

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HELOISE VOLPE LOPES

CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE
Phytophthora palmivora DA PUPUNHEIRA



CURITIBA

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HELOISE VOLPE LOPES

CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE
Phytophthora palmivora DA PUPUNHEIRA

CURITIBA

2016

HELOISE VOLPE LOPES

CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE
Phytophthora palmivora DA PUPUNHEIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Figueredo dos Santos
Co-orientador: Prof. Dr. Dauri José Tessmann

CURITIBA

2016

L864 Lopes, Heloise Volpe
Caracterização morfofisiológica e molecular de isolados de
Phytophthora palmivora da pupunheira. Heloise Volpe Lopes. /
Curitiba: 2016.
66 f. il.

Orientador: Álvaro Figueredo dos Santos
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em
Agronomia – Produção Vegetal.

1. Pupunheira – Doenças e pragas. 2. Pupunheira - Cultivo.
I. Santos, Álvaro Figueredo dos. II. Universidade Federal do
Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação
em Agronomia – Produção Vegetal. III. Título.

CDU 634.61:632.25



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA - PRODUÇÃO VEGETAL

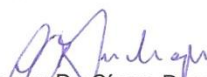



PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO, apresentada pela candidata **HELOISE VOLPE LOPES**, sob o título "**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Phytophthora palmivora* DA PUPUNHEIRA**", para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

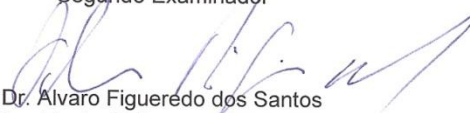
Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Dissertação.

Curitiba, 26 de Fevereiro de 2016.


Professor Dr. Cícero Deschamps
Coordenador do Programa


Dr. Celso Garcia Auer
Primeiro Examinador


Professor Dr. Henrique da Silva Silveira Duarte
Segundo Examinador


Dr. Alvaro Figueredo dos Santos
Presidente da Banca e Orientador

Aos meus pais Solange e José Francisco pelo
eterno apoio, paciência e amor.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre misericordioso, fiel e bondoso. Por me dar a vida, a esperança e a fé pra continuar quando muitas vezes queria desistir. Por ser meu chão e me fazer acreditar em mim mesma. Obrigada Senhor. A Ti louvo e agradeço.

Aos meus pais Solange e José Francisco pelo amor incondicional, por me proporcionarem as oportunidades e educação para estar realizando esse trabalho, pela paciência, carinho e compreensão. Toda a minha gratidão. Vocês são meu alicerce.

À minha irmã Natália, pelo apoio e carinho sempre quando mais precisei. Por estar sempre ao meu lado e pelas orações.

À minha segunda mãe Cristiane pelas orações e amor incondicional. Sempre me apoiando quando mais precisei.

Ao meu orientador Prof. Dr. Álvaro Figueredo dos Santos, pelos ensinamentos que me foi dado, pela paciência e compreensão, por todo conhecimento adquirido. Muito obrigada pela confiança, acolhimento e dedicação para que eu me tornasse uma profissional melhor.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Dauri José Tessmann, por ter sido meu orientador na graduação e ter me apresentado ao universo da fitopatologia e de forma direta e indiretamente pela ajuda neste trabalho.

À Dra. Lucimeris Ruaro pela participação na pré-defesa e por suas contribuições para o desenvolvimento na escrita do trabalho.

À Dra. Elisa Serra Negra Vieira pela orientação na biologia molecular, auxiliando e compartilhando seu conhecimento.

Ao Dr. Celso Garcia Auer pelos conselhos dados e experiência adquirida.

Ao Dr. Henrique da Silva Silveira Duarte pela orientação na disciplina de Prática Docente, pela ajuda em dúvidas no presente trabalho e ensinamentos adquiridos durante o mestrado.

À Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade ofertada de poder participar do programa de Pós-graduação em Agronomia - Produção Vegetal.

À todos os professores do programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, pelos conhecimentos adquiridos nas disciplinas.

À Embrapa Florestas por abrir as portas e possibilitar a realização de todo o meu trabalho, em especial aos funcionários e amigos Caroline e Davi pelas orientações durante todo esse tempo.

Aos meus amigos de laboratório e da vida Ana Lídia, Edson, Flávia, Heloisa, Tiago, Etienne, Maria Cecília, Jhulia, Mônica, Heliethe e Pedro, pela torcida, risadas, conselhos e principalmente acolhimento.

À todos que de alguma forma me ajudaram direta ou indiretamente para que esse trabalho fosse concretizado.

“Não sabendo que era impossível, ele foi lá e fez”.
Jean Cocteau

RESUMO

A área plantada com pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth var. *gasipaes* Henderson) para a produção de palmito tem aumentado nos estados da Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Tocantins, São Paulo, Paraná e Santa Catarina. Nestas regiões, os plantios dessa palmeira são atacados pela doença conhecida como podridão da base do estipe (PBE), associada ao oomiceto *Phytophthora*. As plantas doentes apresentam amarelecimento da primeira e segunda folha aberta e da folha bandeira seguido de morte da touceira. Há poucos trabalhos sobre a etiologia desta doença. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi caracterizar com base em características morfológicas, fisiológicas e moleculares, os isolados de *Phytophthora* provenientes de plantios de pupunheira visando a sua identificação específica. Utilizou-se 31 isolados de *Phytophthora* oriundos de plantios de pupunheira dos estados de São Paulo (Eldorado, Cajati e Registro), Paraná (Paranaguá e Morretes) e Santa Catarina (Massaranduba, Garuva e Joinville). Avaliou-se o crescimento micelial dos isolados de *Phytophthora* sp. em oito temperaturas (8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 e 36 °C), o aspecto das colônias, a produção de esporângios, clamidósporos e oósporos. Foram realizadas medições de 50 estruturas de cada isolado. Procedeu-se análise molecular dos isolados com base nas regiões ITS1 e ITS2 e Cox1 e Cox2. Foram observados três padrões de colônia classificados em ligeiramente estrelado, estrelado e cotonoso, sendo o ligeiramente estrelado mais frequente. Não houve crescimento micelial nas temperaturas de 8 °C e 36 °C, sendo a temperatura ótima de 23,7 °C. Os esporângios foram caracterizados como papilados e caducos, elipsoides, em sua maioria, com medidas entre 21,1 - 84,8 µm de comprimento e 17,4 - 41,7 µm de largura, com pedicelos curtos, entre 0,4 - 6,6 µm formados em ontogenia simpodial. A relação comprimento/largura (C/L) variou de 1,3 - 1,9. As papilas mediram entre 0,9 - 11,2 µm de profundidade e 0,5 - 11,4 µm de largura. Clamidósporos mediram de 20,0 - 53,6 µm de diâmetro e 0,3 - 4,4 µm de espessura de parede, apresentaram-se globosos, terminais e intercalares. Todos os isolados tiveram natureza heterotática, pertencentes ao tipo A1. Os oósporos globosos, appleróticos e sem ornamentações nas paredes mediram de 26,0 - 63,6 µm, com anterídios anfígenos e oogônios medindo entre 32,2 - 72,4 µm. Com base nas características morfofisiológicas e moleculares, os isolados de pupunheira foram enquadrados na espécie *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler.

Palavras-chave: Taxonomia, Oomiceto, *Bactris gasipaes*, Patologia Florestal, etiologia.

ABSTRACT

The area planted with peach palm (*Bactris gasipaes*) for palm heart production has increased in Brazil, especially in the states of Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Tocantins, São Paulo, Paraná and Santa Catarina. In these regions, both young and adult plantations of this palm tree are attacked by several diseases, standing out the disease known as stem base rot (SBR), which is associated to the oomycete *Phytophthora*. Diseased plants are characterized by yellowing of the first and second open leaf and the flag leaf followed by the death of the clump. There are few studies on the etiology of this disease. Thus, the main objective of this study was to characterize the *Phytophthora* isolates from peach palm and thirty one isolates of *Phytophthora* originated from peach palm plantations from the states of São Paulo (Eldorado, Cajati and Registro), Paraná (Paranaguá and Morretes) and Santa Catarina (Massaranduba and Joinville) were used in order to obtain their specific identification. It was evaluated the mycelial growth of *Phytophthora* sp. isolates in eight temperatures (8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 e 36 °C), the aspect of the colonies and the production of sporangia, chlamyospores and oospores. Also, measurements of the each structure were taken being 50 structures per isolate. It was proceeded the molecular analysis of the isolates based on the analysis of the ITS1 and ITS2 and *Cox1* and *Cox2* regions. It was observed three colony patterns classified into slightly starry, starry and cottony, being the slightly starry the most frequent. There was no mycelial growth at 8 °C and 36 °C and the optimum temperature range for growth was 23.7 °C. Sporangia presented, mostly ellipsoid, measurements between 23.7 - 84.8 µm long and 17.4 - 41.7 µm wide and were characterized as papillate, caducous, with pedicels long to short, measuring between 0.4 - 6.6 µm, formed in simpodial ontogeny. The length/width ratio (L / W) ranged from 1.3 - 1.9. The papillae measured between 0.9 - 11.2 µm deep and 0.5 - 11.4 µm wide. Chlamyospores measuring between 20.0 - 53.6 µm in diameter and 0.3 - 4.4 µm of wall thickness, were globular, terminals and intermediate. All isolates were classified as heterothallic, belonging to A1 type. Oospores measuring between 26.0 - 63.6 µm were globose, aplerotic and with unornamented walls, with amphigenous antheridia and oogonia measuring between 32.2 - 72.4 µm. Based on the morphological, physiological and molecular characteristics, the peach palm isolates belong to the specie *Phytophthora palmivora* Butler.

Key-words: Taxonomy, oomycete, *Bactris gasipaes*, Forest Patology, etiology.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - MORFOLOGIA DAS CULTURAS DE *Phytophthora* sp. DE PUPUNHEIRA A 24°C COM SETE DIAS DE CULTIVO EM MEIO DE CULTURA V8-ÁGAR: A – LIGEIRAMENTE ESTRELADO (ISOLADO SP1), B – ESTRELADO (ISOLADO SA8) E C – COTONOSO (ISOLADO MATATIAS)..... 34
- FIGURA 2 - FORMAS DOS ESPORÂNGIOS DOS ISOLADOS DE *Phytophthora* sp. DE PUPUNHEIRA, (A) ELIPSOIDE, (B) OVOIDE, (C) GLOBOSO, (D) OBTURBINADO COM PRESENÇA DE CLAMIDÓSPORO, (E) LIMONIFORME, (F) BIPAPILADO E (G, H, I) FORMAS DISTORCIDAS. AUMENTO DE 400X..... 35
- FIGURA 3 - CLAMIDÓSPOROS DOS ISOLADOS DE *Phytophthora* sp. DE PUPUNHEIRA, (A) TERMINAL E (B) INTERCALAR. AUMENTO DE 400X. 36
- FIGURA 4 – DISPOSIÇÃO DOS ESPORÂNGIOS NOS ESPORANGIÓFOROS: ONTOGENIA DO TIPO SIMPODIAL. AUMENTO DE 100X..... 41
- FIGURA 5 - OÓSPOROS DE ISOLADOS DE *Phytophthora* sp. DE PUPUNHEIRA: APLERÓTICOS COM DESTAQUE PARA O ANTERÍDIO ANFÍGENO (SETAS). AUMENTO DE 400X..... 44
- FIGURA 6 - - CURVAS DE CRESCIMENTO MICELIAL (MM) DE ISOLADOS DE *Phytophthora* sp. DE PUPUNHA, EM OITO TEMPERATURAS DIFERENTES. NÚMEROS SEGUIDOS POR (*) REPRESENTAM O VALOR DA DERIVADA DE CADA CURVA (TEMPERATURA ÓTIMA)..... 46
- FIGURA 7 - MUDA DE PUPUNHEIRA INOCULADA COM *Phytophthora* sp. (DIREITA) E TESTEMUNHA (ESQUERDA)..... 49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ISOLADOS DE <i>Phytophthora</i> sp. DE PUPUNHEIRA ORIUNDOS DOS ESTADOS DE SÃO PAULO, PARANÁ E SANTA CATARINA.....	24
TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS CULTURAIS COMO: PADRÃO DE COLÔNIA, FORMA DOS ESPORÂNGIOS E PRESENÇA DE CLAMIDÓSPOROS DOS ISOLADOS DE <i>Phytophthora</i> sp. DE PUPUNHEIRA.....	31
TABELA 3 - DIMENSÕES DOS ESPORÂNGIOS, PAPILA, PEDICELO E CLAMIDÓSPOROS DOS ISOLADOS DE <i>Phytophthora</i> sp. DE PUPUNHEIRA ORIUNDOS DOS ESTADOS DE SÃO PAULO, PARANÁ E SANTA CATARINA.....	37
TABELA 4 - GRUPO DE COMPATIBILIDADE, DIMENSÕES DE OOGÔNIO E OÓSPORO DE ISOLADOS DE <i>Phytophthora</i> sp. DE PUPUNHEIRA	42
TABELA 5 - SIMILARIDADE DE ISOLADOS DE <i>Phytophthora palmivora</i> DE PUPUNHEIRA, MEDIANTE COMPARAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE DNA DOS GENES ITS E COX DO BANCO DE DADOS PHYTOPHTHORA-ID.....	50

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1. A pupunheira	16
2.2. A podridão da base do estipe	17
2.3. O gênero <i>Phytophthora</i>	18
2.3.3. <i>Phytophthora palmivora</i> Butler (Butler)	19
2.4. Taxonomia e identificação de <i>Phytophthora</i>	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Origem e preservação dos isolados	23
3.2 Caracterização morfofisiológica dos isolados de <i>Phytophthora</i> sp.	25
3.2.1 Características culturais	25
3.2.2 Morfologia e dimensão de esporângios e clamidósporos	25
3.2.3 Ontogenia dos esporângios	25
3.2.4 Morfologia do anterídio e dimensões do oogônio e oósporo	26
3.2.5 Avaliação do crescimento micelial em diferentes temperaturas	27
3.2.6 Teste de patogenicidade dos isolados.....	27
3.3 Caracterização molecular dos isolados.....	28
3.3.1 Processo de extração de DNA.....	28
3.3.2 Reação da polimerase em cadeia (PCR)	28

3.3.3	Reação de sequenciamento	29
4.	RESULTADOS	31
4.1	Caracterização morfofisiológica dos isolados de <i>Phytophthora</i> sp.	31
4.1.1	Características culturais	31
4.1.2	Morfologia e dimensão de esporângios e clamidósporos	34
4.1.3	Avaliação da ontogenia dos esporângios	41
4.1.4	Avaliação da compatibilidade dos isolados, morfologia do anterídio e dimensões do oogônio e oósporo.....	42
4.1.4	Avaliação do crescimento micelial em diferentes temperaturas	45
4.1.6	Teste de patogenicidade dos isolados de <i>Phytophthora</i> sp.....	48
4.2	Caracterização molecular dos isolados.....	49
5.	DISCUSSÃO	51
6.	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS	56

1. INTRODUÇÃO

A pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth var. *gasipaes* Henderson) se destaca em relação a outras espécies produtoras de palmito como o palmito juçara (*Euterpe edulis* Martius) e açai (*Euterpe oleracea* Martius), por sua precocidade no primeiro corte, com a possibilidade de cortes anuais sucessivos, conferindo-lhe características de cultura perene. A espécie apresenta ampla adaptação geográfica, alto perfilhamento e o palmito não sofre escurecimento (oxidação) após o corte (TONET et al., 1999). Tornando-se assim, uma alternativa comercialmente viável na produção do palmito.

Com a expansão das áreas plantadas, a pressão das doenças aumenta, tanto nos viveiros de produção de mudas quanto em áreas de plantio comercial, potencializando os danos causados pela doença. Patógenos como *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler e *Fusarium* spp. vêm se destacando como agentes causais de doenças na pupunheira. (MAFACIOLI et al., 2009).

O gênero *Phytophthora* possui ampla distribuição geográfica, atacando culturas de importância econômica, abrangendo espécies herbáceas, arbustivas e arbóreas e infectando aproximadamente 3.000 espécies de hospedeiros (HARDHAM, 2005). *Phytophthora* causa podridão radicular nos seus hospedeiros, reduzindo-lhes a capacidade de absorção de água e nutrientes. Na parte aérea os sintomas reflexos são amarelecimento das folhas, desfolhamento, morte da extremidade dos ramos e exsudação no tronco.

