

**TATIANE CRISTINA ALBUQUERQUE ALVES**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E MOLECULAR DE  
ISOLADOS DE *Phytophthora* DA ACÁCIA-NEGRA (*Acacia mearnsii* De  
Wild) NA REGIÃO SUL DO BRASIL**

**MARINGÁ  
PARANÁ – BRASIL  
FEVEREIRO – 2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**TATIANE CRISTINA ALBUQUERQUE ALVES**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E MOLECULAR DE  
ISOLADOS DE *Phytophthora* DA ACÁCIA-NEGRA (*Acacia mearnsii* De  
Wild) NA REGIÃO SUL DO BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Proteção de Plantas, para obtenção do título de Mestre.

**MARINGÁ  
PARANÁ – BRASIL  
FEVEREIRO – 2008**

**TATIANE CRISTINA ALBUQUERQUE ALVES**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E MOLECULAR DE  
ISOLADOS DE *Phytophthora* DA ACÁCIA-NEGRA (*Acacia mearnsii* De  
Wild) NA REGIÃO SUL DO BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Proteção de Plantas, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em

---

Dr. Álvaro Figueredo dos Santos  
(Co-orientador)

---

Prof. Dr. João Batista Vida

---

Prof. Dr. Dauri José Tessmann  
(Orientador)

A meus pais, Benedito e Eva, pelo carinho, apoio, incentivo e amor incondicional.

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela minha família, que me apoiou e me incentivou nesta etapa tão importante da minha vida.

À Capes, pela bolsa concedida, para a realização deste trabalho.

À Universidade Estadual de Maringá e a Embrapa Florestas que disponibilizaram assistência necessária para a realização deste trabalho.

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Agronomia, pelos valiosos ensinamentos passados nas disciplinas.

Ao professor Dr. Dauri José Tessmann por ter incentivado e orientado o meu ingresso no Curso de Mestrado e pelos valiosos ensinamentos acadêmicos, fundamentais para meu desenvolvimento profissional.

Ao Dr. Álvaro Figueredo dos Santos, pesquisador da Embrapa Florestas, pela co-orientação, confiança e motivação na realização deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Fitopatologia, Júnior, Sonia e especialmente ao Mauro pelas palavras amigas e de incentivo no decorrer desses dois anos de Curso de Mestrado.

Aos amigos da pós-graduação: Francielli, Rosa Gabriela, Bárbara, Ricardo, Rudimar, Jefferson, Ronilda, Cláudia, Guto, Marilda, pelos momentos agradáveis, pelas conversas descontraídas, pelas dicas e troca de informações.

Em especial, aos amigos Bárbara de Mello Aguiar e Ricardo Ribeiro de Oliveira, pelas sugestões e colaboração na realização deste trabalho.

Ao meu namorado, Marcos de Araújo Rodvalho, pela ajuda profissional, paciência, amor, carinho e companheirismo nesses anos de convivência.

Aos amigos e amigas de todos momentos, que acreditaram e me apoiaram e a todas pessoas que contribuíram de alguma forma para a conclusão desta dissertação.

## **BIOGRAFIA**

TATIANE CRISTINA ALBUQUERQUE ALVES, filha de Benedito Alves e Eva Albuquerque Alves, nasceu na cidade de Paranavaí, Estado do Paraná, aos 24 dias do mês de dezembro de 1980.

Graduou-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná, em dezembro de 2005.

Iniciou o Curso de Pós-Graduação em Agronomia, em março de 2006, completando com este trabalho as exigências necessárias à obtenção ao título de Mestre em Agronomia.



*“... quando Deus quer e o homem sonha, a obra nasce...”*

(Fernando Pessoa)

## ÍNDICE

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	x
<b>RESUMO</b> .....	xii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiv
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
<b>2.1 A acácia-negra</b> .....	3
<b>2.2 A gomose da acácia-negra</b> .....	6
<b>2.3 Análise da variabilidade em <i>Phytophthora</i></b> .....	9
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	15
<b>3.1 Preservação dos isolados</b> .....	15
<b>3.2 Caracterização morfofisiológica dos isolados</b> .....	16
3.2.1 Características culturais .....	16
3.2.2 Teste de esporulação em meio líquido .....	16
3.2.3 Morfologia e dimensão dos esporângios e clamidósporos .....	17
3.2.4 Ontogenia dos esporângios .....	18
3.2.5 Grupos de compatibilidade .....	18
3.2.6 Morfologia do anterídio e dimensões do oogônio e oósporo .....	19
3.2.7 Efeito da temperatura no crescimento micelial dos isolados .....	19
<b>3.3 Agressividade dos isolados</b> .....	20
<b>3.4 Caracterização molecular dos isolados</b> .....	21
3.4.1 Isolamento de DNA .....	21
3.4.2 Reação da polimerase em cadeia (PCR) .....	23
3.4.3 Análise dos dados .....	24
<b>4. RESULTADOS</b> .....	25
<b>4.1 Caracterização morfofisiológica dos isolados</b> .....	25
4.1.1 Características culturais e morfológicas .....	25

4.1.2 Teste de compatibilidade .....	30
4.1.3 Morfologia do anterídio e dimensões do oogônio e oósporo .....	32
4.1.4 Teste de esporulação em meios líquido .....	32
4.1.5 Efeito da temperatura no crescimento micelial dos isolados .....	32
<b>4.2 Agressividade dos isolados .....</b>	<b>36</b>
<b>4.3 Caracterização molecular .....</b>	<b>37</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>50</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>58</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Relação dos isolados de <i>Phytophthora</i> sp. da acácia-negra utilizados neste estudo .....	15
Tabela 2	Características culturais dos isolados de <i>Phytophthora</i> sp. da acácia-negra em meio de cultura CA .....	25
Tabela 3	Dimensões dos esporângios dos isolados de <i>Phytophthora</i> sp. da acácia-negra em extrato de solo .....	28
Tabela 4	Dimensões dos clamidósporos dos isolados de <i>Phytophthora</i> sp. da acácia-negra em extrato de solo .....	29
Tabela 5	Grupo de compatibilidade, dimensões do oogônio e oósporo, e morfologia do anterídio dos isolados de <i>Phytophthora</i> sp. da acácia-negra .....	31
Tabela 6	Influência do meio de cultura líquido na produção de esporângios em isolados de <i>Phytophthora</i> sp. da acácia-negra ....	32
Tabela 7	Comparação entre as médias de crescimento micelial (mm) dos isolados de <i>Phytophthora</i> sp. De acácia-negra, no meio de cultura CA em oito temperaturas diferentes .....	33
Tabela 8	Temperatura ótima e ponto de máximo crescimento micelial dos isolados de <i>Phytophthora</i> sp .....	34

