotianae: Agente Etiológico da Gomose da Acácia-Negra no Brasil

Álvaro F. dos Santos^{1*}, Edna Dora. M. N. Luz^{2*} & Jorge Teodoro de Souza²

¹Embrapa Florestas, Cx. Postal 319, CEP 83411-000, Colombo, PR, e-mail: alvaro@cnpf.embrapa.br;

²CEPLAC/CEPEC/SEFIT, Cx. Postal 07, CEP 45600-970, Ilhéus, BA

(Aceito para publicação em 31/08/2004)

Autor para correspondência: Álvaro F. dos Santos

SANTOS, A.F. DOS, LUZ, E.D.M.N. & SOUZA, J.T. DE *Phytophthora nicotianae*: agente etiológico da gomose da acácia-negra no Brasil. Fitopatologia Brasileira 30:81-84. 2005.

RESUMO

A gomose, causada por *Phytophthora* sp., é a mais importante enfermidade da acácia-negra (*Acacia mearnsii*) no Rio Grande do Sul, Brasil. A identificação específica permanecia indeterminada. Procurou-se, então, identificar a espécie de *Phytophthora* causadora desta doença no Rio Grande do Sul, usando características fisiomorfológicas e estudos moleculares baseados no seqüenciamento das regiões de Internal Transcribed Spacer (ITS). A patogenicidade dos isolados estudados para a acácia-negra foi confirmada. Os estudos confirmaram *Phytophthora nicotianae* como a correta identidade dos isolados fitopatogênicos. Este é o primeiro relato de *P. nicotianae* em acácia-negra no Brasil.

Palavras-chave adicionais: *Acacia mearnsii*, patogenicidade, isolado fitopatogênico

ABSTRACT

Phytophthora nicotianae: causal agent of gummosis of black wattle in Brazil

Gummosis caused by *Phytophthora* sp. is the most important disease of black wattle (*Acacia mearnsii*) in Rio Grande do Sul, Brazil. Isolates of *Phytophthora* sp. associated with diseased plants were obtained from Rio Grande do Sul and their pathogenicity was confirmed. In order to elucidate the correct identity of the fungus at the species level physiomorphological characteristics were determined and molecular studies were conducted based on sequences of Internal Transcribed Spacer (ITS) region. The fungus was identified as *Phytophthora nicotianae*. This is the first report of *P. nicotianae* on black wattle in Brazil.

Additional keywords: *Acacia mearnsii*, pathogenicity, pathogenic isolate.

A acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.) é uma espécie florestal originária da Austrália, plantada em diversos países, tendo sido introduzida no Brasil, no Estado do Rio Grande do Sul, na década de 30. Atualmente, com uma área plantada superior a 150.000 ha, compõe um dos maciços florestais daquele Estado. A contribuição dessa planta aos mais variados segmentos econômicos e industriais é ampla, tanto para a extração do tanino, a partir da casca, como para o uso da madeira, na produção de energia, celulose, papel e chapa de fibra. No Brasil, é plantada principalmente para a produção de tanino (Fleig, 1993).

A gomose, doença do tronco causada por *Phytophthora* sp., é o principal problema sanitário da acácia-negra e ocorre nas principais regiões produtoras do Brasil e da África do Sul (Santos *et al.*, 1998). No Brasil, encontra-se distribuída em grande parte das áreas produtoras do Rio Grande do Sul. Essa doença danifica a casca, principalmente nas porções basal e mediana do tronco (Figura 1), chegando a causar prejuízos econômicos pela diminuição no aproveitamento da casca e, em casos mais extremos, pela morte das árvores. Em plantios comerciais em idade de corte (sete anos) chega a atingir 23% de indivíduos (Sotta *et al.*, 1994). A

identificação específica do patógeno permanecia indeterminada. Este trabalho teve o objetivo de identificar a espécie de *Phytophthora*, causadora da gomose da acácia-negra no Brasil, usando características fisiomorfológicas e estudos moleculares baseados no seqüenciamento das regiões de Internal Transcribed Spacer (ITS).