Dentre as espécies do gênero, *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler, tem se destacado como o oomiceto agente causal da doença conhecida como podridão da base do estipe (PBE). As plantas atacadas pela PBE caracterizam-se pelo amarelecimento da primeira e segunda folha aberta e folha bandeira, seguido por morte da touceira. Quando se realiza o corte transversal na base do estipe observa-se o escurecimento dos tecidos internos, com posterior podridão generalizada. A doença ocorre em plantas jovens e adultas de pupunheira (SANTOS et al., 2004).

A podridão da base do estipe associada à *P. palmivora* (STEIN et al., 1997) já foi relatada em vários estados do Brasil como no Pará (BENCHIMOL et al., 1998), Pernambuco (TAVARES et al., 1998), São Paulo (PIZZINATTO et al., 2002), Tocantins (UESUGI et al., 2003), Goiás (TOMITA et al., 2006), Bahia (PAIM et al.,

2006), Paraná (SANTOS et al., 2004) e Santa Catarina (SANTOS et al., 2007). Sendo estudadas em inúmeros hospedeiros como, mamoeiro, cacauero, seringueira, coqueiro, citros, berinjela, bananeira ornamental, manjeriço, pimenta-do-reino e fruta-do-conde (SANTOS et al., 2014).

A importância da PBE vem aumentando nas regiões brasileiras produtoras de pupunheira (FUZITANI et al., 2013). Apesar de se tratar de um patógeno agressivo e amplamente distribuído, há poucos trabalhos sobre o mesmo na pupunheira, levando-se em consideração que outras espécies do patógeno podem estar associadas à etiologia da doença. Como já foi relatado em acácia-negra por Santos e Luz (2006), onde as espécies *P. nicotianae* e *P. boehmeriae* foram identificadas como agentes da gomose da acácia-negra no Brasil.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi caracterizar isolados de *Phytophthora* sp. oriundos de regiões produtoras de pupunheira visando a sua identificação específica e confirmação de uma ou mais espécies causando a doença.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A pupunheira

A pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth var. *gasipaes* Henderson) é uma palmeira pertencente à família Arecaceae. Tem o seu centro de diversidade na região Amazônica abrangendo países como Honduras, Venezuela, Colômbia, Guianas, Peru, Equador, Bolívia e Brasil (NEVES et al., 2004).

A pupunheira tem se mostrado como uma alternativa para a produção sustentável de palmito por pequenos produtores rurais (RESENDE et al., 2004). Seu cultivo iniciou-se no Brasil por meio de estudos preliminares realizados pelo INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia) em 1976, que buscou incentivar na região Amazônica o plantio de pupunha para produção de palmito (CLEMENT et al., 1987). As características vantajosas observadas para produção de palmito em escala comercial proveniente dessa espécie foram: rápido crescimento, alta qualidade nutricional, baixa taxa de substâncias oxidantes e boa capacidade de perfilhamento (GOMES et al., 1987). Outra característica é a alta produtividade do palmito podendo chegar a 12.000 palmitos.ha⁻¹.ano⁻¹ ou cerca de 1700 kg.ha⁻¹.ano⁻¹, além de subprodutos como palmito fatiado ou em rodela (MORO, 2004).

O interesse por parte dos agricultores no cultivo da planta para produção de palmito deu-se nos anos 1990 nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. A produção brasileira de palmito de pupunha já chegou a números expressivos como em 2009, em que a produção foi de 5.076 toneladas, gerando uma renda de R\$ 7.353.000,00 (IBGE, 2009). Porém nos últimos anos houve uma redução (IBGE, 2011).

O Brasil já foi considerado o maior exportador mundial de palmito, perdendo mercado para Costa Rica e Equador que produzem palmito de pupunha cultivada. Os principais mercados são França, Argentina, EUA e Espanha. Além da lucratividade gerada por esse palmito, mesmo com a produção brasileira diminuída, tem-se a geração de empregos e riqueza (RESENDE et al., 2004).

Embora tenha sido inicialmente divulgado por sua precocidade e rusticidade do cultivo, essas características só se confirmam quando comparados com as espécies tradicionais. Na verdade, seu cultivo perene possui algumas

particularidades que o tornam bastante exigente em propriedades físicas e químicas do solo. Fatores abióticos da produção, como luz, temperatura, água e fertilizantes, devem ser otimizados para que ocorra a maximização da produção e vida útil do cultivo (BOVI, 2000).

Com a expansão do cultivo das palmeiras para palmito, e com ela a escassez de informações técnicas para o manejo adequado, surge a ocorrência de vários problemas fitossanitários em viveiros e plantios definitivos (SANTOS, et al., 2008).

2.2. Podridão da base do estipe

A Podridão da base do estipe, causada pelo oomiceto *Phytophthora palmivora* Butler (Butler) cujos sintomas são o amarelecimento da primeira e segunda folha e da bandeira, e possível morte da planta, tem provocado danos em plantas jovens e adultas, tanto em viveiros como em campos de produção (SANTOS, et al., 2008).

Ao realizar cortes tanto longitudinais como transversais da pupunheira, é possível observar o escurecimento dos tecidos internos e uma podridão generalizada (SANTOS, et al., 2008).

No município de Mogi Mirim (SP), em 2000, foi observada a ocorrência de podridão na base do estipe de pupunheira, com escurecimento dos tecidos internos e amarelecimento de folhas, inicialmente na folha bandeira. Desse material foi obtido um isolado de *Phytophthora*, o qual teve sua patogenicidade testada em pupunheira e sua espécie identificada como *Phytophthora palmivora* (PIZZINATTO, et al., 2002).

No Paraná, o primeiro relato da ocorrência de *Phytophthora palmivora* associada à podridão do estipe da pupunheira foi elaborado por Santos et al., em 2004.

Segundo Benchimol (2001), de modo geral, o melhor método para se controlar doenças provocadas por *Phytophthora* é o preventivo. Por não se tratar de uma doença limitante, práticas culturais na prevenção da podridão da base do estipe da pupunheira são de grande utilidade. Entre elas, controle da irrigação, áreas sem histórico de plantio de culturas hospedeiras do patógeno e utilização de mudas saudáveis.

A identificação correta da podridão da base do estipe facilita a intervenção de medidas de controle do patógeno, resultando assim na minimização ou erradicação do problema.

2.3. O gênero *Phytophthora*

O gênero *Phytophthora* foi estabelecido por Anton de Bary em 1876 quando o mesmo descreveu *Phytophthora infestans* como agente causal da morte de milhares de irlandeses e da imigração de um milhão e meio de indivíduos deste país para a América do Norte, em consequência das devastações que ocorreram nos batatais provocados pelo patógeno (LUZ, et al., 2001).

Esse fato acarretou em perdas econômicas significativas além das consequências sociais implícitas (alta taxa de mortalidade pela fome e de emigração). A doença ficou conhecida como requeima da batata e foi a responsável pelo surgimento da Fitopatologia como ciência. A palavra "*Phytophthora*" vem do latim e significa "devoradora de plantas" (BERGAMIN FILHO et al., 2011).

Segundo a classificação de Alexopoulos et al. (1996) o gênero *Phytophthora* pertence ao Reino Straminopila, Filo Oomycota, Classe Oomycetes, Família Pythiaceae.

Luz e Matsuoka (1996) e Zentmyer (1983) mencionam como principais caracteres do gênero *Phytophthora* as diferentes formas de esporos, incluindo zoósporos móveis, produzidos e diferenciados no interior de esporângios, se apresentando também como forma infectiva do patógeno. Clamidósporos, extremamente importantes na sobrevivência de algumas espécies, e os oósporos, esporos sexuais, formados após união do anterídio (gametângio masculino) com o oogônio (gametângio feminino), importantes nas recombinações genéticas e sobrevivência de algumas espécies.

Os zoósporos são importantes na disseminação do patógeno quando em alta umidade e temperatura ótima e os oósporos são estruturas importantes por serem capazes de permitir a ocorrência de recombinações genéticas e por consequência a formação de híbridos intra e interespecíficos entre indivíduos compatíveis (LUZ; MATSUOKA, 2001).

O gênero contém aproximadamente 117 espécies descritas (KROON et al., 2011), ocupando uma variedade de habitats terrestres e aquáticos. Desde a publicação de Erwin e Ribeiro em 1996, 39 novas espécies de *Phytophthora* foram identificadas (ÉRSEK; RIBEIRO, 2010).

Em 2001, Luz e Matsuoka relataram a ocorrência de 18 espécies de *Phytophthora* no Brasil, ocorrendo em 74 espécies hospedeiras, sendo muitas delas atacadas por mais de uma espécie de *Phytophthora*. Em 2005, esse número foi elevado para 22, com quatro novas espécies relatadas (LUZ, 2006).

Este gênero, em sua maioria é caracterizado pela presença de espécies patogênicas e responsáveis por diversos e severos danos às culturas economicamente importantes no mundo (LUZ et al., 2001).

A razão dessa ampla distribuição é devido ao comércio internacional de plantas vivas e a introdução de material vegetal contaminado nos viveiros (BRASIER, 2008).

Os sintomas causados por esses organismos são: tombamento de mudas pelo apodrecimento de tecidos tenros da base do caulículo, morte de ponteiros e ramos jovens, podridão de raiz, podridão de frutos, cancrios e queima de folhas (AGRIOS, 2005; BERGAMIN FILHO et al., 2011).

Dentre as doenças causadas por espécies do gênero, algumas se destacam no cenário mundial, como a podridão da base do estipe associada à *Phytophthora palmivora* Butler (Butler), não só na pupunha, mas em outras culturas agrícolas e plantas ornamentais.

2.3.3. *Phytophthora palmivora* Butler (Butler)

A espécie *Phytophthora palmivora* foi descrita pela primeira vez como *Pythium palmivorum* por Butler em 1907, e depois mudada para *Phytophthora palmivora* em 1919 (GALLEGLY et al., 2008). Segundo o mesmo autor, há diversas contradições na literatura sobre seu isolamento e se o mesmo foi a partir de coco ou *Areca* spp..

Phytophthora palmivora está classificada no grupo II (STAMPS et al., 1990) e descrita em detalhes pela chave de Waterhouse (1974) e Stamps (1985).

Em 1976, na Inglaterra, foi realizado um seminário internacional, onde os isolados foram subdivididos, de acordo com a forma morfológica, nos grupos MF1, MF2, MF3, e MF4 (Griffin, 1977; Brasier e Griffin, 1979). MF1 foi considerada a forma “típica” denominada *P. palmivora* Butler. MF2, que apresentava esporângios com formas diferentes foi demonstrada por Brasier et al., (1981) que não podia ser aceita como uma espécie válida, devendo ser considerada uma variante de *P. palmivora*. MF3 foi descrito como uma nova espécie, *P. megakarya* Brasier e Griffin, por apresentar núcleos maiores contendo de cinco a seis cromossomos grandes, quando comparados com os nove a 12 cromossomos pequenos de *P. palmivora*. MF4 com esporangióforos mais alongados, caducos e com pedicelos longos, se assemelhava a *P. capsici* e passou a ser assim classificado (ALIZADEH, 1983; CAMPÊLO; LUZ, 1981; ZENTMYER et al., 1981).

Seus esporângios variam de elipsoides a ovoides, papilados, com ontogenia do tipo simpodial. São caducos, com pedicelos curtos, medindo até 5 µm. Com clamidósporos globosos, podem ser terminais ou intercalares. O oósporo pode parrear tanto com grupo de compatibilidade A1, quanto A2, sendo caracterizado por possuir anterídio anfígeno (ERWIN; RIBEIRO, 1996).

A ocorrência desse patógeno no Brasil tem sido registrada em diferentes regiões e em culturas com valor econômico (BENCHIMOL, 2001). *Phytophthora palmivora* é um patógeno que já foi relatado em várias espécies de plantas como cacau (FALEIRO et al., 2004), mamão (CARNAÚBA et al., 2006), urucuzeiro (LOPEZ, 1997), citros (FEICHTENBERER et al., 1997), coqueiro (MARIANO, 1997), na pupunha (SANTOS et al., 2004), entre outras. Além de ocorrer também em vários países (ERWIN; RIBEIRO, 1996).

No Brasil, *P. palmivora* causa danos em culturas economicamente relevantes, destacando-se a podridão de raízes e frutos do mamoeiro, podridão parda do cacau, podridão do pé da pimenta-do-reino, gomose do citrus, além de outras doenças em numerosos outros hospedeiros (SANTOS et al., 2014).

É um patógeno com uma ampla gama de hospedeiros, que infecta várias culturas importantes no Sudeste Asiático. Em citros, este patógeno consegue infectar quase todas as partes da planta em qualquer fase de crescimento (HUNG et al., 2015).

Na pupunheira, *P. palmivora* já foi relatado em São Paulo (PIZZINATTO et al., 2002), Paraná; (SANTOS et al., 2004), Pará (BECHIMOL et al., 1998) e Pernambuco (TAVARES et al., 1998) mas, não tem acarretado em grandes perdas. Entretanto, mostra-se como uma doença em potencial nos locais onde está sendo cultivada comercialmente, sabendo-se das consequências que tem feito em outras culturas.

2.4. Taxonomia e identificação de *Phytophthora*

Por muito tempo a identificação e classificação das espécies do gênero *Phytophthora* eram baseadas somente na taxonomia tradicional utilizando critérios morfológicos como a chave de Waterhouse (1963), a qual foi revisada e ajustada por Stamps et al., em 1990 (KROON et al., 2012). Os autores ainda discutem a classificação feita por Waterhouse, que dividiu o gênero em seis grupos, se baseando em três tipos diferentes de esporângios e dois tipos de anterídio. Subsequente a isso, foram usados para distinguir as espécies, em uma gama de hospedeiros, a morfologia dos esporângios, presença ou ausência de clamidósporos, tumefações nas hifas, morfologia do oogônio e alguns outros critérios.

Além da morfologia, características fisiológicas também foram usadas para distinguir as espécies, como a relação com o crescimento micelial em diferentes temperaturas (STAMPS et al., 1990).

Métodos moleculares se tornaram comum na identificação, fazendo com que os marcadores moleculares fossem combinados com o conjunto de características morfofisiológicas (KROON et al., 2012).

Buscando soluções para problemas encontrados na taxonomia clássica, outros critérios que não eram morfológicos, foram utilizados na classificação do gênero, como padrões de proteínas, padrões de isoenzimas, PCR (*Polymerase Chain Reaction*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (ERWIN; RIBEIRO, 1996).

Lee e Taylor (1992) sequenciaram as regiões conservadas, como aquelas presentes nos nucleotídeos das regiões *ITS1* e *ITS2* (*Internal Transcribed Spacer*) a partir do DNA ribossômico. Eles também foram pioneiros no estudo da taxonomia do

gênero *Phytophthora* pela comparação das sequências dessas regiões de cinco espécies, *P. capsici*, *P. palmivora*, *P. megakarya*, *P. citrophthora* e *P. cinnamomi*.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi estabelecida como uma das técnicas mais importantes para identificação de patógeno, oferecendo mais sensibilidade e especificidade do que os métodos tradicionais (HENSON; FRENCH, 1993). A exploração do sequenciamento do DNA forneceu um grande salto no conhecimento sobre espécies de *Phytophthora*. As sequências de genes específicos ou regiões do DNA idênticos ou quase idênticos, sendo supostamente pertencente à mesma espécie. Se as sequências de DNA da mesma região estão disponíveis para dezenas de espécies, uma filogenia pode ser feita. As espécies podem ser agrupadas em clados, que são um grupo de organismos originados de um único ancestral comum exclusivo (GOSS; GRUNWALD, 2011).

Cooke et al. (2002), também observaram que *Phytophthora* é essencialmente monofilético, com todas as espécies, exceto três, que se agrupavam em oito clados. Destes, dois continham espécies com esporângios sem papila e os outros seis clados continham ou esporângio semi-papilado e papilado, ou semi-papilado e sem papila, ultrapassando os grupos morfológicos tradicionais propostos por Waterhouse em 1963.

A combinação de dados clássicos taxonômicos com a taxonomia derivada de dados moleculares é um tema interessante de estudos (MARTIN; TOOLEY, 2003). Os avanços nos métodos moleculares têm permitido um estudo mais aprofundado das relações filogenéticas dentro do gênero *Phytophthora* (FOSTER et al., 2000).

A validação de novas espécies de *Phytophthora* tem sido apoiada por filogenias geradas pela análise da região *ITS*, do DNA ribossômico, fator de alongação 1- α e β -tubulina e regiões *Cox1* e *Cox2* do DNA mitocondrial (Cooke et al. 2000, Kroon et al. 2004, Martin e Tooley, 2003).