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mapa do gene do DNA ribossomal nuclear, com a localização dos <i>primers</i> (Baseado em WHITE <i>et al.</i> , 1990) .....	23
Figura 2	Morfologia das culturas de <i>Phytophthora</i> sp. da acácia-negra a 24°C com sete dias de cultivo em meio de cultura CA: (A) padrão ligeiramente rosáceo, (B) padrão estrelado e (C) padrão cotonoso ....	26
Figura 3	Características dos esporângios de <i>Phytophthora</i> sp.: (A) esporângio papilado, (B) esporângio persistente, (C, D) ontogenia irregularmente simpodial .....	26
Figura 4	Forma do esporângio. (A) globoso, (B) ovoide, (C) obpiriforme, (D) elipsoide, (E) obovoide, (F) bipapilado, (G, H, I) formas distorcidas ...	27
Figura 5	Forma dos oósporos e clamidósporos: (A, B) oósporo aplerótico, com anterídio anfigeno, (C) clamidósporo intercalar, (D) clamidósporo terminal .....	30
Figura 6	Teste de compatibilidade: (A) placas de Petri, no teste de pareamento entre os isolados de <i>Phytophthora</i> sp., (B) placas de Petri com culturas pareadas de <i>Phytophthora</i> sp. ....	31
Figura 7	Equações ajustadas a partir do desdobramento da variável temperatura dentro de cada isolado .....	35
Figura 8	Comprimento das lesões em ramos destacados de acácia-negra inoculados com isolados de <i>Phytophthora</i> sp. ....	36
Figura 9	Gel de agarose mostrando o produto de PCR obtido com os pares de <i>primers</i> ITS4/ITS3 (A) e ITS5/ITS2 (B), compreendendo as regiões ITS1, ITS2 e 5.8S do rDNA de <i>Phytophthora</i> sp. da acácia-negra. ....	38
Figura 10	Árvore filogenética consenso inferida pelo método de máxima parcimônia, a partir de sequências de DNA das regiões ITS1, ITS2 e 5.8S do rDNA de isolados de <i>Phytophthora</i> sp. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de <i>bootstrap</i> na qual as repetições foram observadas (1.000 repetições). As sequências de rDNA dos isolados em negrito foram obtidas neste trabalho, enquanto as demais sequências foram obtidas do <i>GenBank</i> (com o número de acesso) .....	39

Figura 11 Árvore filogenética inferida pelo método de agrupamento de vizinhos, a partir de sequências de DNA das regiões ITS1, ITS2 e 5.8S do rDNA de isolados de *Phytophthora* sp. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* nas quais as repetições foram observadas (1.000 repetições). As sequências de rDNA dos isolados em negrito foram obtidas neste trabalho, enquanto as demais sequências foram obtidas do *GenBank* (com o número de acesso) ..... 40

## RESUMO

ALVES, Tatiane Cristina Albuquerque, MS. Universidade Estadual de Maringá. Fevereiro de 2008. **Caracterização morfofisiológica e molecular de isolados de *Phytophthora* da acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild) na região sul do Brasil.** Orientador: Dr. Dauri José Tessmann. Co-orientador: Dr. Álvaro Figueredo dos Santos.

A acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild) é uma espécie florestal originária da Austrália, introduzida no Brasil em 1918, no Estado do Rio Grande do Sul. Mais de 150.000 ha são cultivados com acácia-negra neste Estado, principalmente para extração de tanino e mais recentemente para produção de celulose, carvão, lenha e chapas de aglomerados. A gomose é um dos principais problemas fitossanitários da acácia-negra no Brasil, causando lesões necróticas no tronco com ou sem exsudação de goma e pode causar a morte da planta. Duas espécies de *Phytophthora* foram relatadas como agentes causais da doença no Brasil, *P. nicotianae* e *P. boehmeriae*. No entanto, na África do Sul, uma terceira espécie, *P. meadii*, também está associada à doença. O objetivo do trabalho foi caracterizar 12 isolados de *Phytophthora* da acácia-negra provenientes do Sul do Brasil, com base em características morfofisiológicas e sequências do DNA ribossomal (rDNA), visando à identificação da espécie. Todos isolados formaram esporângios persistentes e papilados, medindo 27,90 – 74,74 x 21,70 – 52,70 µm (média 53,67 x 37,67 µm), com relação comprimento/largura de 1,43:1, apresentaram crescimento micelial a 35°C e formaram oósporo com anterídio anfígeno a partir do pareamento entre isolados de grupos de compatibilidade diferentes, confirmando a natureza heterotálica dos isolados. Todos os isolados foram patogênicos a acácia-negra, provocando lesões necróticas, sem a exsudação de goma. Embora apresentando algumas diferenças, os isolados foram identificados com base em suas características morfofisiológicas como a espécie *P. nicotianae*. Na análise molecular, as sequências da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA dos isolados foram alinhadas com sequências de outras espécies de

*Phytophthora* disponíveis no *GenBank* utilizando o programa ClustalW. A partir dos alinhamentos múltiplos foram inferidas árvores filogenéticas, utilizando-se o programa PAUP \* 4.0, com os procedimentos de máxima parcimônia (*maximum parsimony*) e agrupamento de vizinhos (*neighbor joining*). As sequências obtidas com os pares de *primers* ITS3/ITS4 e ITS2/ITS5 apresentaram 600 pb e 350 pb, respectivamente. A análise filogenética revelou a ocorrência de dois grupos geneticamente distintos dentre os isolados do Brasil, os quais não se agruparam ao clado contendo o acesso de *P. nicotianae*. A comparação das sequências de DNA com sequências do *GenBank* mostrou que os isolados do Brasil apresentaram maior similaridade com a nova espécie descrita *P. bisheria*.

**Palavras-chave:** gomose, Oomycetes, patologia florestal.



## ABSTRACT

ALVES, Tatiane Cristina Albuquerque, MS. Universidade Estadual de Maringá. Fevereiro de 2008. **Morphophysiological and molecular characterization of *Phytophthora* isolates from black wattle (*Acacia mearnsii* De Wild) in Southern Brazil.** Advisor: Dr. Dauri José Tessmann. Co-advisor: Dr. Álvaro Figueredo dos Santos.

Black wattle (*Acacia mearnsii* De Wild) is a forest tree species originated from Australia that was introduced in Brazil in 1918, in the State of Rio Grande do Sul. More than 150.000 ha of black wattle is planted in this state mainly for tannin extraction, and more recently also for production of cellulose, charcoal, and firewood. Gummosis is one of the major phytosanitary problems of black wattle in Brazil, causing necrotic lesions at the base of the trunk which may be accompanied by gum exudation. The disease may cause tree death. Two *Phytophthora* species, *P. nicotianae* and *P. boehmeriae*, were reported in Brazil as agents of black wattle gummosis; however in South Africa, *P. meadii* also was associated to this disease. The objective of this research was to characterize eleven isolates of *Phytophthora* associated with gummosis on black wattle in the States of Paraná and Rio Grande do Sul, Southern Brazil, based on morphology, physiology and DNA sequences of ITS (Internal Transcribed Spacer) region of the rDNA, including the gene 5.8S. All isolates presented papillate and non-caducous sporangia measuring 27,90 - 74,74 x 21,70 - 52,70  $\mu\text{m}$  (average 53,67 x 37,67  $\mu\text{m}$ ) with length/width ratio 1,43:1; and all presented growth at 35°C. According to the mating test, the isolates were heterothallic. The oospores of all isolated presented amphigynous antheridia. All isolates were pathogenic, causing necrotic lesions without gum exudation. The isolates were identified based in their morphophysiological characteristic as belonging to the species *P. nicotianae*. The DNA sequences of isolates were aligned with sequences of rDNA from other species of *Phytophthora* from *GenBank* using the software Clustal W. Phylogenetic trees were inferred with the software PAUP\*4.0, based on the

maximum parsimony and neighbor joining procedures. The obtained sequences of the ITS region, with the primers ITS3/ITS4 and ITS2/ITS5 had 600 pb and 350 pb, respectively. The phylogenetic analysis identified two groups among the Brazilian isolates, which didn't group to the group containing the access of *P. nicotianae*. Blast search at the *GenBank* showed that the Brazilian isolates had highest similarity scores with a new described species, *P. bisheria*.