Amostras da casca do tronco de árvores com sintomas de gomose foram coletados, em plantações localizadas nos municípios de Encruzilhada do Sul, Cristal e Piratini, no Rio Grande do Sul. Para o isolamento, utilizou-se o meio ágar-água 2% suplementado com ampicilina (50 ppm), benomil (10 ppm) e cloramfenicol (20 ppm) (Santos *et al.*, 1998). As placas foram incubadas no escuro, a 25 °C. Micélio com características do gênero *Phytophthora* crescendo a partir dos tecidos doentes foram transferidos para o meio BDA (200 g de batata, 20 g de dextrose, 18 g de ágar e 1.000 ml de água destilada) e conservados neste meio de cultura, por meio de repicagens periódicas. Procedeu-se, então, as avaliações das características morfo-fisiológicas dos isolados, que foram denominados AN 3, AN 8 e AN 16. Para a identificação foram usadas as chaves de Waterhouse (1963), Waterhouse (1970), Neehook *et al.* (1978) e Stamps *et al.* (1990), além de Erwin & Ribeiro (1996) e Frezzi (1950).

* Bolsistas do CNPq



FIG. 1 - Sintoma da gomose em tronco de acácia-negra (*Acacia mearnsii*)

Para estudar o tipo de colônia, foram usados os meios BDA, cenoura-ágar (CA), fubá ágar (CMA) e V8-ágar. Como os isolados produziram poucos esporângios nesses meios de cultura utilizou-se então, para estimular a produção de esporângios, solução de KNO_3 (Ribeiro, 1978), conforme segue: os isolados de *Phytophthora* sp. foram crescidos em meio CA, incubados no escuro contínuo por sete dias. Após este período, o meio de cultura contendo micélio fúngico foi cortado em tiras paralelas de aproximadamente 4 mm de largura. Em seguida, as tiras foram transferidas para placas de Petri esterilizadas e distribuídas de maneira que ficassem cerca de meio centímetro distanciadas entre si. Foi adicionada solução de KNO_3 , pH=6, 0,001 M, em quantidade suficiente para deixar as tiras de meio de cultura com micélio fúngico submergidas. O conjunto foi distribuído em prateleiras e submetido à iluminação constante, fornecida por lâmpadas fluorescentes (General Electric, 40 Watts, luz do dia), a cerca de 40 cm de altura (2000 lux), por um período de dez dias. Para as determinações biométricas dos esporângios, foram preparadas lâminas para microscopia coletando-se um pouco da massa micelial contendo esporângios e ou clamidósporos em lactofenol. As medidas foram feitas em 50 unidades de cada um dos tipos de esporos.

Para determinar o grupo de compatibilidade, as culturas foram pareadas individualmente com os tipos padrões A1 (*Phytophthora capsici* Leonian) e A2 [*P. palmivora* (Butler) Butler], do cacauieiro (*Theobroma cacao* L.), da coleção da

CEPLAC, Ilhéus-BA, em meio CA, no escuro a 25 °C. Avaliou-se a formação de oósporos a partir do sexto dia de incubação.

Foram testados os efeitos de diferentes temperaturas (8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 35 °C ou 36 °C) e de três meios de cultura (BDA, CA e V8-ágar) sobre o crescimento micelial dos isolados de *Phytophthora* sp. O crescimento radial de colônias de cada isolado foi medido diariamente por sete dias ou até atingir a borda da placa.

O teste de patogenicidade foi realizado em mudas de acácia-negra com dez meses de idade, conforme segue: na inoculação retirou-se do caule, um disco de casca de 7 mm de diâmetro, a uma altura de 5 cm do solo e, em seguida, colocou-se um disco de 7 mm de diâmetro de meio BDA, contendo micélio do fungo, que tinha sido previamente incubado no escuro à temperatura de 24 °C, por sete dias. O local foi envolto com fita adesiva. Foram inoculadas dez plantas para cada isolado. A testemunha consistiu em se colocar um disco de BDA sem o fungo. A avaliação foi realizada após 45 dias de incubação, determinando-se o tamanho da lesão e a presença de exsudação de goma. Os fragmentos dos tecidos de casca obtidos a partir das margens das lesões foram usados para o reisolamento do fungo.