O banco de dados *Phytophthora* database (disponível em <http://www.phytophthoradb.org/>) foi criado para fornecer uma ferramenta para identificação de *Phytophthora* spp. (PARK et al., 2008). Segundo os autores, esta base de dados se tornou um recurso valioso para os pesquisadores de *Phytophthora*, pois inclui mais de 4.650 sequências, de 2.400 isolados, pertencentes a 106 espécies de *Phytophthora* spp. além de incluir sequências das regiões do DNA ribossomal (*ITS*) e mitocondrial (*Cox1* e *Cox2*).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem e preservação dos isolados

Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas, Colombo – PR. Os 31 isolados de *Phytophthora*, usados neste trabalho, são oriundos de regiões produtoras de pupunheira dos estados do Paraná (Morretes e Paranaguá), Santa Catarina (Massaranduba, Joinville e Garuva) e São Paulo (Eldorado, Cajatina e Registro).

Os isolados SP1, SA2, SA3, SA5, SA8, SA9, SA10, SA11, SA12, SA13, SA14, SA15, SA16, SA17, SA18, SA19, SA20 e Matatias pertencem à coleção do Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas e os isolados SA30, SA30-A, SA31, SA31-A, SA32, SA32-A, SA33, SA33-A, SA34, SA34-A, SA35, SA35-A, SA35-B foram obtidos neste estudo, a partir de isolamentos de plantas de pupunheira com sintomas da PBE (TABELA 1).

Para o isolamento de *Phytophthora* coletou-se amostras de tecidos da base do estipe de plantas com sintomas da PBE. O isolamento consistiu na retirada de fragmentos da porção interna do estipe, procedendo-se, então, a desinfestação superficial do material em álcool 70% por 30 segundos, seguido de hipoclorito de sódio 0,5% por 30 segundos e lavagem em água ultrapurificada e esterilizada e remoção do excesso em papel filtro esterilizado. Os fragmentos foram depositados em placas de Petri contendo ágar-água a 2% suplementado com ampicilina 80 ppm e cloranfenicol 40 ppm. As placas de Petri foram incubadas no escuro a 24 °C, por seis dias. Após este período, foram obtidas culturas com hifas cenocíticas, típicas de *Phytophthora*. As colônias foram repicadas para placas de Petri contendo meio V8-ágar (200 mL de suco V8, 4 g de CaCO₃, 18 g de ágar e 800 mL de água ultrapurificada).

Os isolados de *Phytophthora* foram preservados pelo método de Castellani, em vidros de penicilina, e óleo mineral, mantidos a temperatura de 18 °C.

TABELA 1 - ISOLADOS DE *Phytophthora* sp. DE PUPUNHEIRA ORIUNDOS DOS ESTADOS DE SÃO PAULO, PARANÁ E SANTA CATARINA.

Isolado	Estado	Local de Coleta
São Paulo		
SA8		Eldorado
SA13		Eldorado
SA14		Eldorado
SA15		Cajati
SA16		Cajati
SA17		Cajati
SA18		Cajati
SA34		Registro
SA34-A		Registro
SA35		Registro
SA35-A		Registro
SA35-B		Registro
Paraná		
SP1		Morretes
SA2		Paranaguá
SA3		Paranaguá
SA5		Morretes
SA9		Paranaguá
SA12		Paranaguá
SA30		Paranaguá
SA30-A		Paranaguá
SA31		Paranaguá
SA31-A		Paranaguá
SA32		Paranaguá
SA32-A		Paranaguá
Santa Catarina		
SA10		Massaranduba
SA11		Joinville
SA19		Joinville
SA20		Joinville
SA33		Garuva
SA33-A		Garuva
MATATIAS		Garuva

3.2 Caracterização morfológica dos isolados de *Phytophthora* sp.

3.2.1 Características culturais

Para avaliação das características culturais, os isolados foram cultivados em meio V8-ágar a 24 °C, por sete dias, no escuro. A avaliação da descrição do aspecto morfológico de cada colônia foi realizada conforme Erwin e Ribeiro (1996).

3.2.2 Morfologia e dimensão de esporângios e clamidósporos

Para a avaliação da esporulação, os isolados de *Phytophthora* sp. foram cultivados em placas de Petri com meio V8-ágar, sob luz contínua, em condições de laboratório, por sete dias.

Após esse período, discos de meio de cultura (5 mm) com massa micelial esporulante foram retirados com furador de rolhas e tocados em gotas de azul de metileno e lactoglicerol sobre lâminas de vidro, para o deslocamento e a coleta de esporângios. Posteriormente, sob microscópio de luz Zeiss Axio Lab. A1, observou-se a forma dos esporângios; determinou-se a largura e o comprimento do esporângio, a largura e a profundidade da papila e o comprimento do pedicelo. Foram medidos 50 esporângios para cada isolado de *Phytophthora* sp.

Para os clamidósporos, determinou-se o diâmetro, a largura da parede da estrutura e sua disposição, terminal ou intercalar. Foram medidos 50 clamidósporos para cada isolado de *Phytophthora* sp.

3.2.3 Ontogenia dos esporângios

Para observar a ontogenia dos esporângios, dez discos de micélio (5 mm de diâmetro) dos isolados de *Phytophthora* sp. crescidos em V8-ágar, por sete dias, foram transferidos para placas de Petri contendo extrato de solo não-autoclavado. Para obtenção do extrato de solo, utilizou-se a metodologia de RIBEIRO (1978): 50 g de solo foram adicionados em um litro de água em frascos de Erlenmeyer, agitado a suspensão e deixado em repouso por 24 horas. Após, o material foi filtrado duas vezes.

As placas de Petri foram mantidas no ambiente de laboratório, sob luz contínua, por 48 horas. Após esse período, as placas foram levadas ao microscópio Zeiss Axio Lab. A1, para observação da disposição dos esporângios nos esporangióforos.

3.2.4 Morfologia do anterídio e dimensões do oogônio e oósporo

O grupo de compatibilidade foi determinado procedendo-se ao pareamento dos isolados de *Phytophthora* sp. com isolados padrões dos grupos de compatibilidade A1 e A2 obtidos da coleção da Embrapa Florestas, pertencentes à espécie *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan.

Os isolados de *Phytophthora* sp foram cultivados em meio V8-ágar durante sete dias à 24 °C. Após esse período, os isolados de *Phytophthora* sp. foram pareados com os isolados padrões, A1 e A2 de *P. nicotianae*. Para isso, um disco (5 mm de diâmetro) de meio V8-ágar com micélio em crescimento ativo de cada isolado de *Phytophthora* sp. foi retirado e colocado em uma placa de Petri com meio V8-ágar. Do lado oposto outro disco do mesmo diâmetro contendo micélio do isolado padrão foi colocado a uma distância de aproximadamente 3 cm entre eles. As placas de Petri foram envoltas em papel alumínio e acondicionada em câmaras do tipo BOD a 24 °C, por dez dias, em escuro contínuo.

A compatibilidade dos isolados foi avaliada pela presença ou não de oósporos. Observada a presença de oósporo no ponto de contato entre as duas cultura procedeu-se o preparo de lâminas raspando-se a superfície do meio de cultura na região de contato dos isolados, colocando-se o micélio na lâmina com azul de metileno e lactoglicerol.

As lâminas foram observadas em microscópio de luz. As medidas do diâmetro do oogônio e do oósporo foram feitas em cinquenta estruturas escolhidas aleatoriamente para cada isolado.

3.2.5 Avaliação do crescimento micelial de *Phytophthora* sp. em diferentes temperaturas

Discos (5 mm de diâmetro) obtidos de culturas de *Phytophthora* sp. cultivadas em V8-ágar, por sete dias, a 24 °C, foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo meio de cultura V8-ágar. As placas foram mantidas às temperaturas de 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 e 36 °C, em condições de escuro contínuo, por sete dias. Utilizou-se três repetições por cada isolado e o ensaio foi repetido uma vez. As avaliações foram feitas no terceiro, quinto e sétimo dia após a instalação do experimento. As medições ocorreram em dois sentidos diametralmente opostos com o auxílio de um paquímetro digital. O diâmetro da colônia foi expresso pela média aritmética das duas medidas. Para determinar a temperatura ótima de crescimento dos isolados, foi realizada a regressão polinomial com os dados no Excel® e depois calculada a derivada da primeira da regressão.

3.2.6 Teste de patogenicidade dos isolados

O teste de patogenicidade foi realizado para os isolados SA31, SA31-A, SA32, SA32-A, SA33, SA33-1, SA34, SA34-A, SA35, SA35-A e SA35-B, uma vez que os demais isolados já tiveram a sua patogenicidade comprovada (FUZITANI, 2013). As mudas de pupunheira sadias foram obtidas em viveiro comercial, Garuva - SC e encontravam-se com oito meses de idade. As mudas foram mantidas em casa-de-vegetação.

Para a obtenção da suspensão de zoósporos, as culturas de *Phytophthora* sp. foram crescidas em meio V8-ágar, incubadas sob luz contínua durante sete dias. Ao final deste período, 10 mL de água ultrapurificada e esterilizada foi adicionado a cada placa de Petri, sendo estas colocadas em geladeira por trinta minutos. Em seguida, as culturas de *Phytophthora* sp. foram deixadas sobre a bancada em condições de ambiente de laboratório por mais trinta minutos para que houvesse a liberação dos zoósporos. A suspensão obtida em cada placa foi vertida em um copo de Béquer, separando uma amostra para a determinação da concentração de zoósporos em câmara de Neubauer.

A inoculação consistiu na injeção de uma alíquota de 0,1 mL da suspensão de $2,2 \times 10^6$ zoósporos.mL⁻¹ de *Phytophthora* sp., com o auxílio de uma seringa descartável, em uma incisão feita previamente na base do estirpe das mudas de pupunheira. A testemunha consistiu em injetar uma alíquota de 0,1 mL de água ultrapurificada esterilizada.

3.3 Caracterização molecular dos isolados de *Phytophthora* sp.

3.3.1 Processo de extração de DNA

Os isolados foram cultivados em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo meio de cultura líquido de suco-V8 (200 mL de suco V8, 4 g de CaCO₃ e 800 mL de água ultrapurificada) por sete dias à temperatura ambiente (24 °C ± 2 °C), sendo agitados manualmente. Em câmara de fluxo laminar, a massa micelial foi retirada do recipiente, lavada três vezes em água ultrapurificada e esterilizada, e seca em papel filtro esterilizado.

A massa micelial obtida com peso de 40 mg de micélio, foi imediatamente transferida para tubos de Eppendorf de 1,5 mL. Até o material ser utilizado, o mesmo foi conservado no freezer a uma temperatura de -4 °C.

O processo de extração de DNA foi realizado seguindo protocolo para extração de DNA de plantas do kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison, EUA), seguindo as recomendações do fabricante.

A análise do produto da extração do DNA foi realizada em gel de agarose 0,8% (0,40 g de agarose para 50 mL de tampão SB 0,5x).

3.3.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para amplificação das regiões *ITS1* e *ITS2* do DNA ribossomal (rDNA) foram empregados os pares de *primers* ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS6 (5'-GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG-3') (GRÜN WALD, 2013). Para amplificação das regiões *Cox1* e *Cox2* do DNA mitocondrial (mtDNA) utilizou-se os pares de *primers* FMPhy-8b (5'-AAAAGAGAAGGTGTTTTTATGGA-3') e FMPhy-10b (5'-GCAAAAGCACTAAAAAT TAAATATAA-3') (GRÜN WALD, 2013).

A reação de PCR para as regiões *ITS1* e *ITS2* foi executada com volume total de 15 μL , contendo 2 μL do DNA genômico, 6,7 μL de água ultrapurificada, 0,45 μL de MgCl_2 (50mM), 1,5 μL de tampão de PCR (10x), 1,2 μL de dNTP's (2,5 mM), 1,5 μL de cada *primer* e 0,15 μL da Taq DNA polimerase, e volume final de 15 μL . As reações foram conduzidas em um termociclador Applied Biosystems e ocorreram da seguinte maneira: as amostras foram submetidas à temperatura de 94 °C por 3 minutos, os ciclos foram de 1 minutos à 94°C para desnaturação e abertura das fitas de DNA, 1 minuto à 55 °C para o anelamento e 1 minuto à 72 °C para extensão da fita. Após 35 ciclos, as amostras foram submetidas a um período de 10 minutos a 72 °C para sua extensão final.

Para as regiões *Cox1* e *Cox2* a reação de PCR foi executada com volume total de 15 μL , contendo 2 μL do DNA genômico, 5,65 μL de água ultrapurificada, 0,9 μL de MgCl_2 (3 mM), 1,5 μL de tampão de PCR (10x), 1,2 μL de dNTP's (2,5 mM), 1,5 μL de cada *primer* e 0,75 μL da Taq DNA polimerase, e volume final de 15 μL . As reações também foram conduzidas em termociclador Applied Biosystems e ocorreram da seguinte maneira: as amostras foram submetidas à temperatura de 95°C por 3 minutos, os ciclos foram de 1 minuto à 95 °C para desnaturação e abertura das fitas de DNA, 1 minuto à 65,5 °C para o anelamento e 1 minuto à 72 °C para extensão da fita. Após 40 ciclos, as amostras foram submetidas a um período de 5 minutos a 72 °C para sua extensão final.

A análise dos produtos amplificados na PCR foi realizada em gel de agarose a 2% (1 g de agarose para 50 mL de tampão SB 0,5x). Aplicou-se 3 μL de produto da PCR amplificado juntamente à 3 μL de tampão de corrida (loading buffer) procedendo-se a corrida a 200 V. Os fragmentos amplificados foram visualizados em um transluminador.

3.3.3 Reação de sequenciamento

As reações de sequenciamento consistiram de 3 μL do produto de PCR purificado, 0,5 μL de Buffer; 0,5 μL de cada iniciador (*primer*); 0,5 μL do Big-Dye, completando-se para um volume final de 10 μL com água ultra pura. As condições de amplificação utilizadas foram: 96 °C por 1 min, e por 35 ciclos a 96 °C por 10s, 50

°C por 5 s e 60 °C por 4min. As amostras foram sequenciadas em sequenciador Applied Biosystems.

As sequências de rDNA e mtDNA dos isolados foram comparados com sequências de *Phytophthora* disponíveis no *Phytophthora-ID* (<http://phytophthora-id.org/>). Os resultados foram interpretados encontrando semelhanças entre as sequências em análise e as disponíveis no banco de dados para *Phytophthora*.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização morfofisiológica dos isolados de *Phytophthora* sp.

4.1.1 Características culturais

As colônias dos 31 isolados de *Phytophthora* sp. apresentaram micélio aéreo pouco denso. Os isolados apresentaram três padrões de colônia: estrelado, ligeiramente estrelado e cotonoso, sendo o padrão mais frequente o ligeiramente estrelado (TABELA 2, FIGURA 1). A porcentagem de colônias que apresentaram padrão ligeiramente estrelado foi de 93,5%, seguidos por 3,2% do padrão estrelado e 3,2 % do padrão cotonoso.

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS CULTURAIS, FORMA DOS ESPORÂNGIOS E PRESENÇA DE CLAMIDÓSPOROS DOS ISOLADOS DE *Phytophthora* sp. DE PUPUNHEIRA

ISOLADOS	COLÔNIAS		ESPORÂNGIOS
	PADRÃO	MICÉLIO	FORMA
SP1	Ligeiramente estrelado	Aéreo, pouco denso	Maioria elipsoide, presença de ovoide e globoso
SA2	Ligeiramente estrelado	Aéreo, pouco denso	Maioria elipsoide, presença de ovoide
SA3	Ligeiramente estrelado	Aéreo, pouco denso	Maioria elipsoide, presença de ovoide e globoso
SA5	Ligeiramente estrelado	Aéreo, pouco denso	Maioria elipsoide, presença de ovoide e obovoide
SA8	Estrelado	Aéreo, pouco denso	Maioria elipsoide, presença de ovoide
SA9	Ligeiramente estrelado	Aéreo, pouco denso	Maioria elipsoide, presença de ovoide e obovoide
SA10	Ligeiramente estrelado	Aéreo, pouco denso	Maioria elipsoide, ovoide e obovoide
SA11	Ligeiramente estrelado	Aéreo, pouco denso	Maioria elipsoide, presença de ovoide

Continua...