**Keywords:** gummosis, Oomycetes, forest pathology.

## 1. INTRODUÇÃO

A acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild) é uma espécie florestal nativa da Austrália, introduzida no Brasil em 1918, no estado do Rio Grande do Sul, onde seu cultivo apresenta grande importância econômica e social. O principal interesse no cultivo da acácia negra vem da utilização da casca para produção de tanino, muito utilizado na indústria de couros. No entanto, essa espécie florestal também é utilizada para a produção de madeira, celulose e lenha, merecendo destaque nos últimos anos o seu emprego na produção de chapas de madeira aglomerada e de cavacos para exportação (SCHNEIDER; TONINI, 2003).

A área cultivada com acácia-negra no Brasil está estimada em 150 mil hectares, ocupando a terceira colocação entre as espécies florestais mais plantadas no Brasil, sendo superada apenas pelo eucalipto (*Eucalyptus* spp.) e *Pinus*. A produção de acácia-negra está concentrada principalmente em pequenas propriedades agrícolas, constituindo importante fonte de trabalho e renda no campo (BARICHELLO; SCHUMACHER; VOGEL, 2005; MARTINEZ, 2006).

No Brasil, e em outros países produtores de acácia-negra, como a África do Sul e alguns países asiáticos, a ocorrência de uma doença conhecida como gomose, tem acarretado prejuízos relevantes à cultura da acácia-negra, por danificar a casca, principalmente nas porções basal e mediana do tronco. A doença causa danos devido ao menor aproveitamento da casca e, em casos mais extremos, pela morte das árvores (SANTOS, 2001; SANTOS; LUZ; SOUZA, 2005).

A principal característica sintomatológica da gomose é a exsudação de goma, sintoma que até pouco tempo era facilmente confundido com outros problemas, uma vez que o tronco da acácia-negra exsuda goma quando lesionado por ação tanto biótica quanto abiótica (SANTOS, 1998a). Apesar de a gomose ter sido relatada há mais de 40 anos, apenas em 1998, Santos, Auer e Grigoletti Jr. (1998), associaram os sintomas de gomose com o oomiceto *Phytophthora*.

Duas espécies de *Phytophthora* foram relatadas como causadoras da gomose em acácia-negra no Brasil sendo elas, *P. nicotianae* Breda de Haan e *P. boehmeriae* Sawada (SANTOS; LUZ, 2006). Entretanto outras espécies do patógeno podem estar associadas à etiologia da doença. Na África do Sul, além das espécies mencionadas, *P. meadii* Mac Rae também foi relatada causando gomose em plantações de acácia-negra (ROUX; WINGFIELD, 1997).

Nos últimos anos, o avanço do emprego de técnicas moleculares na taxonomia do gênero *Phytophthora* permitiu novos procedimentos e informações sobre a caracterização e identificação de espécies ou grupos nesse gênero, assim como o estudo de relações filogenéticas (KROON et al., 2004; MARTIN; TOOLEY, 2003). Essas novas abordagens são importantes em estudos sobre etiologia de doenças porque auxiliam a caracterização e identificação da variabilidade dos patógenos.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar doze isolados de *Phytophthora* sp. da acácia-negra, com base em características morfofisiológicas e sequências do DNA ribossomal visando à identificação da espécie.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A acácia-negra

Dentro da família Mimosaceae, o gênero *Acacia* é o mais amplo, constituído de aproximadamente 1350 espécies. As acácias estão distribuídas ao longo das áreas temperadas e tropicais do mundo, com a maior concentração das espécies na Austrália (cerca de 957 espécies), e também com um alto número nas Américas (cerca de 185 espécies), África (144 espécies) e Ásia (89 espécies) (ORCHARD; MASLIN, 2003; BROCKWELL et al., 2005).

A acácia-negra (*Acacia meanrsii* De Wild) é uma espécie nativa do sudeste da Austrália. Apresenta como principais características a rápida colonização de ambientes abertos; capacidade de estabelecer-se em áreas alteradas e degradadas; requerimento de luz direta para germinação e crescimento; produção de grande quantidade de sementes que permanecem viáveis no solo por longo tempo; germinação rápida, mas que requer indução; rápido crescimento; e vida curta (SHERRY, 1971).

O reconhecimento da madeira pelos pioneiros australianos como um excelente combustível, estimulou as primeiras plantações dessa espécie fora do seu habitat nativo, realizados na Índia em 1843 para fornecer combustível barato para o exército (SHERRY, 1971; POSER; D'AVILA; HORN, 1990).

Segundo Sherry (1971), apesar da casca fornecer uma das mais ricas fontes de tanino vegetal conhecidas, aparentemente nenhuma das introduções de acácia-negra nos países fora da Austrália foram feitas com o objetivo de explorar essa propriedade. A introdução dessas árvores na África do Sul ocorreu em 1864, aparentemente com o primeiro objetivo de explorar seu rápido crescimento para produção de lenha, como árvore de sombra, quebra-ventos, ou como fonte de combustível nas fazendas. Apenas em 1884, a casca da acácia-negra começou a ser comercializada localmente. De acordo com Santos (1998a), o início da comercialização levou ao estabelecimento de grandes plantações para o uso da

madeira em construções leves e da casca para a extração de substância tanante, para o curtimento de couro de animais.

Além das substâncias tanantes, da casca ainda são obtidos os flocculantes, utilizados em processos de tratamento de água e que, por sua origem vegetal, não apresentam os inconvenientes e as contra-indicações dos similares de origem química; os dispersantes, usados como aditivos nos processos onde é necessária a aspersão de líquidos; os adesivos e resinas a base fenólica, destinados principalmente as indústrias que utilizam madeiras e à produção de agentes anticorrosivos (MORA, 2002). A madeira da acácia-negra é também utilizada para a fabricação de papel e celulose, carvão de alta qualidade, lenha e chapas de aglomerados. Em adição, seu rápido crescimento e seu potencial de melhorar as qualidades do solo têm conduzido seu uso em projetos de conservação do solo, em muitos lugares do mundo (SHERRY, 1971).

Atualmente a acácia-negra está sendo comercialmente cultivada para uso da casca e produtos da madeira em aproximadamente 500.000 ha em alguns países incluindo a África do Sul, Brasil, Índia e China (BROCKWELL et al., 2005).