Para extração do DNA a massa micelial de cada um dos isolados (AN 3, AN 8 e AN 16) foi produzida em placas de Petri contendo o meio líquido de batata-dextrose. O DNA genômico de cada isolado foi extraído a partir de aproximadamente 250 mg de massa micelial, utilizando-se o método do SDS com algumas modificações: o micélio foi macerado em cadinho de porcelana em contato com N_2 líquido. Em seguida, o macerado foi colocado em um tubo plástico de 1,5 ml, ao qual foram adicionados 700 μl de tampão de lise constituído por Tris-HCl 200 mM, pH 8,0, EDTA 25 mM, dodecil sulfato de sódio 1%, NaCl 250 mM e 2-mercaptoetanol 1%. O macerado foi misturado ao tampão de lise e os tubos mantidos em banho-maria (70 °C) por uma hora, sendo agitados, a cada 10 min. Após a incubação, foi realizada a desproteínização, adicionando-se 600 μl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v). Em seguida, as amostras foram agitadas, por suaves inversões, por 10 min e centrifugadas a 4 °C, a 18.845 g, por 10 min. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para tubos de 1,5 ml limpos e o processo de desproteínização foi repetido. Para a precipitação do DNA, foi adicionado ao sobrenadante final, 1/10 do seu volume de acetato de sódio 3M, pH 5,2 e 2/3 de isopropanol gelado. Os tubos foram mantidos a -20 °C por 2 h e, a seguir, centrifugados como anteriormente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com etanol 70% (v/v) e seco à temperatura ambiente. Posteriormente, os ácidos nucléicos totais foram ressuspensos em 150 μl de água contendo RNase na concentração de 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e colocados em banho-maria a 37 °C para a completa ressuspensão. Após esse período, o DNA foi novamente precipitado, centrifugado e ressuspensado em 100 μl de água, como já descrito.

A quantidade do DNA foi estimada por espectrofotometria a 260 nm e a relação A_{260}/A_{280} foi utilizada para avaliar a pureza do DNA. Bandas de DNA genômico total, separadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%, foram

usadas como indicadoras da integridade do DNA extraído. Após esse processo, as amostras de DNA foram diluídas para 10 ng/μl.

Os primers ITS1 e ITS4 descritos por White *et al.* (1990) foram usados na amplificação do fragmento de rDNA incluindo ITS 1, o gene 5,8 S do DNA ribossomal e ITS2 através da reação de cadeia de polimerase (PCR). As amplificações de PCR foram realizadas em reação a 25-μl contendo 30 ng de DNA, 1X PCR tampão (Invitrogen), 1,5 mM MgCl₂ (Invitrogen), 200 μM de dATP, dCTP, dGTP, and dTTP (Promega), 40 pmol de cada primer, e 2,0 U de Taq polimerase (Invitrogen). O programa de PCR consistiu de uma desnaturização inicial de 5 min a 95 °C, seguida de 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 2 min a 55 °C, e 3 min a 72 °C, com uma final de 5 min a 72 °C em termociclador MJ Research PTC-200. Aliquotas de 5 μl foram separadas em gel de agarose a 1% (peso/vol) em tampão 1X TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA [pH 8]), corado com ethidium bromide, e fotografados por UV.

Antes do seqüenciamento, os produtos de PCR foram purificados com um kit QIAquick PCR (QIAGEN), de acordo com as especificações do fabricante. Cada isolado foi seqüenciado usando os primers ITS1 e ITS4. O seqüenciamento da região de rDNA incluindo os espaços ITS1, ITS2 e 5.8S rDNA, foi feito em seqüenciador automático de DNA com terminais fluorescentes usando um prisma seqüenciador ABI 377 (Applied Biosystems).