TABELA 3 - CARACTERÍSTICAS CULTURAIS, FORMA DOS ESPORÂNGIOS E PRESENÇA DE CLAMIDÓSPOROS DOS ISOLADOS DE *Phytophthora* sp. DE PUPUNHEIRA

ISOLADOS	COLÔNIAS		ESPORÂNGIOS
	PADRÃO	MICÉLIO	FORMA
SA12	Ligeiramente estrelado	Aéreo, pouco denso	Majoria elipsoide, presença de ovoide
SA13	Ligeiramente estrelado	Aéreo, pouco denso	Majoria elipsoide, presença de ovoide
SA14	Ligeiramente estrelado	Aéreo, pouco denso	Majoria elipsoide, presença de ovoide
SA15	Ligeiramente estrelado	Aéreo, pouco denso	Majoria elipsoide, presença de ovoide
SA16	Ligeiramente estrelado	Aéreo, pouco denso	Majoria elipsoide, presença de ovoide
SA17	Ligeiramente estrelado	Aéreo, pouco denso	Majoria elipsoide, presença de ovoide
SA18	Ligeiramente estrelado	Aéreo, pouco denso	Majoria elipsoide, presença de ovoide
SA19	Ligeiramente estrelado	Aéreo, pouco denso	Majoria elipsoide, presença de ovoide
SA20	Ligeiramente estrelado	Aéreo, pouco denso	Majoria elipsoide, presença de ovoide, globoso e obturbinado
SA30	Ligeiramente estrelado	Aéreo, pouco denso	Majoria ovoide, presença de elipsoide
SA30-A	Ligeiramente estrelado	Aéreo, pouco denso	Majoria elipsoide, presença de ovoide e globoso
SA31	Ligeiramente estrelado	Aéreo, pouco denso	Majoria ovoide, presença de elipsoide
SA31-A	Ligeiramente estrelado	Aéreo, pouco denso	Majoria elipsoide, presença de ovoide e globoso
SA32	Ligeiramente estrelado	Aéreo, pouco denso	Majoria ovoide, presença de elipsoide
SA32-A	Ligeiramente estrelado	Aéreo, pouco denso	Majoria elipsoide, presença de ovoide

Continua...

TABELA 4 - CARACTERÍSTICAS CULTURAIS, FORMA DOS ESPORÂNGIOS E PRESENÇA DE CLAMIDÓSPOROS DOS ISOLADOS DE *Phytophthora* sp. DE PUPUNHEIRA

ISOLADOS	COLÔNIAS		Conclusão
	PADRÃO	MICÉLIO	ESPORÂNGIOS FORMA
SA33	Ligeiramente estrelado	Aéreo, pouco denso	Maioria elipsoide, presença de ovoide e globoso
SA33-A	Ligeiramente estrelado	Aéreo, pouco denso	Maioria elipsoide, presença de ovoide, globoso e limoniforme
SA34	Ligeiramente estrelado	Aéreo, pouco denso	Maioria ovoide, presença de elipsoide e globoso
SA34-A	Ligeiramente estrelado	Aéreo, pouco denso	Maioria elipsoide, presença de ovoide
SA35	Ligeiramente estrelado	Aéreo, pouco denso	Maioria elipsoide, presença de ovoide
SA35-A	Ligeiramente estrelado	Aéreo, pouco denso	Maioria elipsoide, presença de ovoide
SA35-B	Ligeiramente estrelado	Aéreo, pouco denso	Maioria elipsoide, presença de ovoide e globoso
MATATIAS	Cotonoso	Aéreo, denso	Maioria ovoide, presença de elipsoide

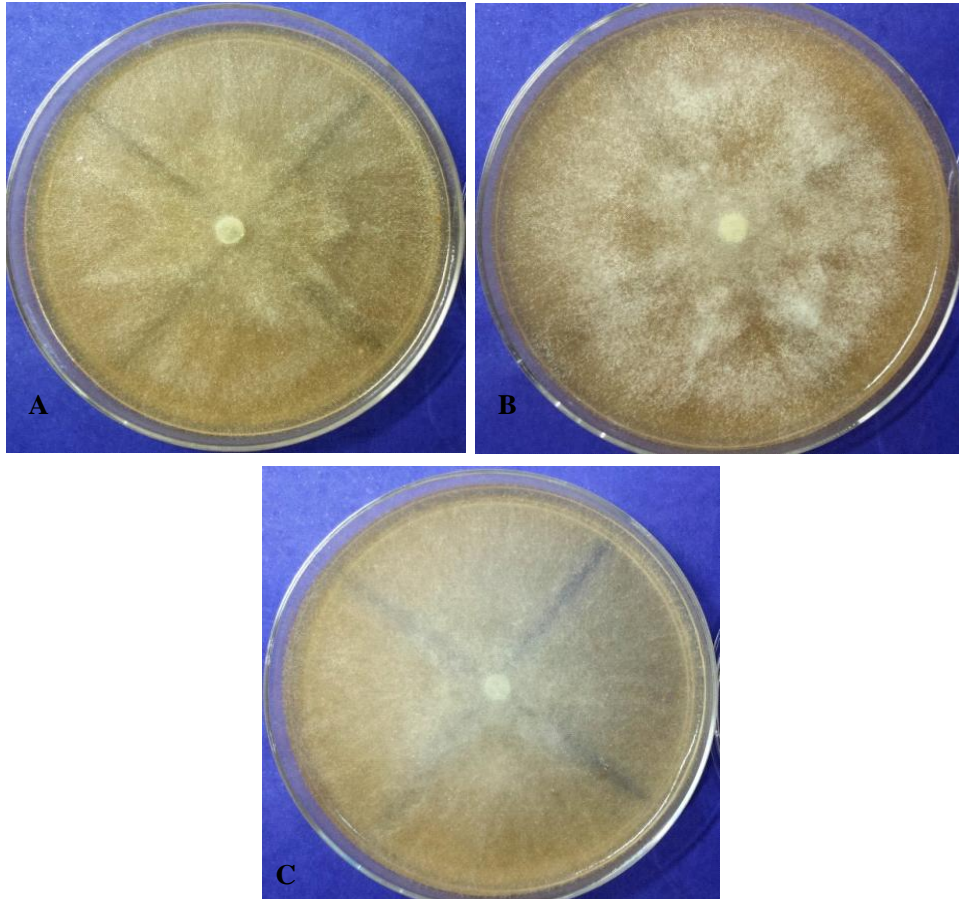


FIGURA 1 - MORFOLOGIA DAS CULTURAS DE *Phytophthora* sp. DE PUPUNHEIRA A 24 °C COM SETE DIAS DE CULTIVO EM MEIO DE CULTURA V8-ÁGAR: A – ESTRELADO (ISOLADO SP1), B – LIGEIRAMENTE ESTRELADO (ISOLADO SA8) E C – COTONOSO (ISOLADO MATATIAS).

4.1.2 Morfologia e dimensão de esporângios e clamidósporos

O micélio dos isolados de *Phytophthora* sp. de pupunheira apresentou-se hialino com hifas cenocíticas. Todos os isolados avaliados apresentaram produção abundante de esporângios caducos e papilados (TABELA 2).

Os isolados produziram esporângios predominantemente elipsoides, embora outras formas estivessem presentes como ovoides, globosos, limoniformes, obturbinados e formas distorcidas (FIGURA 2). As medidas dos esporângios (TABELA 3) referentes ao comprimento (C) variaram de 21,1 - 84,8 μm e largura (L) de 17,4 - 41,7 μm , com média de 26,1 x 41,0 μm e a relação C/L variou de 1,3 a 1,9. As medidas da papila, profundidade (P) e largura (L), variaram de 11,4 x 11,2 μm até 0,5 x 0,9 μm com média de 4,2 x 5,1 μm e a relação P/L de 0,4 a 1,3. O pedicelo variou de um comprimento (C) de 0,4 a 6,6 μm com média de 1,5 μm .

Todos os isolados de *Phytophthora* sp. formaram clamidósporos. Os clamidósporos foram globosos, terminais ou intercalares com diâmetro variando de 20,0 - 53,6 μm com uma média de 23,3 μm e espessura de parede variando de 0,3 - 4,4 μm com uma média de 1,59 μm (FIGURA 3).

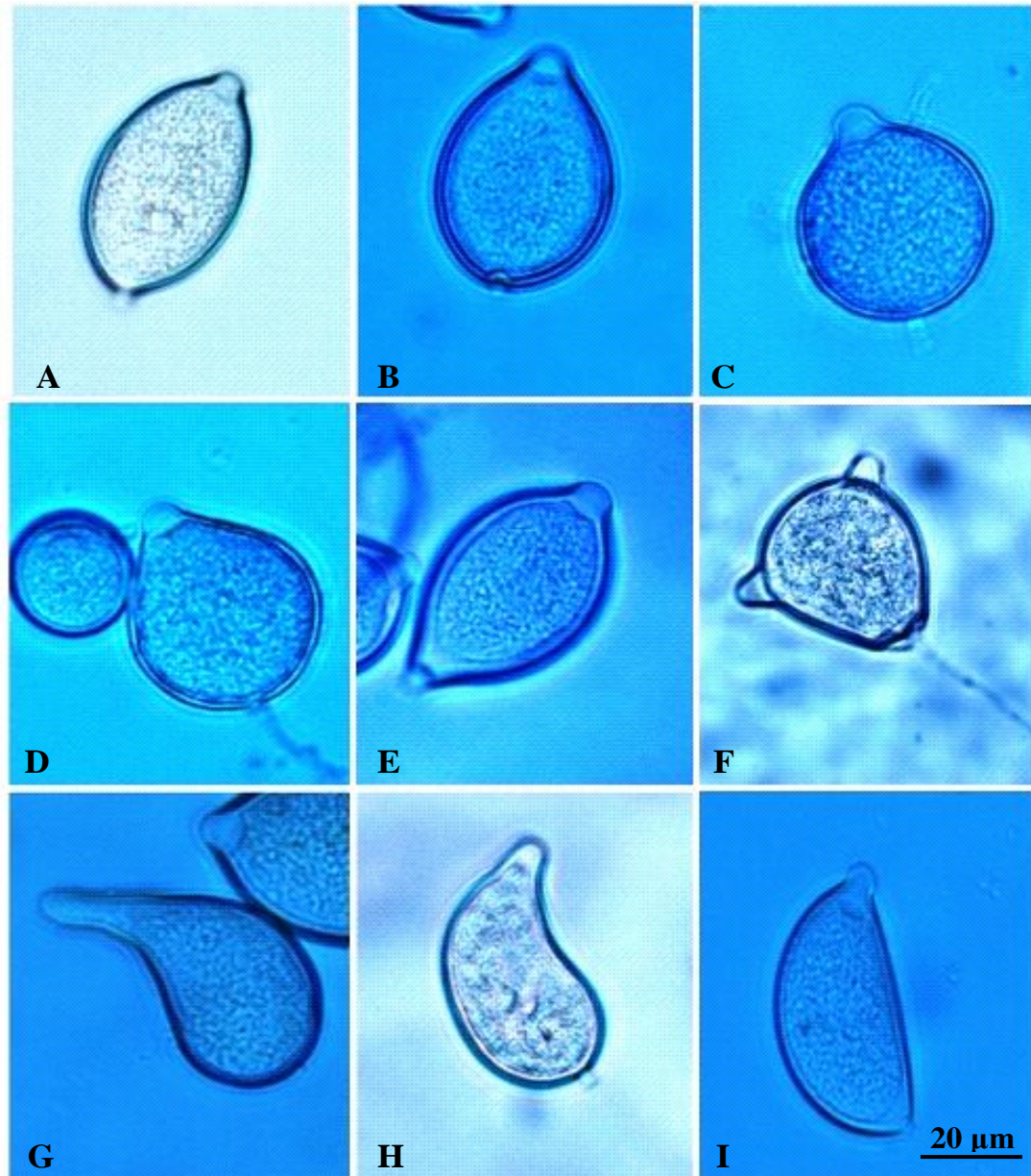


FIGURA 2 - FORMAS DOS ESPORÂNGIOS DOS ISOLADOS DE *Phytophthora* sp. DE PUPUNHEIRA, (A) ELIPSOIDE, (B) OVOIDE, (C) GLOBOSO, (D) OBTURBINADO COM PRESENÇA DE CLAMIDÓSPORO, (E) LIMONIFORME, (F) BIPAPILADO E (G, H, I) FORMAS DISTORCIDAS.

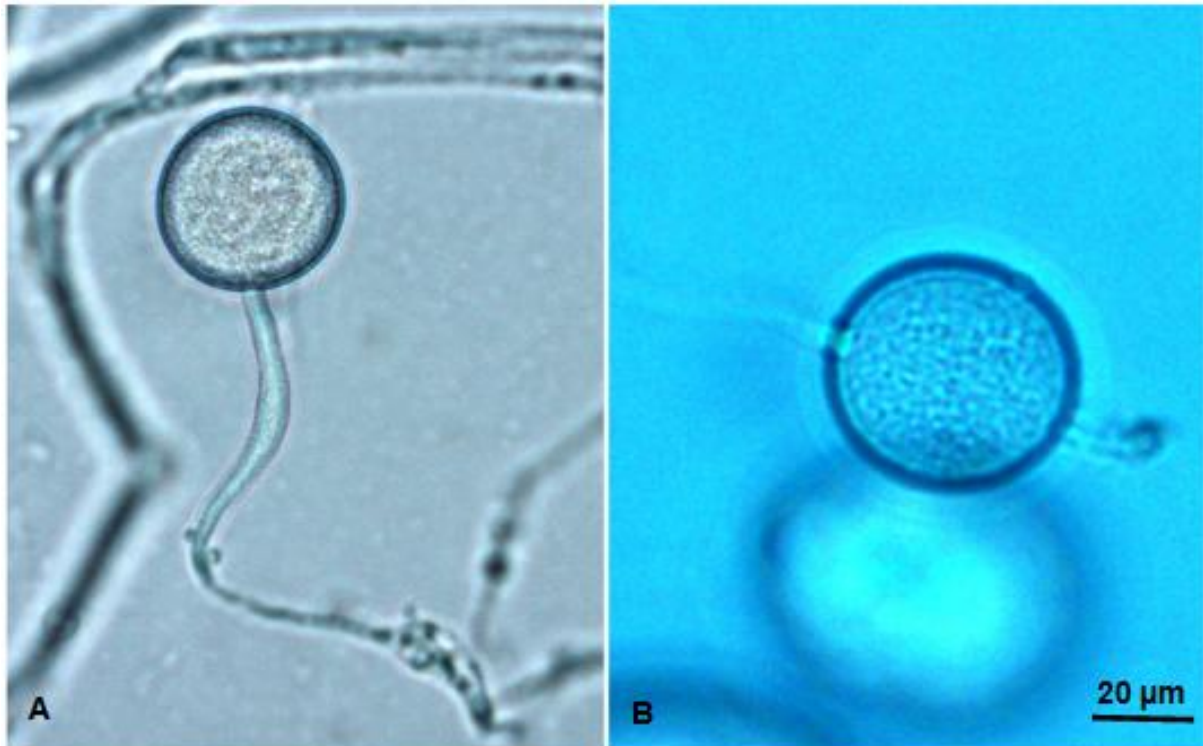


FIGURA 3 - CLAMIDÓSPOROS DOS ISOLADOS DE *Phytophthora* sp. DE PUPUNHEIRA, (A) TERMINAL E (B) INTERCALAR.

TABELA 5 - DIMENSÕES DOS ESPORÂNGIOS, PÁPILA, PEDICÉLO E CLAMIDÓSPOROS DOS ISOLADOS DE *Phytophthora* sp. DE PUPUNHEIRA .