No Brasil, a introdução da acácia-negra ocorreu no estado do Rio Grande do Sul em 1918, com seus primeiros plantios comerciais realizados em 1928, no município de Estrela. Desde então, tornou-se uma importante atividade econômica no Estado, trazendo benefícios consideráveis para mais de quarenta municípios e milhares de famílias (SCHNEIDER; TONINI, 2003).

O principal objetivo da introdução da espécie no Brasil foi para extração de tanino presente na casca, muito utilizado para curtimento de couro e produção de outras substâncias (MARTINEZ, 2006). A acacicultura tornou-se uma sólida atividade econômica, tirando o Brasil da condição de grande importador de extratos vegetais curtientes, para condição de auto-suficiência a partir de 1954 (SCHNEIDER; TONINI, 2003).

De acordo com Finger et al. (2000), mais de 35.000 famílias na Depressão Central, Serra do Sudeste, Encosta Superior e Inferior do Nordeste do Estado do Rio Grande do Sul têm sua subsistência alicerçada na cultura da

acácia. Trata-se de regiões com pequenas propriedades rurais, cuja economia está associada à cultura agrícola de subsistência e mesmo na associação da acácia, agricultura e atividade pastoril. Schneider et al. (2001) relataram que o uso de sistemas agrossilvipastoris em plantios de acácia-negra por pequenos produtores ajudou na grande aceitação da acacicultura no país.

A cultura da acácia-negra ocupa a terceira colocação entre as espécies florestais mais plantadas no país, perdendo apenas para as espécies dos gêneros *Eucalyptus* e *Pinus* (BARICHELLO; SCHUMACHER; VOGEL, 2005; MARTINEZ, 2006). Segundo Santos, Luz e Souza (2005), a cultura da acácia-negra compõe um dos principais maciços florestais homogêneos do Rio Grande do Sul, ocupando uma área superior a 150.000 ha, explorados em rotações de sete a nove anos.

Santos, Luz e Bezerra (2007) relataram que em plantações de acácia-negra, aos oito anos de idade, a estimativa do teor médio de tanino na casca é de 27%, ou seja, de cada 100 quilos de casca seca ao ar se obtém 27 quilos de tanino.

Além da casca, utilizada na indústria do tanino, a madeira que, originalmente, era utilizada somente para lenha, transformou-se em matéria-prima para a fabricação de celulose, papel e madeira aglomerada, suprimindo as grandes indústrias do setor hoje existentes no país (SCHNEIDER; TONINI, 2003).

Segundo Mochiutti (2007) até 20 anos atrás a casca constituía-se no principal produto da acacicultura, sendo a madeira utilizada principalmente para energia. Atualmente toda a produção de casca ainda é destinada para produção de taninos; no entanto, devido à redução de seu valor de mercado, esta sendo considerada um produto secundário, utilizada pelos pequenos produtores para custear as despesas de corte e descascamento da madeira.

A madeira ganhou espaço no mercado com sua utilização para aglomerados e celulose, tendo grande valorização com a instalação em 1995 de indústrias processadoras e exportadoras de cavacos no Estado do Rio Grande do Sul. Praticamente toda a madeira produzida com diâmetro acima de 6 cm é destinada para estas indústrias, constituindo atualmente na principal fonte de rendimento dos produtores (MOCHIUTTI, 2007).

## 2.2 A gomose da acácia-negra

O principal problema fitossanitário da acácia-negra é uma doença que ocorre nos troncos, conhecida de forma generalizada como gomose (SANTOS, 1997). Essa doença ocorre nas regiões produtoras do Brasil, da África do Sul e dos países asiáticos, apresentando uma sintomatologia complexa, onde a exsudação gomosa é o sintoma mais característico (SANTOS; AUER; GRIGOLETTI JR., 1998).

A gomose danifica a casca, principalmente nas porções basal e mediana do tronco, chegando a causar prejuízos econômicos pela diminuição no aproveitamento da casca e, em casos mais extremos, pela morte das árvores (SANTOS; LUZ; SOUZA, 2005).

Santos e Auer (1998) determinaram a incidência da gomose em plantios comerciais no município de Encruzilhada do Sul (RS). Esses autores observaram que, aos seis meses de idade, já se verificava a presença de gomose, embora em valores baixos, atingindo um máximo de 1% das plantas afetadas. Aos doze meses, verificaram um ligeiro aumento na incidência e aos vinte quatro meses, um ligeiro pico no número de plantas com gomose, chegando a valores de 14,4%. Em plantações em idade de corte (sete anos), chega a atingir 23% (SOTTA et al., 1994) a 48% dos indivíduos (SANTOS; LUZ, 2007).

Santos, Auer e Grigoletti Jr. (1998) definiram quatro tipos de sintomas básicos, de acordo com a posição no tronco e a presença de exsudação gomosa:

**Tipo M** (mosqueado): lesão necrótica na casca, de cor escura, formato irregular, mas alongando-se principalmente no sentido longitudinal do tronco, contrastando com a área verde do mesmo, localizada acima da região do colo e sem presença de exsudação gomosa. A característica principal desse sintoma é a ausência de exsudação. Ao se retirar a casca, verifica-se, internamente, o escurecimento do lenho. Geralmente, a lesão é maior na casca do que na parte interna correspondente do lenho.

**Tipo GT** (gomose no tronco): lesão tipo M, com exsudação de goma. A característica principal dessa lesão é a abundante exsudação gomosa na



superfície da casca afetada. A goma escorre tronco abaixo, formando filetes e ocupando áreas maiores do que o tamanho real da casca afetada. As lesões são muito variáveis em tamanho e irregulares no formato. Em plantas mais velhas, essa lesão atinge grandes áreas do tronco, em virtude da coalescência de lesões.

**Tipo GC** (gomose no colo): lesão necrótica na casca, de cor escura, com exsudação de goma, limitada à região do colo (nível do solo). A característica principal dessa lesão é a sua localização no colo. Às vezes verifica-se abundante exsudação gomosa na superfície da casca afetada, então a goma acumula-se na região do colo, formando grumos em contato com o solo. Internamente ocorre o escurecimento do lenho. A lesão tipo GC é de difícil constatação nos seus estágios iniciais, em virtude de se localizar no nível do solo ou logo abaixo.

**Tipo GCT** (gomose no colo e no tronco): lesão tipo GC, iniciando no colo e se estendendo verticalmente no tronco. Às vezes ocorre fendilhamento da casca. A lesão tipo GCT caracteriza-se por apresentar uma grande área escurecida na casca do tronco e abundante exsudação gomosa. Em condições propícias a doença, verifica-se acúmulo de grumos, próximos ao colo, resultante de goma com partículas de solo aderidas. Em árvores com lesões velhas, o tamanho da lesão GCT é resultante da coalescência de lesões do tipo GC e GT.