Para análise filogenética obteve-se através do GenBank as seqüências de *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan 911 (A₁) (AY208131), *P. nicotianae* UQ848 (AF266776), *P. palmivora* UQ1294 (AF266780), *P. capsici* 21170 (AY251662), e *P. citrophthora* (Sm. & Sm.) Leonian IMI209255 (L76536) que foram incluídas na árvore filogenética para efeito de comparação. A análise de BLASTN usando o programa CLUSTAL W 1.81 (Thompson *et al.*, 1994) foi aplicada e estimadas as distâncias de Pairwise com um modelo de diferenças numéricas usando o Mega2 (Kumar *et al.*, 2001). A interpretação das interferências filogenéticas foi feita pelo método do vizinho mais próximo (Saitou & Nei, 1987). Os locais que apresentavam falhas não foram considerados nas interferências filogenéticas.

Os dados biométricos apresentados referem-se às médias obtidas dos três isolados AN 3, AN 8 e AN 16. Os isolados de acácia-negra apresentaram o maior crescimento micelial entre 24 e 32 °C e nenhum crescimento a 36 °C (Figura 2). As culturas, em meio CA eram petalóides, com bordas difusas, micélio aéreo denso e cotonoso. Os esporângios, formados em caldo de cenoura, eram papilados, persistentes, predominantemente ovóides (Figura 3B) a mais ou menos esféricos, medindo 33,3-56,0 X 24,5-35,0 μm (média: 42,5 x 29,6 μm), com relação comprimento/largura de 1,4:1, profundidade média de papila de 4,0 μm e poro com 6,0 μm de largura. Os clamidósporos, presentes em CMA e em caldo de cenoura, apresentaram-se terminais (Figura 3A) ou intercalares, com diâmetro de 25,4 a 40,3 μm (média de 33 μm). As culturas são heterotáticas, com presença de isolados dos grupos de compatibilidade A₁ e A₂. Os oósporos mediram 23-38 μm de diâmetro (média 29 μm). Os anterídios eram anfígenos.

Todos os isolados foram patogênicos à acácia-negra e formaram lesões nas plantas inoculadas, porém não se observou exsudação de goma nas lesões produzidas. As plantas testemunhas continuaram o seu desenvolvimento normal, sem lesões.

Baseado nas seqüências parciais de ITS 1 e ITS2, e no gene 5.8S do DNA ribossomal, os isolados apresentaram 100% de seqüências idênticas entre si e com os isolados do GenBank 911 (A₁), 6134 (A₂) e UQ848 de *P. nicotianae*.

Pelas características culturais e morfológicas, e pela análise filogenética baseada no seqüenciamento parcial de ITS 1 e ITS2, e no gene 5.8S do DNA ribossomal, os isolados de *Phytophthora* sp. obtidos de acácia-negra no Rio Grande do

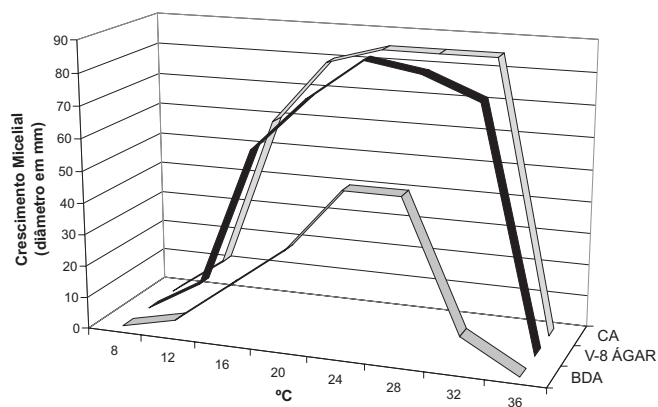


FIG. 2 - Efeito do meio de cultura e da temperatura no crescimento micelial de *Phytophthora nicotianae*.