ISOLADO	ESPORÂNGIO (µm)								
	PÁPILA (µm)			PEDICÉLO (µm)			CLAMIDÓSPORO (µm)		
	COMPRIMENTO (C)	LARGURA (L)	C/L	PROFUNDIDADE (P)	LARGURA (L)	P/L	COMPRIMENTO	DIÂMETRO	ESPESSURA DE PAREDE
SP1	84,8 ^a -59,0 ^b -40,8 ^c (±9,23) ^d	41,7-34,9-27,1 (±2,90)	1,7	11,2-7,3-2,8 (±2,10)	11,4-7,9-4,8 (±1,33)	0,9	5,7-3,9-1,6 (±1,22)	53,6-35,7-27,1 (±5,20)	4,4-2,4-0,8 (±0,81)
SA2	55,9-42,1-24,8 (±6,33)	30,2-24,8-18,7 (±2,89)	1,7	6,9-5,1-2,7 (±1,01)	8,3-6,1-0,5 (±1,19)	0,8	4,7-2,7-0,9 (±0,92)	34,8-27,8-24,3 (±2,35)	2,7-1,7-0,6 (±0,52)
SA3	59,5-45,3-29,7 (±7,68)	25,3-23,9-19,1 (±2,05)	1,9	7,3-4,3-1,2 (±1,33)	7,8-5,5-3,2 (±1,00)	0,8	5,7-3,2-0,9 (±0,98)	35,2-28,5-24,9 (±2,49)	4,2-1,95-0,8 (±0,76)
SA5	69,5-45,8-24,1 (±9,35)	33,3-25,5-20,8 (±2,66)	1,8	9,1-5,6-2,7 (±1,37)	8,5-6,0-4,2 (±0,89)	0,9	5,7-3,1-1,5 (±1,03)	40,5-29,6-25,3 (±4,19)	2,4-1,5-0,9 (±0,38)
SA8	46,5-32,2-22,8 (±4,64)	29,4-24,0-18,9 (±2,64)	1,3	6,3-3,5-0,9 (±0,95)	7,2-5,6-4,0 (±0,87)	0,6	5,1-2,9-1,2 (±0,93)	32,1-27,7-25,1 (±2,04)	3,0-1,7-0,9 (±0,49)
SA9	47,2-36,0-25,9 (±4,24)	36,7-26,2-20,7 (±2,44)	1,4	5,8-4,2-2,1 (±0,83)	8,2-6,6-4,5 (±0,91)	0,6	5,0-2,8-0,9 (±0,95)	30,41-26,8-24,1 (±1,72)	2,7-1,7-0,6 (±0,50)
SA10	54,8-37,3-27,5 (±6,06)	32,6-25,5-21,0 (±2,50)	1,5	6,0-4,4-2,4 (±0,88)	8,1-6,0-4,1 (±0,82)	0,7	4,8-2,5-1,2 (±0,77)	28,0-25,3-23,2 (±1,6)	2,7-1,4-0,6 (±0,59)
SA11	56,3-43,5-30,1 (±5,97)	34,4-26,9-21,3 (±2,75)	1,6	9,1-5,0-2,1 (±1,38)	8,4-6,3-4,3 (±0,89)	0,8	5,5-2,9-1,2 (± 1,2)	30,4-26,3-22,53 (±2,34)	3,3-1,8-0,9 (±0,57)
SA12	55,9-38,3-24,2 (±7,17)	34,0-24,7-18,5 (±3,02)	1,6	7,3-5,1-3,0 (±1,12)	7,7-6,0-4,3 (±0,82)	0,9	5,5-3,0-0,6 (±1,23)	30,5-24,6-20,2 (±2,54)	3,6-1,8-0,4 (±0,63)
SA13	55,6-38,0-23,1 (±6,45)	31,8-24,9-17,4 (±2,88)	1,5	10,0-5,2-2,3 (±1,61)	8,7-6,0-4,4 (±0,82)	0,9	5,7-2,6-1,1 (±1,35)	27,3-23,8-20,4 (±1,77)	2,4-1,4-0,3 (±0,52)

Continua...

TABELA 3 - DIMENSÕES DOS ESPORÂNGIOS, PAPILA, PEDICELO E CLAMIDÓSPOROS DOS ISOLADOS DE *Phytophthora* sp. DE PUPUNHEIRA .
 Continuação

ISOLADO	ESPORÂNGIO (µm)								
	PAPILA (µm)			PEDICELO (µm)			CLAMIDÓSPORO (µm)		
	COMPRIMENTO (C)	LARGURA (L)	C/L	PROFUNDIDADE (P)	LARGURA (L)	P/L	COMPRIMENTO	DIÂMETRO	ESPESSURA DE PAREDE
SA14	52,8-40,4-30,2 (±5,05)	31,6-26,4-21,2 (±2,46)	1,5	7,8-4,6-3,0 (±0,85)	9,0-6,2-3,3 (±0,88)	0,7	5,1-2,4-0,9 (±0,90)	37,3-24,4-20,4 (±3,44)	3,0-1,8-0,6 (±0,57)
SA15	53,3-40,4-30,9 (±6,22)	30,1-25,2-21,5 (±2,28)	1,6	7,8-4,7-2,1 (±1,28)	7,8-6,2-4,2 (±0,75)	0,8	5,9-2,7-0,6 (±1,04)	30,2-25,1-21,3 (±2,62)	2,8-1,6-0,6 (±0,51)
SA16	56,4-40,2-30,2 (±6,38)	30,6-26,0-20,6 (±2,18)	1,5	7,0-5,1-2,1 (±1,17)	8,5-6,4-4,4 (±0,70)	0,8	4,6-2,5-0,7 (±0,95)	27,6-24,5-22,2 (±1,76)	3,0-1,6-0,9 (±0,54)
SA17	58,7-47,2-32,5 (±5,65)	33,9-29,3-22,9 (±2,49)	1,6	11,7-6,0-3,2 (±1,43)	9,1-7,1- 5,3 (±0,86)	0,8	5,2-3,6-1,3 (±1,10)	33,3-26,2-21,7 (±3,13)	3,6-1,7-0,6 (±0,52)
SA18	51,6-40,5-27,9 (±6,17)	30,3-26,1-19,7 (±2,46)	1,6	7,7-5,1-3,3 (±1,09)	7,9-6,1-3,9 (±0,78)	0,8	5,1-2,6-0,6 (±1,25)	30,1-25,2-20,7 (±2,13)	3,3-1,5-0,6 (±0,58)
SA19	53,0-40,4-28,5 (±5,45)	30,7-25,5-18,5 (±2,29)	1,6	6,6-5,0-2,1 (±0,95)	8,7-6,6-4,8 (±0,88)	0,7	6,4-3,1-1,3 (±1,12)	29,7-25,2-20,7 (±2,40)	3,0-1,4-0,2 (±0,53)
SA20	73,3-45,5-29,6 (±9,18)	35,1-27,5-22,7 (±2,94)	1,7	7,2-5,1-3,0 (±0,86)	7,8-6,3-3,8 (±0,94)	0,8	5,4-2,5-0,9 (±0,83)	34,6-25,9-20,5 (±2,97)	3,1-1,5-0,6 (±0,50)
SA30	51,8-39,8-26,6 (±5,41)	28,8-24,6-19,5 (±2,16)	1,6	7,2-5,5-3,3 (±1,05)	8,3-6,4-4,4 (±0,90)	0,9	6,1-2,6-0,8 (±1,21)	27,6-23,7-20,4 (±2,08)	3,3-1,5-0,3 (±0,54)
SA30-A	59,0-42,4-28,6 (±6,28)	30,1-24,5-18,8 (±2,25)	1,7	7,2-5,1-3,0 (±1,04)	8,2-6,4-4,6 (±0,76)	0,8	5,9-3,2-0,6 (±1,14)	31,3-24,5-20,1 (±2,45)	2,7-1,6-0,6 (±0,50)
SA31	60,2-39,9-25,5 (±6,28)	31,2-25,2-20,5 (±2,58)	1,6	5,4-2,7-1,0 (±1,00)	8,7-6,1-3,6 (±0,94)	0,5	5,4-2,7-1,0 (±1,00)	29,1-24,6-20,2 (±2,38)	2,7-1,5-0,3 (±0,49)

Continua...

TABELA 3 - DIMENSÕES DOS ESPORÂNGIOS, PÁPILA, PEDICELO E CLAMIDÓSPOROS DOS ISOLADOS DE *Phytophthora* sp. DE PUPUNHEIRA .
 Continuação

ISOLADO	ESPORÂNGIO (µm)								
	PÁPILA (µm)			PEDICELO (µm)			CLAMIDÓSPORO (µm)		
	COMPRIMENTO (C)	LARGURA (L)	C/L	PROFUNDIDADE (P)	LARGURA (L)	P/L	COMPRIMENTO	DIÂMETRO	ESPESSURA DE PAREDE
SA31-A	52,5-41,3-25,6 (±5,84)	32,8-27,3-20,1 (±2,42)	1,5	5,4-7,9-3,0 (±1,04)	7,8-6,3-4,9 (±0,66)	1,3	5,4-2,9-0,9 (±1,06)	28,3-22,8-20,1 (±2,18)	2,1-1,2-0,3 (±0,44)
SA32	47,9-36,6-29,2 (±4,29)	31,0-25,5-20,8 (±2,28)	1,4	8,3-4,8-0,9 (±1,34)	8,8-6,2-4,8 (±0,79)	0,8	4,7-2,1-0,4 (±0,78)	28,4-23,8-20,1 (±2,01)	2,4-1,3-0,3 (±0,46)
SA32-A	50,1-38,6-27,7 (±4,79)	30,6-25,4-19,5 (±2,33)	1,5	7,6-5,1-2,9 (±0,98)	8,9-6,3-3,6 (±0,95)	0,8	4,3-2,4-0,9 (±0,76)	28,3-23,8-20,1 (±1,97)	2,1-1,2-0,3 (±0,44)
SA33	45,6-35,2-21,1 (±5,31)	29,5-24,1-19,5 (±2,68)	1,5	7,6-4,7-2,1 (±1,25)	7,5-6,0-4,5 (±0,76)	0,8	4,7-2,8-1,2 (±0,80)	28,9-23,2-20,4 (±2,14)	2,7-1,4-0,4 (±0,54)
SA33-A	80,9-41,1-28,8 (±7,86)	30,6-26,4-19,9 (±2,08)	1,6	8,9-5,8-3,3 (±1,26)	8,4-6,6-4,8 (±0,77)	0,9	4,2-2,5-0,9 (±0,92)	29,5-23,4-20,2 (±2,39)	2,4-1,3-0,6 (±0,48)
SA34	51,7-38,1-26,6 (±4,75)	30,7-25,6-19,8 (±2,62)	1,5	7,2-4,9-2,5 (±0,98)	8,1-5,0-6,3 (±0,73)	1,0	4,7-2,2-0,6 (±0,85)	29,1-23,5-20,4 (±2,31)	2,2-1,3-0,4 (±0,39)
SA34-A	51,0-37,8-27,2 (±5,43)	30,2-24,9-20,1 (±2,68)	1,5	7,1-4,8-2,3 (±0,99)	8,0-6,2-4,5 (±0,83)	0,8	4,8-2,8-0,6 (±0,93)	28,3-23,6-20,6 (±2,24)	2,8-1,5-0,6 (±0,55)
SA35	58,2-43,5-30,5 (±5,97)	33,0-27,0-21,1 (±2,82)	1,6	9,8-6,2-3,0 (±1,52)	8,8-6,6-5,1 (±0,88)	0,9	4,9-2,8-0,8 (±0,92)	31,2-25,9-20,4 (±2,79)	2,4-1,3-0,6 (±0,44)
SA35-A	72,7-41,5-27,7 (±7,54)	34,7-25,6-18,6 (±2,98)	1,6	9,4-5,5-2,7 (±1,51)	9,0-6,5-4,7 (±0,99)	0,8	4,8-2,7-0,9 (±0,82)	28,9-23,6-20,4 (±2,09)	2,4-1,6-0,9 (±0,47)
SA35-B	55,3-42,1-31,2 (±5,50)	33,5-26,4-22,3 (±2,50)	1,6	9,0-5,6-3,3 (±1,24)	7,5-6,5-5,2 (±0,64)	0,9	4,9-2,9-1,7 (±0,81)	28,8-24,5-21,5 (±2,12)	2,4-1,4-0,6 (±0,40)

Continua...

TABELA 3 - DIMENSÕES DOS ESPORÂNGIOS, PAPILA, PEDICELO E CLAMIDÓSPOROS DOS ISOLADOS DE *Phytophthora* sp. DE PUPUNHEIRA .
Conclusão

ISOLADO	ESPORÂNGIO (µm)								
	PAPILA (µm)			PEDICELO (µm)			CLAMIDÓSPORO (µm)		
	COMPRIMENTO (C)	LARGURA (L)	C/L	PROFUNDIDADE (P)	LARGURA (L)	P/L	COMPRIMENTO	DIÂMETRO	ESPESSURA DE PAREDE
MATATIAS	52,2-40,4-30,5 (±7,40)	29,2-25,4-20,7 (±1,83)	1,6	9,2-5,6-3,6 (±1,16)	8,6-6,7-5,1 (±0,83)	0,8	6,6-1,2-2,9 (±1,17)	29,2-24,4-20,0 (±2,61)	2,4-1,5-0,6 (±0,43)

^a Limite superior; ^b Média de 50 estruturas; ^c Limite inferior; ^d Desvio-padrão

4.1.3 Avaliação da ontogenia dos esporângios

A produção de esporângios foi abundante em extrato de solo não-autoclavado sob luz contínua. Observou-se a presença de esporângios papilados, que apresentaram um arranjo simpodial (FIGURA 4).



FIGURA 4 – DISPOSIÇÃO SIMPODIAL DOS ESPORÂNGIOS NOS ESPORANGIÓFOROS.

4.1.4 Avaliação da compatibilidade dos isolados, morfologia do anterídio e dimensões do oogônio e oósporo

Foi comprovado a natureza heterotática de todos os isolados de *Phytophthora* sp. de pupunheira, com presença apenas do tipo A1. Os oósporos apresentaram-se globosos, apleróticos (FIGURA 5), com diâmetro médio de 26,0 x 63,6 μm . Não foram observadas ornamentações nas paredes dos oogônios e todos isolados de *Phytophthora* sp. formaram anterídios anfígenos. Os oogônios apresentaram diâmetro médio de 32,2 x 72,4 μm (TABELA 4).

TABELA 6 - GRUPO DE COMPATIBILIDADE, DIMENSÕES DE OOGÔNIO E OÓSPORO DE ISOLADOS DE *Phytophthora* sp. DE PUPUNHEIRA.

ISOLADOS	DIÂMETRO	
	OOGÔNIO (μm)	OÓSPORO (μm)
SP1	64,9 ^a -49,6 ^b -43,2 ^c ($\pm 4,29$) ^d	54,0 ^a -41,7 ^b -32,3 ^c ($\pm 4,28$) ^d
SA2	65,0-54,5-40,6 ($\pm 5,43$)	59,3-46,4-32,3 ($\pm 5,88$)
SA3	64,8-50,4-39,2 ($\pm 5,39$)	58,8-42,9-31,3 ($\pm 5,76$)
SA5	65,4-51,5-42,0 ($\pm 6,01$)	56,7-42,9-31,4 ($\pm 5,59$)
SA8	63,0-50,1-42,0 ($\pm 5,71$)	53,9-40,4-31,4 ($\pm 5,58$)
SA9	63,6-51,9-42,1 ($\pm 5,69$)	53,9-43,1-35,4 ($\pm 5,36$)
SA10	69,6-51,7-40,6 ($\pm 4,66$)	56,6-43,4-34,0 ($\pm 4,36$)
SA11	66,2-54,0-39,5 ($\pm 6,54$)	56,5-44,7-32,0 ($\pm 5,96$)
SA12	57,6-46,1-40,8 ($\pm 3,37$)	50,1-38,4-29,6 ($\pm 4,14$)
SA13	63,0-47,4-36,4 ($\pm 6,04$)	52,3-38,4-26,0 ($\pm 5,85$)
SA14	66,5-52,1-32,2 ($\pm 7,99$)	54,7-42,4-26,9 ($\pm 7,39$)

Continua...

TABELA 7 - GRUPO DE COMPATIBILIDADE, DIMENSÕES DE OOGÔNIO E OÓSPORO DE ISOLADOS DE *Phytophthora* sp. DE PUPUNHEIRA.