Os primeiros relatos da gomose da acácia-negra no Brasil foram realizados por Goulart (1959), Schuch (1975) e Schuch e Pederzolli (1975). Apesar de a gomose ter sido relatada há mais de 40 anos, apenas em 1998, Santos, Auer e Grigoletti Jr. (1998), associaram os sintomas de gomose com o oomiceto *Phytophthora*. Árvores de acácia-negra inoculadas com isolados de *Phytophthora* sp. apresentaram lesões exsudativas ou não dos tipos M e GT. Como a exsudação de goma pode também ser decorrente de outras causas, bióticas ou abióticas, a denominação gomose de *Phytophthora* deve ser usada para designar a doença, apesar dos outros sintomas causados por *Phytophthora* em acácia-negra (SANTOS; AUER; GRIGOLETTI JR., 1998).

Na África do Sul, Roux, Kemp e Wingfield (1995) associaram os sintomas da gomose a um complexo de doenças. Trabalhos realizados por Zeijlemaker (1968; 1971), neste mesmo país, caracterizou parte dos sintomas

como sendo causados por *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan. Recentemente, mais duas espécies associadas a esta doença foram relatadas por Roux e Wingfield (1997) *P. meadii* Mc Rae e *P. boehmeriae* Sawada.

No Brasil, trabalhos conduzidos por Santos e Luz (2003) permitiram associar os sintomas da gomose da acácia-negra com a espécie *P. nicotianae*. No entanto, em 2004 Santos, Luz e Souza (2004; 2006), relataram a ocorrência de uma sintomatologia diferenciada em algumas plantações no município de Piratini (RS), caracterizando-se por lesões escuras e na maioria das vezes sem exsudação de goma. Sendo constatado o envolvimento de mais uma espécie de *Phytophthora* na etiologia da gomose, classificada como *P. boehmeriae*.

Com o objetivo de determinar a distribuição das duas espécies *P. nicotianae* e *P. boehmeriae*, nas plantações brasileiras de acácia-negra, Santos e Luz (2006) realizaram um levantamento em 23 plantações localizadas em nove municípios do Rio Grande do Sul e em duas áreas experimentais, em dois municípios do Paraná. Foi observada a presença de gomose nas 25 plantações avaliadas, sendo a espécie *P. nicotianae* predominante, aparecendo em 100% das plantas amostradas, e a espécie *P. boehmeriae* ocorrendo em apenas 10% das amostras, as quais estavam localizadas nos municípios gaúchos de Piratini, Cristal e Cerro Grande do Sul.

Santos e Luz (2006), constataram que as amostras procedentes da região basal do tronco da acácia-negra, ocorriam à predominância da espécie *P. nicotianae*, enquanto que nas regiões superiores do tronco observaram apenas a espécie *P. boehmeriae*. Podendo-se afirmar a existência de dois padrões de gomose nas plantações: 1) gomose basal, associada a *P. nicotianae*, ocorrendo na maioria das plantações, não está associada a surtos e lesões, localizada principalmente no colo da planta, ou até no máximo dois metros de altura; 2) gomose generalizada, associada a *P. boehmeriae*, ocorre em surtos, em anos chuvosos, associada a ventos fortes, com abrangência menor do que a gomose basal e lesões distribuídas generalizadamente ao longo do tronco até a altura de 10 metros.

Os resultados obtidos por Santos e Luz (2006) evidenciam que *P. nicotianae* é o principal agente da gomose da acácia-negra no Brasil, enquanto *P. boehmeriae* encontra-se em uma região limitada.

### **2.3 Análise da variabilidade em *Phytophthora***

O nome do gênero *Phytophthora* é derivado do grego, e significa *phyto* (planta) e *phthora* (destruidor), juntamente com o gênero *Pythium*, segundo a classificação de Alexopoulos, Mims e Blackwell (1996) pertencem ao Reino Straminopila, Filo Oomycota, Família Pythiaceae, assim nomeados devido o gênero *Pythium* ter sido descrito primeiro. O gênero *Phytophthora* foi estabelecido por Anton de Bary em 1876 quando descreveu *P. infestans* como o agente direto da morte de aproximadamente um milhão de irlandeses e da imigração de um milhão e meio de indivíduos deste país para a América do Norte, nos anos 1845 – 46, em consequência das devastações provocadas pelo patógeno nos batatais, principal fonte de alimento da população irlandesa nos séculos XVII e XIX (LUZ; MATSUOKA, 2001).

*Phytophthora* é um gênero complexo que contém aproximadamente 60 espécies descritas ocupando uma variedade de habitats terrestres e aquáticos (ERWIN; RIBEIRO, 1996; BRASIER; COOKE; DUNCAN, 1999), sendo a maioria das espécies invasoras primárias do tecido sadio das plantas com habilidade saprofítica limitada (COOKE et al., 2000).

Em 2001, Luz e Matsuoka realizaram um levantamento do número de espécies de *Phytophthora* no Brasil, e relataram a ocorrência de 18 espécies, ocorrendo em 74 espécies vegetais hospedeiras, sendo muitas delas vitimadas por mais de uma espécie de *Phytophthora*. Em 2005, um levantamento complementar demonstrou que o número de espécies assinaladas no país ampliou-se para 22, com quatro novas espécies válidas relatadas (LUZ, 2006).

Este gênero, se não inteiramente, pelo menos em sua maioria é constituído por espécies patogênicas e responsáveis por severos danos em culturas economicamente importantes no mundo (LUZ et al., 2001; LEE;

TAYLOR, 1992), apresentando-se como um dos mais importantes gêneros de fungos fitopatogênicos, abrigoando em sua quase totalidade espécies de grande importância, conhecidas por provocarem doenças no sistema radicular, na parte aérea, ou em ambos, a expressar-se em sintomas variados em inúmeras plantas, incluindo culturas de subsistência, essências florestais, fruteiras tropicais e subtropicais, pastagens, plantas ornamentais e importantes culturas tropicais de exportação (LUZ; MATSUOKA, 1996).

Dentre as doenças causadas por espécies do gênero *Phytophthora*, algumas delas tem se destacado no cenário mundial nos últimos anos. Muitas das espécies de *Phytophthora* têm causado grandes danos em árvores nativas, com impacto ecológico negativo em florestas da Austrália, Europa e América do Norte (PAIM, 2005). Nos países da Europa, florestas de carvalho (*Quercus* spp.) têm apresentado sintomas de declínio. Entre os possíveis fatores bióticos e abióticos associados com o declínio, espécies de *Phytophthora* foram frequentemente relatadas (BARZANTI; CAPRETTI; RAGAZZI, 2001). Na Espanha e na França, o declínio de *Quercus suber* e *Q. rubra* respectivamente, tem sido associado à *Phytophthora cinnamomi* Rands (BRASIER; ROBREDO; FERRAZ, 1993). Barzanti, Capretti e Ragazzi (2001), identificaram em florestas no centro e ao norte da Itália as espécies *P. citricola* Sawada, *P. megaspermae* Drechsler, *P. quercina* Jung e *P. syringae* (Kleb.) Kleb associadas ao declínio do carvalho. Nos Estados Unidos, nos Estados da Califórnia e do Oregon, Rizzo e Garbelotto (2003), identificaram a recente espécie *Phytophthora ramorum* Werres, de Cock & In't Veld, descrita por Werres et al. (2001) como agente causal da morte súbita do carvalho (*Lithocarpus densiflora* e *Quercus* spp). De acordo com Rizzo e Garbelotto (2003), esta doença alcançou proporções epidêmicas nas florestas na Califórnia, levando milhares de árvores a morte.