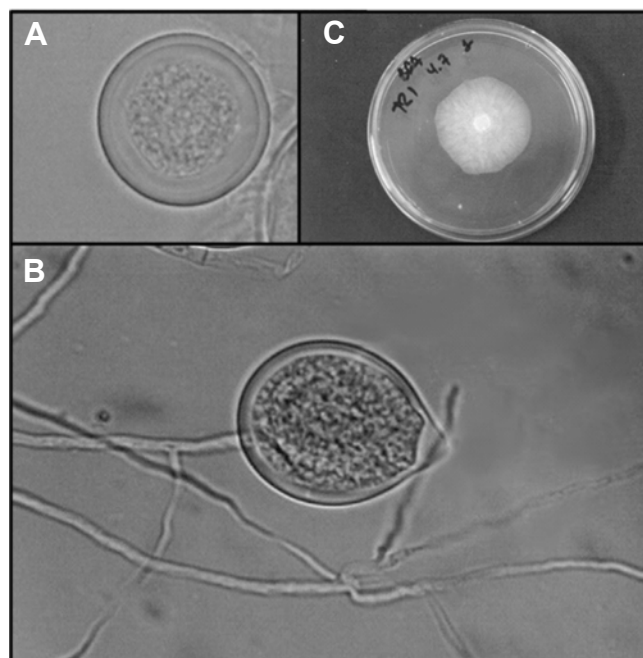


FIG. 3 - A: Clamidósporo; B: Esporângio; C: Cultura de *Phytophthora nicotianae*.

Sul foram enquadrados como pertencentes à espécie *P. nicotianae*, conforme segue: esporângios persistentes, papilados e ovóides; clamidósporos terminais ou intercalares; heterotáticos, formando anterídios anfígenos. Na África do Sul, Zeijlemaker (1971) e Roux & Wingfield (1997) também associaram a gomose ao fungo *P. nicotianae*. Este trabalho constitui-se no primeiro relato de *P. nicotianae* em acácia-negra no Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ERWIN, D.C. & RIBEIRO, O.K. (Eds.) *Phytophthora* diseases worldwide. St. Paul, APS Press. 1996.
- FLEIG, F.D. Análise econômica de sistema de produção com acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.) no Rio Grande do Sul. (Tese Mestrado). Santa Maria:Universidade Federal de Santa Maria, 1993.
- FREZZI, M.J. Las especies de "Phytophthora" en la Argentina. *Revista de Investigaciones Agrícolas* 4:47-134. 1950.
- KUMAR, S., TAMURA, K., JAKOBSEN, I.B. & NEI, M. MEGA 2:molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics Applications Note* 17:1244-1245. 2001.
- NEEHOOK, F.J., WATERHOUSE, G.M. & STAMPS, D.J. Tabular key to the species of *Phytophthora* de Bary. Kew, Commonwealth Mycological Institute. *Mycology, Papers* 143. 1978.
- ROUX, J. & WINGFIELD, M.J. Survey and virulence of fungi occurring on diseased *Acacia mearnsii* in South-Africa. *Forest Ecology and Management* 99:327-336. 1997.
- SAITOU, N. & NEI, M. The neighbor-joining method:a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425. 1987.
- SANTOS, A.F., AUER, C.G. & GRIGOLETTI JR., A. Caracterização de tipos de gomose da acácia-negra (*Acacia mearnsii*) no sul do Brasil. *Boletim de Pesquisa Florestal* 37:31-40. 1998.
- SOTTA, E.D., HIGA, A.R., LAVORANTI, O.J., STEIN, P.P. Avaliação dos danos causados pela gomose em acácia-negra. Curitiba:EMBRAPA-CNPQ, 1994.
- STAMPS, D.J., WATERHOUSE, G.M., NEEHOOK, F.J. & HALL, G.S. Revised tabular key to the genus *Phytophthora*. Wallingford, CAB International Mycology Papers 162. 1990.
- THOMPSON, J. D., HIGGINS, D.G. & GIBSON, T.J. CLUSTAL W:improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680. 1994.
- WATERHOUSE, G. M. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Kew, Commonwealth Mycological Institute. *Mycology, Papers* 92. 1963.
- WATERHOUSE, G.M. The genus *Phytophthora* de Bary. Diagnoses (or descriptions) and figures from the original papers. Kew, Commonwealth Mycological Institute. *Mycology, Papers* 122. 1970.
- 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*. pp.315-322. Academic Press, San Diego. 1990.
- ZEILJEMAKER, F.C.J. Black - butt disease of black wattle caused by *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*. *Phytopathology* 61:144-145. 1971.