Continuação

ISOLADOS	DIÂMETRO	
	OOGÔNIO (µm)	OÓSPORO (µm)
SA15	69,7-52,0-37,7 (±8,20)	60,0-43,8-28,2 (±7,87)
SA16	64,4-51,2-39,4 (±7,07)	54,7-42,8-31,4 (±6,39)
SA17	66,1-48,0-38,5 (±5,34)	54,0-40,2-3,80 (±6,69)
SA18	61,8-52,1-39,0 (±4,97)	52,1-43,3-33,6 (±4,47)
SA19	64,5-51,0-40,5 (±5,45)	54,6-42,7-32,1 (±4,84)
SA20	67,1-57,9-40,8 (±4,75)	60,5-50,7-36,3 (±4,61)
SA30	64,6-51,3-41,4 (±5,61)	55,2-44,0-33,1 (±4,98)
SA30-A	66,1-54,4-39,3 (±6,28)	54,5-46,3-34,4 (±5,50)
SA31	66,1-54,9-34,8 (±6,90)	54,5-46,0-34,0 (±4,87)
SA31-A	67,0-57,3-42,7 (±6,08)	57,7-48,9-37,1 (±5,34)
SA32	66,5-55,4-41,0 (±6,12)	59,3-47,3-38,1 (±4,82)
SA32-A	71,5-53,0-38,1 (±6,69)	60,5-46,4-31,4 (±5,63)
SA33	64,7-56,1-39,1 (±5,86)	55,7-48,4-33,6 (±5,14)
SA33-A	68,1-56,1-39,1 (±7,67)	59,1-45,4-35,2 (±6,50)
SA34	65,4-50,9-34,8 (±5,56)	54,0-43,2-35,2 (±3,86)
SA34-A	65,3-55,6-41,0 (±6,95)	58,1-47,3-35,4 (±5,60)
SA35	65,1-50,3-37,4 (±8,02)	56,6-43,0-29,6 (±7,17)

Continua...

TABELA 8 - GRUPO DE COMPATIBILIDADE, DIMENSÕES DE OOGÔNIO E OÓSPORO DE ISOLADOS DE *Phytophthora* sp. DE PUPUNHEIRA.

Conclusão

ISOLADOS	DIÂMETRO	
	OOGÔNIO (μm)	OÓSPORO (μm)
SA35-A	67,9-56,5-41,4 ($\pm 8,22$)	61,7-49,1-32,9 ($\pm 7,62$)
SA35-B	72,4-58,7-39,5 ($\pm 8,43$)	61,7-49,8-33,8 ($\pm 6,68$)
MATATIAS	70,7-54,1-39,6 ($\pm 7,40$)	63,6-47,4-34,0 ($\pm 7,11$)

^a Limite superior; ^b Média de 50 estruturas; ^c Limite inferior; ^d Desvio padrão

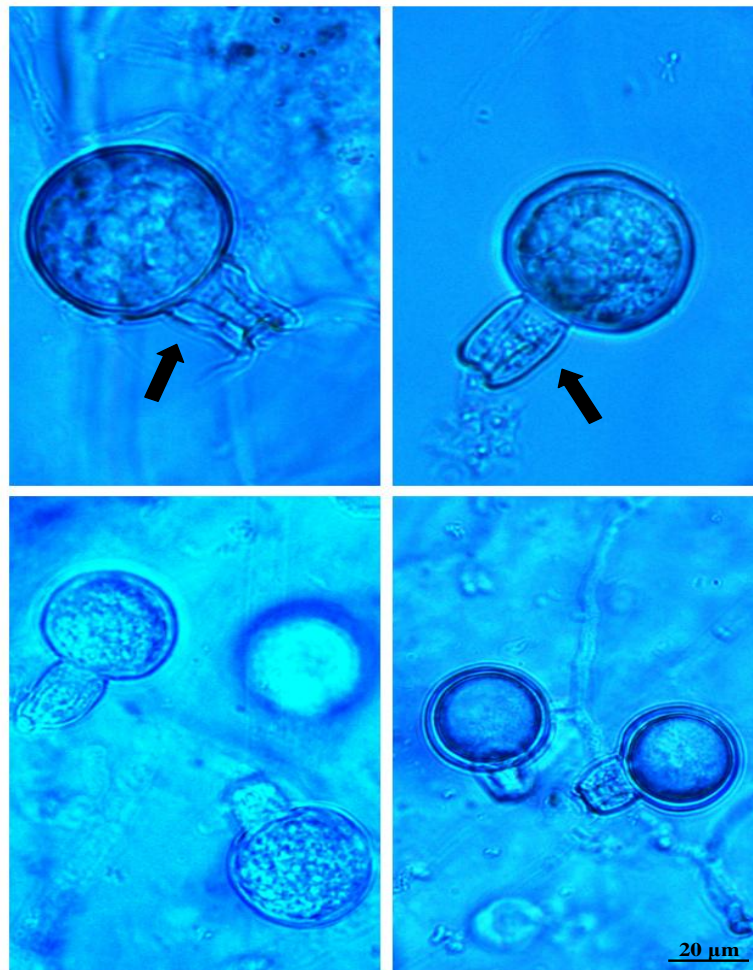


FIGURA 5 - OÓSPOROS DE ISOLADOS DE *Phytophthora* sp. DE PUPUNHEIRA, APLERÓTICOS COM DESTAQUE PARA O ANTERÍDIO ANFÍGENO (SETAS).

4.1.4 Avaliação do crescimento micelial de *Phytophthora* sp. em diferentes temperaturas

Houve variação no crescimento micelial entre os isolados de *Phytophthora* sp. (FIGURA 6). Não houve crescimento micelial a 8 e 36 °C. A temperatura ótima determinada dos isolados encontra-se entre 23,4 e 24,0 °C, sendo a média de 23,7 °C.

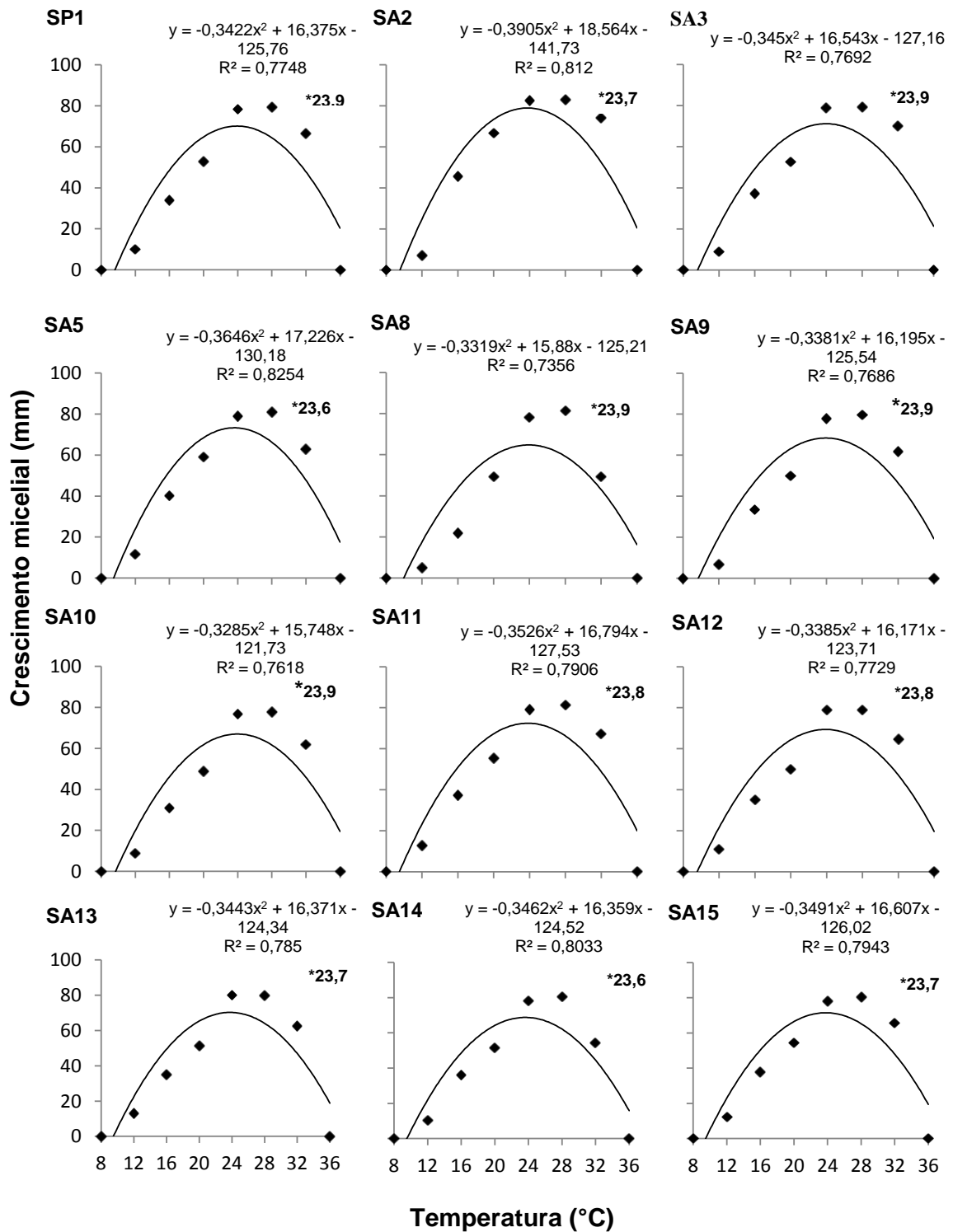


FIGURA 6 - - CURVAS DE CRESCIMENTO MICELIAL (MM) DE ISOLADOS DE *Phytophthora* sp. DE PUPUNHA, EM OITO TEMPERATURAS DIFERENTES. NÚMEROS SEGUIDOS POR (*) REPRESENTAM A TEMPERATURA ÓTIMA.

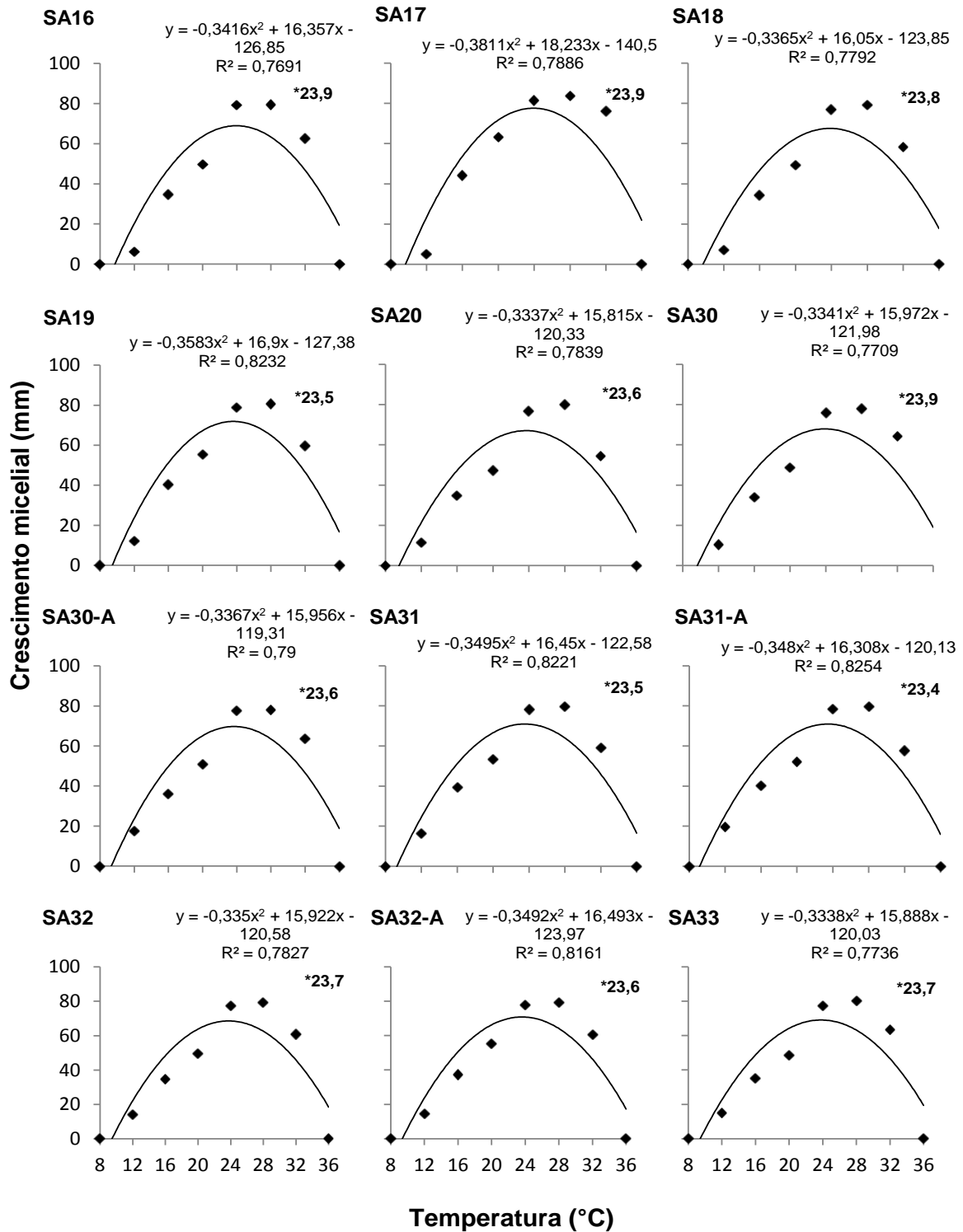


FIGURA 6 - CURVAS DE CRESCIMENTO MICELIAL (mm) DE ISOLADOS DE *Phytophthora* sp. DE PUPUNHA, EM OITO TEMPERATURAS DIFERENTES. NÚMEROS SEGUIDOS POR (*) REPRESENTAM A TEMPERATURA ÓTIMA.

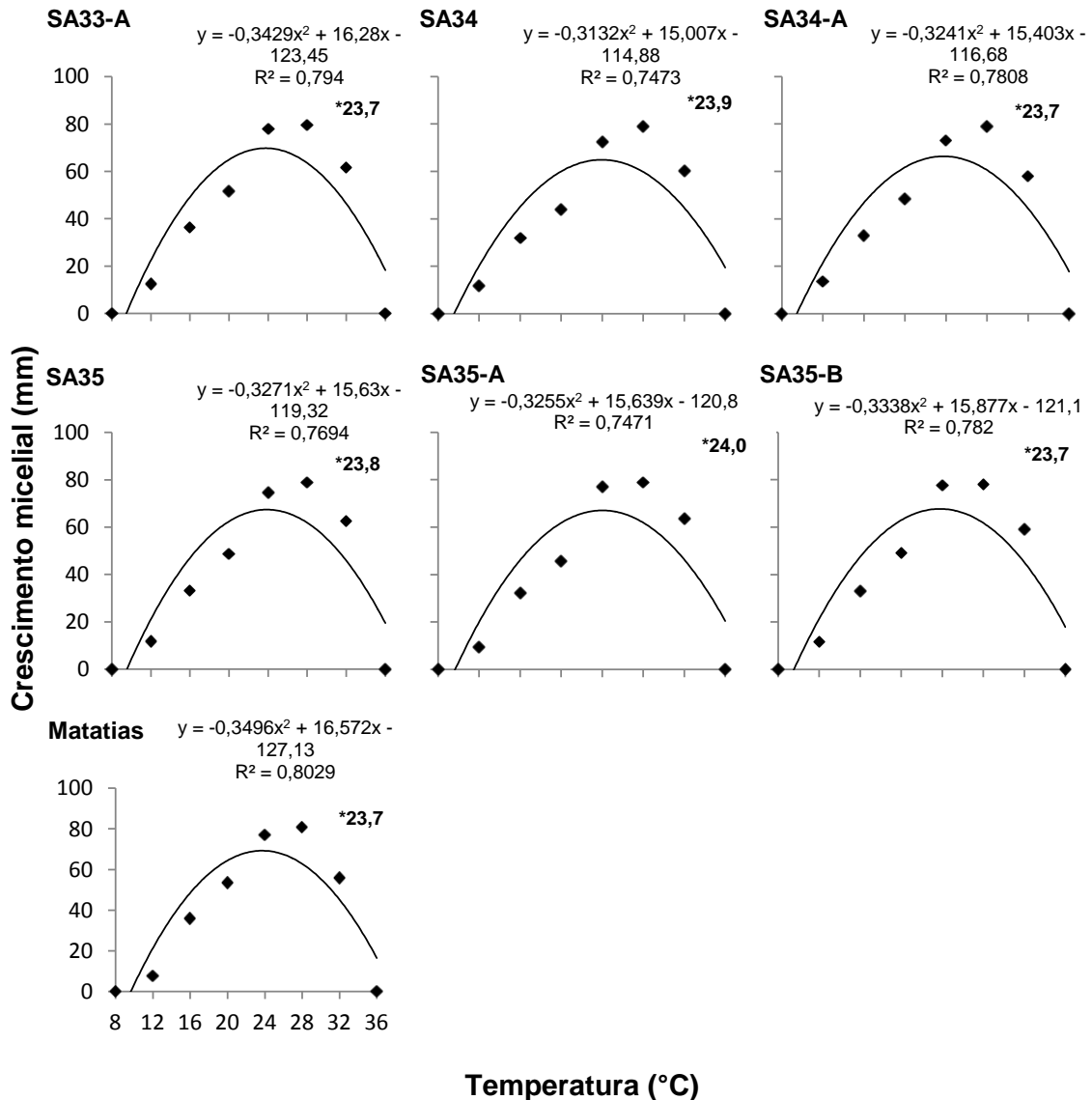


FIGURA 6 - CURVAS DE CRESCIMENTO MICELIAL (mm) DE ISOLADOS DE *Phytophthora* sp. DE PUPUNHA, EM OITO TEMPERATURAS DIFERENTES. NÚMEROS SEGUIDOS POR (*) REPRESENTAM A TEMPERATURA ÓTIMA.