O gênero *Phytophthora* possui como características micélio diploide, cenocítico com nenhum ou poucos septos (ERWIN; RIBEIRO, 1996), podendo produzir ambos os esporos sexual e assexual, além de clamidósporos. O esporo assexual chamado de esporângio emerge diretamente das hifas através de

estruturas conhecidas como esporangióforos, os quais sobre condições ótimas de temperatura e umidade, liberam os zoósporos biflagelados (KAMOUN, 2000).

Os esporos sexuais, ou oósporos, são formados quando um oogônio (gametângio feminino) é fertilizado pelo anterídio (gametângio masculino) (SMITH, 2007). Algumas espécies de *Phytophthora* são autofertilizadas, sendo chamadas homotáticas, enquanto outras são auto-estéreis ou heterotáticas (KAMOUN, 2000). Na fertilização, sucessiva meiose e cariogamia acontecem e o esporo resultante é denominado oósporo (SMITH, 2007). Um único esporo sexual se forma dentro do oogônio, após a fertilização pelos núcleos do anterídio (ERWIN; RIBEIRO, 1996).

Em algumas espécies de *Phytophthora*, a habilidade para se reproduzir por meio de esporângio e zoósporos é considerada a razão principal pela qual certas doenças de *Phytophthora* podem ser epidemiologicamente mais explosivas sob condições ambientais apropriadas (ERWIN; RIBEIRO, 1996).

Embora os oomicetos compartilhem muitas características morfológicas em comum com os fungos, evolucionariamente eles são mais intimamente relacionados às algas marrons e plantas do que com os fungos verdadeiros (BALDAULF; PALMER, 1993; MARTIN; TOOLEY, 2003).

Um dos maiores problemas no estudo das espécies de *Phytophthora* reside em sua taxonomia (LUZ; MATSUOKA, 1996). Na década de 60, Waterhouse (1963) separou as espécies de *Phytophthora* em seis grupos, baseados numa série de parâmetros morfológicos e fisiológicos, marcando um avanço nos estudos de taxonomia do gênero, sendo este agrupamento usado e aceito até os dias atuais (ERWIN; RIBEIRO, 1996). Nesta chave, Waterhouse (1963) reconheceu 43 espécies e algumas subespécies de *Phytophthora* (LUZ; MATSUOKA, 1996). Em 1978, Newhook et al., revisaram a chave de Waterhouse (1963), incluindo seis novas espécies baseadas nos mesmos parâmetros usados na chave de 1963, apresentadas agora no formato de chave tabular (ERWIN; RIBEIRO, 1996; LUZ; MATSUOKA, 1996). A chave taxonômica mais recente é proposta por Stamps et al. (1990), e se trata de uma

revisão da chave tabular de Newhook et al. (1978), onde são listadas 67 espécies (STAMPS et al., 1990).

A taxonomia tradicional do gênero utiliza como critérios morfológicos para a identificação das espécies a estrutura do esporângio (não-papilado, semi-papilado ou papilado) e suas dimensões, a natureza do anterídio (anfígeno ou parágino), sistema de reprodução (homotálico ou heterotálico) especificidade do hospedeiro e temperaturas cardinais (WATERHOUSE, 1963; STAMPS et al., 1990).

Pesquisas nos aspectos bioquímicos e citológicos visando à taxonomia de *Phytophthora* têm se estendido amplamente, com importantes implicações nas quais eventualmente possam vir a resultar em um novo tipo de chave (STAMPS et al., 1990).

Buscando solucionar os problemas encontrados pela taxonomia clássica, outros critérios não morfológicos têm sido utilizados na sistemática de *Phytophthora*, como padrões de proteínas, padrões de isoenzimas, PCR (*Polymerase Chain Reaction*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (ERWIN; RIBEIRO, 1996) e o sequenciamento de regiões conservadas, como aquelas presentes nos nucleotídeos das regiões *Internal Transcribed Spacer* (ITS1 e ITS2) dos genes ribossomais (rDNA) (LEE; TAYLOR, 1992). A combinação entre a taxonomia derivada de dados moleculares e a taxonomia clássica baseada na morfologia, é um tópico de grande interesse para os estudos atuais (MARTIN; TOOLEY, 2003).

A reação da polimerase em cadeia (PCR) tem sido estabelecida como uma das técnicas mais importantes para identificação de patógeno, oferecendo mais sensibilidade e especificidade do que os métodos tradicionais (HENSON; FRENCH, 1993).

Lee e Taylor (1992) foram os primeiros a estudarem a taxonomia do gênero *Phytophthora* pela comparação das sequências da região ITS1 e ITS2 de cinco espécies, *P. capsici*, *P. palmivora*, *P. megakarya*, *P. citrophthora* e *P. cinnamoni*. Mais recentemente, as relações entre as espécies de *Phytophthora*

têm sido examinadas em maiores detalhes por meio dos dados das sequências desta região (FOSTER; CUMMINGS; COFFEY, 2000).

As regiões do rDNA, ITS1 e ITS2 são amplamente usadas para estudos filogenéticos, por apresentarem variação entre as espécies dentro de um gênero, mas nenhuma ou muito pouca variação intra-específica (CHOWDAPPA et al., 2003). Outra vantagem é que esta região foi extensivamente sequenciada para a maioria das espécies de *Phytophthora* e outros fungos relacionados (COOKE et al., 2000). Fato que tem ajudado no desenho de *primers* específicos para as espécies (HAYDEN et al., 2004).

Cooke et al. (2000) analisaram as relações filogenéticas entre 50 espécies de *Phytophthora* e entre *Phytophthora* e outros oomicetos com base nas sequências da região ITS do rDNA genômico. Esses autores observaram que ao contrário de *Phytium*, *Phytophthora* é essencialmente monofilético, com todas menos três das espécies analisadas se agrupando em oito clados. Destes clados, dois continham espécies com esporângio não-papilado, e os outros seis clados incluíam ou esporângio semi-papilado e papilado, ou semi-papilado ou não-papilado, transcendendo os grupamentos morfológicos tradicionais propostos por Waterhouse (1963), os quais, segundo eles não representam os agrupamentos naturais.

Trabalho similar, realizado por Foster, Cummings e Coffey (2000), baseados nas análises das sequências da região ITS1, mostraram que os caracteres morfológicos utilizados na taxonomia de *Phytophthora* possuem valor limitado na dedução das relações filogenéticas, não mostrando conformidade com as relações baseadas em dados moleculares.

Os avanços nos métodos moleculares têm permitido estudo mais racional das relações filogenéticas dentro do gênero *Phytophthora* (FOSTER; CUMMINGS; COFFEY, 2000), sobretudo indicando que o uso de sequências da região ITS é apropriado para inferências filogenéticas nesse gênero (COOKE et al., 2000; MARTIN; TOOLEY, 2003).

Além da região ITS, o sequenciamento de genes nucleares como  $\beta$  – tubulina (*Tub2*) e Fator de alongação da tradução (*EF-1 $\alpha$* ) têm sido usados nas

análises de filogenia molecular do gênero *Phytophthora*. Kroon et al. (2004) analisaram 48 espécies de *Phytophthora* baseados nas regiões mitocondriais (citocromo oxidase subunidade 1; NADH desidrogenase sub-unidade 1) e nos genes nucleares  $\beta$  – tubulina e EF - 1 $\alpha$ , que por meio de seus resultados puderam confirmar o caráter monofilético do gênero. Além disso, seus resultados mostraram que a taxonomia clássica descrita por Waterhouse (1963) não reflete as verdadeiras relações filogenéticas do gênero *Phytophthora*, assim como o observado por Cooke et al. (2000) e Martin e Tooley (2003) ao analisarem as sequências da região ITS.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram conduzidos nos Laboratórios de Fitopatologia do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná e da Embrapa Florestas, em Colombo, Paraná.

Os isolados de *Phytophthora* sp. utilizados neste trabalho foram obtidos da coleção de *Phytophthora* de espécies florestais da Embrapa Florestas (Tabela 1).

Tabela 1 – Relação dos isolados de *Phytophthora* sp. da acácia-negra utilizados neste estudo.

Isolados	Município	Estado
2	Triunfo	Rio Grande do Sul
12	Triunfo	Rio Grande do Sul
17	Montenegro	Rio Grande do Sul
23	Triunfo	Rio Grande do Sul
61	Encruzilhada do Sul	Rio Grande do Sul
65	Encruzilhada do Sul	Rio Grande do Sul
73	Piratini	Rio Grande do Sul
80	Piratini	Rio Grande do Sul
92	Piratini	Rio Grande do Sul
111	Canguçu	Rio Grande do Sul
AM5	Ponta Grossa	Paraná
AN2003	Colombo	Paraná

#### 3.1 Preservação dos isolados

Para a preservação dos isolados de *Phytophthora* foi utilizado o método de Castellani (FIGUEIREDO, 2001). Frascos de 20 mL, contendo água destilada foram autoclavados. Foi passado plástico filme ao redor das rolhas de borracha

para evitar que se abrissem durante o processo de autoclavagem. Em seguida, foram transferidos para os frascos cinco discos de 5 mm de diâmetro de meio de cultura CA (200 g de cenoura; 17 g ágar e 1000 mL de água destilada) contendo micélio dos isolados, com cinco dias de cultivo. Após a transferência, os frascos foram lacrados com tampas herméticas de alumínio, para evitar a contaminação e a perda de água. Os frascos foram numerados a partir do número de registro dos isolados utilizados no trabalho e armazenados à temperatura de 24°C.

### **3.2 Caracterização morfofisiológica dos isolados**

#### 3.2.1 Características culturais

Para descrição das características culturais, foi considerada a forma da colônia em meio CA por sete dias a 24°C. A avaliação foi de acordo com Erwin e Ribeiro (1996), em que são descritos os padrões de colônia, conforme segue: rosáceo, estrelado, petalóide e cotonoso.

#### 3.2.2 Esporulação em meio líquido

Para a avaliação da esporulação de *Phytophthora* em meio líquido foram testados sete substratos: água destilada e autoclavada, água destilada, solução de KNO<sub>3</sub> (pH 6,0; 0,001 M), extrato de solo autoclavado, extrato de solo não autoclavado, água de lagoa autoclavada e água de lagoa não autoclavada (RIBEIRO, 1978). Os meios que passaram pelo processo de autoclavagem foram submetidos à temperatura de 120°C por 20 min.

O extrato de solo foi preparado adicionando-se num erlenmeyer 10 g de solo em 1000 mL de água destilada (RIBEIRO, 1978). O solo utilizado foi Latossolo Distroférico vermelho, coletado na Horta da Agronomia da Universidade Estadual de Maringá, e a suspensão homogeneizada foi deixada por 24 h sem agitação. Após este período, foi filtrada a suspensão por meio de uma camada dupla de papel filtro, uma parte do extrato de solo foi reservada, e a outra foi autoclavada.

A água de lagoa utilizada no teste foi coletada do Parque do Ingá, localizado no perímetro urbano do município de Maringá, Estado do Paraná.

Discos de micélio dos isolados de *Phytophthora* de 5,0 mm de diâmetro crescidos em meio de cultura CA foram colocados em placas de Petri de 6,0 cm de diâmetro, no total de 5,0 discos por placa. Em seguida, foram adicionados nas placas aproximadamente 8,0 mL de meio líquido, de modo que os discos ficassem submergidos. As placas foram incubadas em BOD à temperatura de 25°C, pelo período de 96 h, em condições de luz contínua.

As avaliações consistiram da quantificação dos esporângios presentes na massa de micélio formado sobre o meio líquido, para isso as placas foram levadas para observação em microscópio óptico, na objetiva de 16 x. A quantificação foi realizada em cinco campos de observação por placa. A área do campo de observação do microscópio, para a objetiva de 16 x foi de 50, 26 mm<sup>2</sup>. Para a análise do teste de esporulação, em meio líquido, foi calculado o desvio-padrão, com o auxílio do pacote estatístico SAS (SAS, 2000).

### 3.2.3 Morfologia e dimensão dos esporângios e clamidósporos

Foram preparadas dez lâminas com lactofenol para cada isolado, utilizando-se o método de esporulação em meio líquido extrato de solo não-autoclavado. As dimensões da estrutura foram determinadas pela técnica de micrometria, observada ao microscópio óptico, adotando-se como unidade de medida o micron. Foram avaliados 50 esporângios para cada isolado, uma vez que os mesmos apresentavam tamanho uniforme. As medições foram feitas ao microscópio com auxílio do micrômetro ocular previamente aferido por uma lâmina micrométrica. Em seguida, os esporângios foram posicionados na escala da ocular micrométrica, onde foram realizadas as medidas de comprimento (C) e largura (L), profundidade e largura da papila do esporângio. Também foi observada a morfologia dos esporângios.

Para os clamidósporos, foi realizado o mesmo procedimento descrito anteriormente, diferindo apenas nas medições que foram feitas do diâmetro do

clamidósporo e da espessura da parede. A objetiva utilizada para realizar as medições foi de 40 x. Foi realizada uma análise descritiva dos isolados, utilizando o programa SAS.

#### 3.2.4 Ontogenia dos esporângios

Para observar a ontogênia dos esporângios, discos de micélio dos isolados de *Phytophthora* com 5 mm de diâmetro foram transferidos para placas de Petri contendo o meio líquido extrato de solo não-autoclavado (RIBEIRO, 1978). As placas foram submetidas à temperatura de 24°C em condições de luz contínua, por 72 h. Após esse período, as placas foram levadas ao microscópio onde foi observada a ontogenia dos esporângios. A objetiva utilizada para a visualização foi de 10 x.