4.1.6 Teste de patogenicidade dos isolados de *Phytophthora* sp.

Todos os isolados foram patogênicos à pupunheira. No sétimo dia após a inoculação, observou-se que 96% das mudas exibiam sintomas caracterizados pelo amarelecimento ou murcha da folha bandeira e/ou primeira e segunda folha aberta, sendo que a testemunha permanecia sadia. No décimo quarto dia, observou-se que todas as mudas apresentavam sintomas de murcha e/ou amarelecimento. Ao vigésimo primeiro dia, 67% das mudas foram caracterizadas como mortas (FIGURA 7).



FIGURA 7 - MUDA DE PUPUNHEIRA INOCULADA COM *Phytophthora* sp. (DIREITA) E TESTEMUNHA (ESQUERDA).

4.2 Caracterização molecular dos isolados

Os fragmentos das regiões ITS1 e ITS2 do rDNA e os das regiões *Cox1* e *Cox2* do mtDNA amplificados dos isolados de *Phytophthora* sp. de pupunheira apresentaram 862 a 941 pares de base para os *primers* ITS4 e ITS6 e 450 a 500 pares de base para os *primers* FMPhy-8b e FMPhy-10b, respectivamente.

A comparação das sequências das regiões ITS e COX dos isolados com o banco de dados disponível no *Phytophthora*-ID revelou maior similaridade dos isolados com a espécie *P. palmivora* (TABELA 5). Sendo que a similaridade dos isolados para a região ITS foi de 93 à 100% e para a região COX foi de 92 à 100%.

TABELA 9 - SIMILARIDADE DE ISOLADOS DE *Phytophthora palmivora* DE PUPUNHEIRA, MEDIANTE COMPARAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE DNA DOS GENES ITS E COX DO BANCO DE DADOS PHYTOPHTHORA-ID

Isolado	Espécie	ITS		COX	
		Identidade em relação à referência (%)	Referência no Phytophthora-ID	Identidade em relação à referência (%)	Referência no <i>Phytophthora</i> -ID
SP1	<i>P. palmivora</i>	-	-	96	P10769
SA2	<i>P. palmivora</i>	99	AF266780	99	P10769
SA3	<i>P. palmivora</i>	99	AF266780	100	P10769
SA5	<i>P. palmivora</i>	99	AF266780	97	P10769
SA8	<i>P. palmivora</i>	96	AF266780	99	P10769
SA9	<i>P. palmivora</i>	93	AF266780	100	P10769
SA10	<i>P. palmivora</i>	94	AF266780	99	P10769
SA11	<i>P. palmivora</i>	92	AF266780	98	P10769
SA12	<i>P. palmivora</i>	99	AF266780	95	P10769
SA13	<i>P. palmivora</i>	98	AF266780	94	P10769
SA14	<i>P. palmivora</i>	99	AF266780	99	P10769
SA15	<i>P. palmivora</i>	99	AF266780	92	P10769
SA16	<i>P. palmivora</i>	93	AF266780	-	-
SA17	<i>P. palmivora</i>	99	AF266780	100	P10769
SA18	<i>P. palmivora</i>	99	AF266780	99	P10769
SA19	<i>P. palmivora</i>	99	AF266780	-	-
SA20	<i>P. palmivora</i>	99	AF266780	95	P10769
SA30	<i>P. palmivora</i>	99	AF266780	97	P10769
SA30-A	<i>P. palmivora</i>	99	AF266780	99	P10769
SA31	<i>P. palmivora</i>	99	AF266780	-	-
SA31-A	<i>P. palmivora</i>	99	AF266780	99	P10769
SA32	<i>P. palmivora</i>	100	AF266780	98	P10769
SA32-A	<i>P. palmivora</i>	99	AF266780	96	P10769
SA33	<i>P. palmivora</i>	99	AF266780	99	P10769
SA33-A	<i>P. palmivora</i>	99	AF266780	95	P10769
SA34	<i>P. palmivora</i>	98	AF266780	99	P10769
SA34-A	<i>P. palmivora</i>	99	AF266780	99	P10769
SA35	<i>P. palmivora</i>	99	AF266780	100	P10769
SA35-A	<i>P. palmivora</i>	96	AF266780	-	-
SA35-B	<i>P. palmivora</i>	100	AF266780	93	P10769
MATATIAS	<i>P. palmivora</i>	99	AF266780	98	P10769

5. DISCUSSÃO

Para o melhor de nosso conhecimento, o presente estudo apresenta os dados sobre 31 isolados de *Phytophthora* sp. oriundos de plantios de pupunheira que apresentavam sintomas da podridão da base do estipe (PBE). Os mesmos foram caracterizados com base em suas características morfológicas, fisiológicas e análise molecular das regiões do DNA ribossomal (ITS1 e ITS2) e mitocondrial (*Cox1* e *Cox2*).

Os isolados de *Phytophthora* sp. em estudo apresentaram colônias ligeiramente estreladas, estreladas e cotonosas. Estas variações são comuns nas culturas de *Phytophthora* (ERWIN; RIBEIRO, 1996). Estas características já foram observadas em duas culturas de *P. palmivora* de pupunheira por Santos et al. (2004). Em culturas de *P. palmivora* de outros hospedeiros, alguns autores relatam também estes padrões, como Hung et al. (2015), em citros, na Tailândia, e Türkölmez et al. (2015), em damasco, na Turquia.

Em relação às características morfológicas, os isolados de *Phytophthora* sp. formaram esporângios papilados, caducos, com pedicelos curtos, predominando as formas elipsoide e ovoide. As hifas não apresentaram septo, e todos os isolados produziram clamidósporos globosos terminais ou intercalares. Essas características correspondem ao descrito para a espécie *P. palmivora* (ERWIN; RIBEIRO 1996; GALLEGLY; HONG, 2008). Resultados similares foram encontrados por outros autores em pupunheira (SANTOS et al., 2004; PIZZINATTO et al., 2002), cacauzeiro (PAIM, 2005), mamoeiro (CARNAÚBA et al., 2006), jaca (BORINES et al., 2014), abacateiro (MACHADO et al., 2013), citros (HUNG et al., 2015) e damasco (TÜRKÖLMEZ et al., 2015).

As dimensões dos esporângios de *Phytophthora* provenientes de pupunheira do presente estudo foram em média 26,1 x 41,0 µm. As papilas apresentaram em média 4,2 x 5,19 µm. Os pedicelos por sua vez obtiveram em média 1,5 µm de comprimento. Neste estudo a ontogenia dos esporângios de *Phytophthora* sp. foi do tipo simpodial. O tipo simpodial também foi observado para *P. palmivora* de seringueira por Santos (1991).

Santos et al. (2004), estudando isolados de *P. palmivora* em pupunheira oriundos do estado do Paraná, encontraram dimensões semelhantes ao deste

estudo para esporângios (30,7 x 46,4 μm), além de confirmar outras características como papilas proeminentes (6,4 x 7,9 μm) e ontogenia do tipo simpodial. De acordo com o estudo de Türkölmez et al. (2015), os isolados de *P. palmivora* obtidos a partir de plantas sintomáticas de damasco apresentaram ontogenia do tipo simpodial e dimensões de estruturas que se aproximam deste estudo tanto para esporângios (36,0 x 42,5 μm) como para pedicelo (3 μm).

Estudos realizados por outros autores com *P. palmivora* obtiveram resultados referentes às dimensões dos esporângios semelhantes a este trabalho, como em mamoeiro, no estado de Alagoas (27,5 x 37,6 μm) (CARNAÚBA et al., 2006) e no Pará (38,0 x 46,0 μm) (TRINDADE; POLTRONIERI, 2002). Machado et al. (2013) relatam que em isolados de *P. palmivora* provenientes de abacateiro em Cuba as dimensões encontradas foram próximas ao deste estudo (31,8 x 48,8 μm). Enquanto que, Hung et al. (2015) apresentaram, em citros, dimensões de esporângios com médias entre 33,3 x 53,8 μm .

Observou-se que, todos os isolados de *Phytophthora* sp. deste trabalho formaram clamidósporos globosos e predominantemente terminais. Os clamidósporos apresentaram em média 23,3 μm de diâmetro e 1,5 μm em média de espessura de parede. De acordo com Stamps (1990), as características morfológicas dos clamidósporos podem ser usadas como caráter taxonômico para diferenciar algumas espécies de *Phytophthora*. Enquanto que, Erwin e Ribeiro (1996) afirmam que, a morfologia dos clamidósporos não varia muito entre as espécies de *Phytophthora*, sendo a importância desse caráter na taxonomia, na maioria das vezes, limitada à sua presença ou ausência.

Clamidósporos são produzidos por mais de 32 espécies das 75 descritas de *Phytophthora* (SMITH, 2007). Algumas espécies produzem clamidósporos com maior frequência que outras. Clamidósporos com características similares a deste trabalho foram encontradas em outros trabalhos para *P. palmivora* em pupunheira, no Brasil (SANTOS et al., 2004), em citros, na Tailândia (HUNG et al., 2015) e em damasco, na Turquia (TÜRKÖLMEZ et al., 2015).

Outro aspecto importante para classificação taxonômica de *Phytophthora* é em relação à sua natureza homotática ou heterotática, bem como a posição do anterídio. No presente estudo, todos os isolados de *Phytophthora* sp. de pupunheira apresentaram apenas um dos grupos de compatibilidade, o tipo A1. Os isolados de

Phytophthora sp. deste trabalho produziram oósporos apleróticos, de diâmetro em média 44,5 µm e oogônio 52,7 µm e anterídios anfígenos. Santos e Luz (2004) também observaram a presença de anterídios anfígenos em culturas de *P. palmivora* de pupunheira.

Os isolados de *Phytophthora* deste trabalho não cresceram a 8 e 36 °C. O maior crescimento micelial foi observado entre 20 e 28 °C, sendo a temperatura ótima entre 23,7 e 24 °C. Erwin e Ribeiro (1996) relatam que a temperatura é um fator importante na caracterização de *Phytophthora*, uma vez que cada espécie possui uma temperatura máxima e mínima de crescimento. Dessa forma, esta característica pode auxiliar na separação de espécies morfológicamente semelhantes. Estudos realizados por Santos et al. (2004) no primeiro relato da podridão da base do estipe, causado por *P. palmivora*, apresentaram resultados próximos ao deste estudo, com crescimento micelial entre 24 e 32 °C, não obtendo nenhum crescimento a 35 °C. Pizzinatto et al. (2002) também relataram não haver crescimento micelial dos isolados a 35 °C.

Os isolados de *Phytophthora* sp. foram patogênicos à pupunheira. A patogenicidade de *P. palmivora* à pupunheira foi demonstrada também por Pizzinatto et al. (2002), Alves et al. (2006) e Santos et al. (2004).

Pelas características morfofisiológicas, os 31 isolados de *Phytophthora* sp. deste trabalho enquadram-se no grupo II de Waterhouse (1963), Stamps et al. (1990; 1978), onde se encontra a espécie *P. palmivora* (Butler) Butler já relatada em pupunheira por Santos et al. (2004), Pizzinatto et al. (2002) e Stein et al. (1997).

Neste trabalho, os isolados foram caracterizados molecularmente com base na análise das regiões ITS1 e ITS2, do DNA ribossomal e *Cox1* e *Cox2*, do DNA mitocondrial. Os dados do sequenciamento dessas regiões demonstraram que os isolados provenientes de pupunheira são próximos da espécie *P. palmivora* de acordo com o banco de dados *Phytophthora*-ID. Esse banco de dados abriga informações de diferentes espécies de *Phytophthora*, fornecendo ferramentas para a construção de árvores filogenéticas, gerando padrões de restrição virtuais da espécie de interesse (GRÜNWARD et al., 2011).

As regiões ITS e COX foram recentemente sugeridas como marcadores moleculares (*barcode*) para oomicetos (ROBIDEAU et al., 2011). Os *primers* ITS4 e ITS6 são utilizados para amplificar a região ITS em *Phytophthora* (COOKE et al.

2000). Türkölmez et al. (2015) na caracterização molecular de *P. palmivora* em damasco utilizou os *primers* ITS4 e ITS6 para amplificação da região ITS.

As subunidades dos genes 1 e 2 (*Cox1* e *Cox2*) do citocromo c oxidase são um grupo de genes presentes no DNA mitocondrial de *Phytophthora* (MARTIN et al. 2007). Uma das vantagens de se utilizar esta região na identificação de *Phytophthora*, é que ela pode ser diretamente amplificada a partir de tecido vegetal infectado, eliminando assim a necessidade da extração do DNA da cultura (GRÜNWARD et al., 2011).

6. CONCLUSÃO

Com base nas características morfofisiológicas, esporângios papilados, caducos, pedicelos curtos, oósporos de oogônio aplerótico e anterídio anfígeno, crescimento micelial ótimo entre 23,4 e 24 °C, e características moleculares, utilizando as regiões ITS do DNA ribossomal e COX do DNA mitocondrial, os 31 isolados de pupunheira foram classificados como e *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler;

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5. ed. California: Elsevier Academic Press, 2005. p. 907.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4. ed. New York: John Wiley, 1996.
- ALIZADEH, A. **Comparative morphology and reproductive physiology of *Phytophthora capsici* and *P. palmivora* MF4 from black pepper and other hosts**. Ph. D. Thesis. Riverside: University of California, 1983.
- ALVES, S.A.R.; SANTOS, A.F.; TESSMANN, D.J.; VIDA, J.B. Patogenicidade de isolados de *Fusarium* spp. e *Phytophthora palmivora* associados com a podridão do estipe da pupunheira no Paraná. **Boletim de Pesquisa Florestal**. Colombo, n.52. p.133-140, 2006.
- BENCHIMOL, R.L.; ALBUQUERQUE, F.C.; MULLER, C.H. Podridão da base do estipe da pupunheira causada por *Phytophthora palmivora*. **Fitopatologia brasileira**, v.32, n.2, p.181, 1998.
- BENCHIMOL, R.L.; FERNANDO, C.A.; LUZ, S.P.; DINALDO, R.T.; MULLER, C.H. Podridão do estipe da pupunheira. In: LUZ, E.D.M.N.; SANTOS, A.F.; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J.L. **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Editora Rural, 2001, p.608-628.
- BERGAMIN FILHO, A; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M. Importância das Doenças de Plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**. Volume 1: Princípios e Conceitos. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. p. 19-36.
- 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 Genetic**. Biol. 45 (3), 266-277. 2008.
- BOVI, M.L.A. **O agronegócio palmito de pupunha**. Campinas: Instituto agronômico de Campinas, 2000. (Boletim técnico, 52).
- BORINES, L. M., et al. "Jackfruit decline caused by *Phytophthora palmivora* (Butler)." **Australasian Plant Pathology**, Philippines, v. 43, p.123-129, jul. 2014.

BRASIER, C.M.; GRIFFIN, M.J. Taxonomy of *Phytophthora palmivora* on cocoa. **Mycology Society**, v. 72, p. 297-302, 1979.

BRASIER, C.M., GRIFFIN, M.J., MADDISON, A.C. The cocoa black pod phytophthoras. Cap. 2, p. 18-30. In: Epidemiology of *Phytophthora* on cocoa in Nigeria. **Mycol. Inst. Phytopathol.**, n. 25, p. 188, 1981.

BRASIER, C.M. The biosecurity threat to the UK and global environment from international plant trade. **Plant Pathology**, v. 57, p. 792–808, mai. 2008.

CAIXETA, M. P.; NUNES, W. M. C.; SANTOS, A. F.; TESSMANN, D. J.; VIDA, J. B. Espécies de *Phytophthora* associadas à gomose em pomares de citros no Estado do Paraná, Brasil. **Summa Phytopathologica**, Colombo, v.39, n.4, p.242-247, out. 2013.

CAMPÊLO, A.M.F.L.; LUZ, E.D.M.N. Etiologia da podridão-parda do cacauero nos Estados da Bahia e Espírito Santo, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, n. 3, p. 13 – 21, 1981.

CARNAÚBA, J. P., SOBRAL, M. F., FURTADO, D. C., SILVA, I. O., SILVA, K. M., & AMORIM, E. P. *Phytophthora palmivora*, agente da podridão de raiz e fruto de mamoeiro no estado de Alagoas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, p.134 – 135, 2006.

CLEMENT, C. R.; CHAVEZ F. W. B.; GOMES, J. B. M. Considerações Sobre a Pupunha (*Bactris gasipaes* H. B. K.) como Produtora de Palmito. In: **Anais I Encontro Nacional de Pesquisadores de Palmito**. Curitiba, EMBRAPA – CNPF. 1987 (Documentos, 19).

COOKE, D. E. L. et al. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 30, p. 17-32, 2000.

ERWIN, D.C.; RIBEIRO, O.K. *Phytophthora diseases worldwide*. St. Paul, Minnesota, USA: APS Press. 1996.

ÉRSEK, T.; RIBEIRO, O. Mini review article: an annotated list of new *Phytophthora* species described post 1996. Acta **Phytopathologica et Entomologica Hungarica**, v. 45, p. 251-266, 2010.

FALEIRO, F. G.; LUZ, E. D.M.N; CERQUEIRA, A. O.; ROCHA, C. S.; NETO, A. D.; FLORES, A. B. et al. Caracterização e Diversidade Genética de Isolados de *Phytophthora* spp.do Cacaueiro com Base em Marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Planaltina, v. 29, p. 303-306, ago. 2004.

FEICHTENBERGER, E. Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros. In: LUZ, E. D. M. N.; SANTOS, A. F. dos; MATUSOKA, K.; BEZERRA, J. L. (Eds.). **Doenças Causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Livraria e Editora Rural, 2001. p. 283-342.

FOSTER, H.; CUMMINGS, M.P.; COFFEY, M.D. Phylogenetic relationships of *Phytophthora* species based on ribosomal ITS 1 DNA sequence analysis with an emphasis on waterhouse groups V and VI. **Mycological Research**, Cambridge, n. 104, p. 1055-1061, 2000.

FUZITANI, E.J.; SANTOS, A.F.; MORAES, W.S.; DAMATTO JUNIOR, E.R.; NOMURA, E.S. Eficiência de fosfitos no controle da podridão da base do estipe em mudas de pupunheira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 35, n. 4, p. 1000-1006, dez. 2013.

GALLEGLY, M. E.; HONG, C. *Phytophthora: Identifying Species by Morphology and DNA Fingerprints*. St. Paul, Minnesota: APS Press, 2008.158 p.

GOMES, J. B. M.; MENEZES, J. M. T.; FILHO, P. V. Efeito de níveis de adubação e espaçamento na produção de palmito de pupunheira em solo de baixa fertilidade na região de Ouro Preto D'Oeste – RO. In: **Anais I Encontro Nacional de Pesquisadores de Palmito**. Curitiba, EMBRAPA – CNPF. 1987. (Documentos, 19).

GOODWIN, P.H.; KIRKPATRICK, B.C.; DUNIWAY, J.M. Cloned DNA probes for identification of *Phytophthora parasitica*. **Phytopathology**, California, v.79, p.716-721, fev. 1989.

GRIFFIN, M.J. Cocoa *Phytophthora* Workshop. Rothamsted Exp. Stn. England, v. 23, p. 107-110, 1977.

GRÜNWARD, N. J.; GOSS, A. M. Evolution and population genetics of exotic and re-emerging pathogens: Novel tools and approaches. **Phytopathology**, Oregon, v. 49, p. 249-267, set. 2011.

GRÜNWALD, N. J.; MARTIN, F. N.; LARSEN, M. M.; SULLIVAN, C. M.; PRESS, C. M.; COFFEY, M. D.; HANSEN, E. M.; PARKE, J. L. Phytophthora-ID.org: A sequence-based Phytophthora identification tool. **Plant Disease**, Oregon, v. 95, p. 337-342, mar. 2011.

HARBAOUI, K.; LEE, T.V.D.; VLEESHOUWERS, V.G.A.A.; KHAMMASSY, N.; HARRABI, M.; HAMADA, W. "Characterization of *Phytophthora infestans* Isolates Collected from Potato and Tomato Crops in Tunisia During 2006–2008." **Potato Research**, Tunisia, v. 56.1, p. 11-29, jan. 2013.

HENSON, J.M.; FRENCH, R.C. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p. 81-109, 1993.

HUNG, P.M.; WATTANACHAI, P.; KASEM, S.; POAIM, S. Biological Control of *Phytophthora palmivora* Causing Root Rot of Pomelo Using *Chaetomium* spp. **Mycobiology**, Thailand, v. 43, p. 63-70, jan. 2015.

IBGE. Produção da extração vegetal e da silvicultura 2009. 24. Rio de Janeiro, RJ: IBGE, 2009.

IBGE. Produção da extração vegetal e da silvicultura 2010. 25. Rio de Janeiro, RJ: IBGE, 2011.

KROON, L. P. N. M. et al. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 41, p. 766-782, 2004.

KROON, L. P. N. M.; BROUWER, H.; COCK, A. W. A. M de.; GOVERS, F. 2012. The genus *Phytophthora* anno 2012. **Phytopathology**, Netherlands, v. 102, p. 348-364, dez. 2011.

LOPEZ, A. M. Q. Doenças de anonáceas e do urucuzeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. & REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia**. Volume 2: Doenças das plantas cultivadas. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. pp. 78-84.

LUZ, E.D.M.N.; MATSUOKA, K. Taxionomia e sistemática do gênero *Phytophthora*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas (RAPP)**, Passo Fundo, v.4, p.297-328, 1996.

LUZ, E.D.M.N.; SILVA, S.D.V.M. Podridão-parda dos frutos, cancro e outras doenças causadas por *Phytophthora* no cacaueteiro. In: Luz, E.D.M.N.; Santos, A.F. dos; Matsuoka, K.; Bezerra, J.L. **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**, Campinas, Livraria Rural, 2001, p. 175 – 265.

LUZ, E. D. M. O gênero *Phytophthora* no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, Brasil a, DF, v. 31, supl., p. 80-81, 2006.

MACHADO, M.; PEÑA-MAREY, M.; ALVAREZ, A.; DÍAZ, A.; ZAMORA, V.; COTO, O. Variabilidad intraespecífica de cepas de *Phytophthora palmivora* Butler (Butler) aisladas de plantaciones de aguacatero (*Persea americana* Mill.) en Cuba. **Revista de Protección Vegetal**, Cuba, v. 28(3), p. 178-184, 2013.

MAFACIOLI, R.; TESSMANN, D.J.; SANTOS, A.F.; VIDA, J.B. Caracterização morfofisiológica e patogenicidade de *Colletotrichum gloesporioides* da pupunheira. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 113-117, 2006.

MAFACIOLI, R.; SANTOS, A.F.; TESSMANN, D.J.; VIDA, J.B. Etiologia e Manejo das doenças da Pupunheira no Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n.58, p. 61-68, jun. 2009.

MARTIN, F.N.; TOOLEY, P.W. Phylogenetic relationships among *Phytophthora* species inferred from sequence analysis of the mitochondrially-encoded cytochrome oxidase I and II genes. **Mycologia**, California, n.95, p.269-284, 2003.

MARTIN F.N.; BENSASSON D.; TYLER B.M.; BOORE J.L. Mitochondrial genome sequences and comparative genomics of *Phytophthora ramorum* and *P. sojae*. **Current Genetics**, v. 51, p. 285-296. 2007.

MARTIN, F. N.; ABAD, Z. G.; BALCI, Y.; IVORS, K. Identification and detection of *Phytophthora*: reviewing our progress, identifying our needs. **Plant Disease**, v. 96, p. 1080-1103. 2012.

MILENKOVIĆ, I.; NOWAKOWSKA, J. A.; OSZAKO, T.; MLADENOVIĆ, K.; LUČIĆ, A.; RAKONJAC, L.; KARADZIC, D. Morphological and molecular identification of *Phytophthora* species from maple trees in Serbia. **Genetika**, v. 46, p. 353-368. 2014.

MORO, J. R. A cultura da pupunha par produção de palmito. In: Anais do I Encontro Paranaense sobre Palmitos Cultivados: o agronegócio pupunha e palmeira real. Editor técnico Álvaro Figueiredo dos Santos – Dados eletrônicos. – Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2004.

NEVES, E. J.; SANTOS, A. F.; MARTINS, E. G.; RODIGHERI, H. R.; BELLETTINI, S.; CORRÊA JÚNIOR, C. Manejo de Pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) Para Palmito em Área sem Restrições Hídricas. Colombo, Paraná: **EMBRAPA**, 2004.

PARK, J., PARK, B., VEERARAGHAVAN, N., JUNG, K., LEE, Y.-H., BLAIR, J. E., GEISER, D. M., ISARD, et al. Phytophthora database: a forensic database supporting the identification and monitoring of *Phytophthora*. **Plant Disease**. V. 92, p. 966-972. 2008.

PENTEADO JUNIOR, J. F.; SANTOS, A. F., NEVES E. J. M. Rentabilidade econômica do cultivo da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth), destinada à produção de palmito no Litoral de Santa Catarina. Colombo: Embrapa Florestas, 2010. (**Embrapa Florestas. Documentos, 195**).

PENTEADO JUNIOR, J.F.; SANTOS, A.F.; NEVES, E.J.M. Aspectos do agronegócio do palmito de pupunha no Brasil. Colombo: Embrapa Florestas, 2014. (**Embrapa Florestas. Documentos, 275**).

PARANÁ. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Departamento de Economia Rural. Palmito. 2013. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/modules/qas/uploads/3397/palmito_2013.pdf>. Acesso em: 06 jan. 2016.

PIZZINATTO, M.A.; BOVI, M.L.A.; FEICHTENBERG, E.; SPIERING, S.H. Ocorrência da podridão do estipe em pupunheira, causada por *Phytophthora palmivora*, no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 28, p. 363-365. 2002.

RESENDE, J. M.; FIORI, J. E.; SAGGIN JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M.; BOTREL, N. Processamento do Palmito de Pupunheira em Agroindústria Artesanal - uma atividade rentável e ecológica. Seropédica, Rio de Janeiro: Embrapa Agrobiologia, 2004.

RIBEIRAL, R. Avança consumo de palmito cultivado. Inaceres cultivando saúde, 30 abr. 2011. Disponível em: <http://www.inaceres.com.br/detalhe_noticias.php?recordID=84>. Acesso em: 06 jan. 2016.

RIBEIRO, O.K. **A source book of the genus Phytophthora**. Lehre: J. Cramer, 1978.

ROBIDEAU, G.P.; COCK, A.W.A.M.; COFFEY, M.D. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, p. 1002–1011, 2011.

SACKEY, S.T.; AKROFI, A.Y.; ASANTE APPIAH, A. e OPOKU, I.Y. *Phytophthora* species differentiation by analysis of randomly amplified polymorphic DNAs. In: 12th International Cocoa Research Conference, Salvador, Brazil, 17-23 November 1996, p. 107-112, 1999.

SANTOS, A. F. dos. **Identificação de *Phytophthora* em *Hevea*, histopatologia e resistência do hospedeiro.** Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, MG, 139 p. 1991.

SANTOS, A.F. dos; BEZERRA, J.L.; TESSMANN, D.J.; POLTRONIERI, L.S. Ocorrência de *Curvularia senegalensis* em pupunheira e palmeira real no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 204, 2003.

SANTOS, A.F. dos; LUZ, E.D.M.N.; FIANTO, P.D; TESSMANN, D.J.; VIDA, J.B. Primeiro relato da podridão da base do estipe da pupunheira causado por *Phytophthora palmivora*, no Estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.81-84, 2004.

SANTOS, A. F. dos; LUZ, E. D. M. N.; SOUZA, J.T. *Phytophthora nicotianae*: agente etiológico da gomose da acácia negra no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 81-4, 2005.

SANTOS, A.F. dos; LUZ, E.D.M.N. Doenças emergentes causadas por *Phytophthora* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, suplemento, p. 41-42, 2007.

SANTOS, A.F. dos; TESSMANN, D.J.; VIDA, J.B. Doenças das Palmeiras para palmito. In: SANTOS, A.F.; CORRÊA JÚNIOR, C.; NEVES, E.J.M. **Palmeiras para produção de palmito Juçara, Pupunheira e Palmeira Real.** Colombo: Embrapa Florestas, p. 106-120, 2008.

SANTOS, A. F. dos; LUZ, E.D.M.N.; REIS, A. "*Phytophthora* spp.: Distribuição e Associação com Espécies Florestais." Embrapa Florestas-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 47.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MOFO BRANCO, 2014, Londrina. Desafios futuros: anais. Londrina: SBF, 2014.

SMITH, A. L. Biology of chlamydospores of *Phytophthora ramorum*. 140 f. PhD Thesis. Thesis (**Master of Scienc in Botany and Plant Pathology**) Oregon States University, Oregon, 2007.

SOUSA, E.P.; SOARES, N.S.; OLIVEIRA, J.B.R.; CORDEIRO, S.A.; SILVA, M.L. Competitividade da produção de palmito pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth.) no Brasil. In: XLVII Congresso Brasileiro de economia, Administração e sociologia Rural, 2009, Porto Alegre. Desenvolvimento rural e sistemas agroalimentares: os agronegócios no contexto de integração das nações. Brasília: SOBER, 2009.

STAMPS, D. J. et al. Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. **Mycological Papers**, n. 162, p. 1-28, 1990.

STAMPS, D.J.; WATERHOUSE, G.M.; NEWHOOK, F.J.; HALL, G.S. Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. **Mycological Papers, Wallingford**, v.162, n.1, p.1-28, 1990.

STEIN, R.L.B.; ALBUQUERQUE, F.C.; MULLER, C.H. Podridão da base do estipe da pupunheira causada por *Phytophthora palmivora*. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v.22, suplemento, p. 313, 1997.

TAVARES, S.C.C. de H.; NASCIMENTO, A.R.; LIMA, J.A.S.; MENEZES, W.A.; CRUZ, S.C. Doenças da pupunha em áreas irrigadas na região do submédio São Francisco. **Fitopatologia Brasileira**, v.23 (Supl.), p. 286, 1998.

TOMITA, C.K.; LIMA, M.A.; UESUGI, C.H. Levantamento de perdas econômicas causadas por *Phytophthora palmivora* em cultura de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth.) na região geo-econômica de Padre-Bernardo-GO. **Fitopatologia Brasileira**, v.31 (Supl.), p. 296, 2006.

TRINDADE, D. R.; POLTRONIERI, L.S "Phytophthora palmivora causando podridão de frutos de mamoeiro no Pará. **Fitopatologia Brasileira** v. 27, p. 422. 2002.

TONET R.M.; FERREIRA, L. G. S.; OTOBONI, J.L.M.A. **Cultura da Pupunha**. Campinas: CATI, 1999. 44p. (CATI, Boletim técnico, 237).

TÜRKÖLMEZ, Ş., ÇİFTÇİ, O., CANIHOŞ, E., SERÇE, Ç. U., DERVIŞ, S. Phytophthora Crown and Root Rot of Apricot Caused by *Phytophthora palmivora* in Turkey. **Journal of Phytopathology**, Turquia, v. 163(6), p. 498-502. 2015.

UESUGI, C.H.; SANTOS, G.R.; CAFÉ FILHO, A.C.C. Ocorrência de *Phytophthora palmivora* em pupunheira no estado do Tocantins. **Fitopatologia brasileira**, v.32 (Supl.), p.255, 2003.

WATERHOUSE, G.M. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Commonwealth Mycological Institute, Kew, U.K. **Mycological Papers**, n.92, 1963.

ZENTMYER, G.A. The World of Phytophthora. In: **Phytophthora**. Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology. Erwin, D.C.; Bartnicki-Garcia, S.; Tsao, p. H. (Eds.). St. Paul, Minnesota: **The American Phytopathological Society**, 1983. p 1-7.

ZENTMYER, G. A. The World of Phytophthora: Phytophthora Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology, **The American Phytopathological Society**. 2. Minnesota. US. p. 1-7. 1987.