#### 3.2.5 Grupos de compatibilidade

Para determinar a natureza heterotática dos isolados de *Phytophthora*, foram realizados os pareamentos entre os isolados. Como padrões para os grupos de compatibilidade A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>, foram utilizados os isolados 61 e 65, da coleção de isolados de *Phytophthora* da Embrapa Florestas, respectivamente. As culturas dos isolados foram colocadas em incubadora tipo BOD por quatro dias em meio CA. Após esse período, discos de micélio dos isolados, com 5,0 mm de diâmetro, foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura CA. Os discos foram dispostos de maneira que em uma das metades da placa ficasse o isolado do grupo A<sub>1</sub> ou A<sub>2</sub> e na outra metade o isolado a ser testado, com distância entre os discos de 3 cm. Todos isolados foram pareados com os dois grupos e com ele mesmo, num total de três repetições por combinação de pareamento. Em seguida, as placas foram incubadas a 25°C em BOD por cinco dias, em condições de escuro contínuo. As avaliações consistiram da observação do fundo das placas ao microscópio óptico, e foi observada a presença ou ausência de oósporos, indicando a qual grupo de compatibilidade o isolado pertence. Quando

necessário, foram preparadas lâminas para a confirmação da presença de oósporo.

### 3.2.6 Morfologia do anterídio e dimensões do oogônio e oósporo

Para a produção das estruturas sexuais de *Phytophthora*, foi realizado o pareamento entre os grupos de compatibilidade A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub> dos isolados, como descrito anteriormente. Foram preparadas dez lâminas com lactofenol para cada isolado. As lâminas foram observadas ao microscópio óptico, na objetiva de 40 x. Foram realizadas medidas do diâmetro de oósporo e diâmetro de oogônio, totalizando 50 estruturas sexuais por isolado. Foi observada a morfologia do anterídio, em relação ao seu ponto de contato com o oogônio, caracterizando-os como anfígenos ou paráginos.

### 3.2.7 Efeito da temperatura no crescimento micelial dos isolados

Para avaliar o efeito da temperatura na taxa de crescimento micelial dos isolados, discos de 6,0 mm de diâmetro, obtidos da margem das colônias dos isolados com cinco dias, produzidos em meio de cultura BDA (200 g de batata, 17 g de ágar e 1.000 mL de água destilada), foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo o meio de cultura CA. As placas foram colocadas em incubadoras do tipo BOD durante sete dias nas temperaturas de 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 35 e 36 ± 2°C, em condições de escuro contínuo (SANTOS; LUZ; SOUZA, 2005).

A avaliação do crescimento micelial consistiu em três medições das colônias com três, cinco e sete dias de crescimento. As medições ocorreram em dois sentidos diametralmente opostos, com o auxílio de uma régua milimetrada, obtendo-se a média para cada repetição. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial, com três repetições/isolado para cada temperatura. Foi realizada a análise variância e desdobramento da interação isolado x temperatura. Para a variável isolado foi aplicado um teste de médias

(Scott-Knott) e para a variável temperatura utilizou-se análise de regressão. O pacote estatístico utilizado foi o SISVAR (FERREIRA, 2006).

### **3.3 Agressividade dos isolados**

O teste de patogenicidade foi realizado em ramos destacados de árvores de acácia-negra, com aproximadamente seis anos de idade. Foram utilizados ramos com 25 cm de comprimento e cerca de 1,5 cm de diâmetro. Os ramos destacados passaram pelo processo de desinfecção com álcool 70% e, em seguida, foram enxugados à temperatura ambiente, então as extremidades dos ramos foram vedadas com parafina líquida para diminuir a perda de água para a atmosfera (SANTOS, 1998b).

Os ramos foram colocados em bandejas previamente lavadas e desinfestadas com álcool 70% e, forradas com três camadas de papel toalha umedecida com água destilada esterilizada. Placas de Petri foram colocadas sobre o papel úmido para dar suporte aos ramos evitando que os mesmos entrassem em contato com a água. Foram dispostos dez ramos por bandeja.

Com o auxílio de um vazador de rolha de 5,0 mm de diâmetro, foram realizadas duas perfurações em cada ramo. Discos de micélio de 5,0 mm de diâmetro dos isolados de *Phytophthora*, cultivados em meio de cultura CA por cinco dias, foram colocados nas perfurações dos ramos. No ponto da inoculação, foram colocados pedaços de algodão embebidos em água destilada esterilizada para evitar o ressecamento dos discos de micélio. As bandejas foram revestidas com plástico transparente, formando uma câmara úmida. A testemunha foi inoculada apenas com discos do meio de cultura CA. As bandejas foram colocadas em bancadas permanecendo em condições de laboratório.

A patogenicidade foi avaliada dez dias após a inoculação, por meio da raspagem da região inoculada para a observação dos sintomas. A agressividade dos isolados foi avaliada juntamente com a patogenicidade, consistindo na medição do comprimento das lesões.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com dez repetições por isolado. Para a análise de variância e o teste de Scott-Knott para agrupamento, foi utilizado o pacote estatístico SISVAR (FERREIRA, 2006).

### **3.4 Caracterização molecular dos isolados**

#### **3.4.1 Isolamento de DNA**

Foram utilizados dois protocolos para a extração de DNA de *Phytophthora* sp., um deles baseado no protocolo descrito por Koenig, Ploetz e Kistler (1997), e o outro baseado no protocolo do kit para extração de DNA Plant DNAzol, da Invitrogen.

Os isolados de *Phytophthora* sp. foram cultivados em meio líquido de cenoura (200 g de cenoura; 1000 mL de água destilada) por sete dias em temperatura ambiente. O micélio foi separado por filtragem e colocado em tubos tipo Eppendorf esterilizados e armazenados em freezer.

Para extração do DNA total dos isolados, de acordo com o protocolo modificado de Koenig, Ploetz e Kistler (1997), o micélio foi macerado em nitrogênio líquido até obter a consistência de um fino pó. Aproximadamente 300  $\mu\text{L}$  do macerado foram transferidos para tubos Eppendorf, onde foram adicionados 700  $\mu\text{L}$  de tampão de extração, que consiste na mistura dos tampões de Lise Nuclear (0,2 M Tris pH 7,5; 0,05 M EDTA e 2% CTAB), tampão de Isolamento de DNA (0,2 M Tris pH 7,5; 0,05 M EDTA e 0,35 M Sorbitol) e Sarkosil 5%, nas proporções de 1:1:0,4, respectivamente. Os tubos foram homogeneizados em vórtex e incubados a 65°C por 60 min em banho-maria. Adicionaram-se as amostras, 500  $\mu\text{L}$  da mistura clorofórmio:álcool isoamílico, na proporção de 24:1 (v:v), os tubos foram agitados até formarem uma emulsão. Centrifugaram-se as amostras a 12.000 rpm por 10 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido com cuidado para não carregar partículas de micélio, e transferido para novos tubos Eppendorf. Aos tubos foram adicionados 5,0  $\mu\text{L}$  de uma suspensão, contendo 20 mg  $\text{mL}^{-1}$  de RNase, e

incubados a 37°C por 30 min em banho-maria. Em seguida, foram adicionados 5,0 µL de Proteinase K e os tubos incubados a 37°C por 20 min. Adicionaram-se às amostras 600 µL de isopropanol. Os tubos foram invertidos gentilmente para precipitação do DNA, e posteriormente centrifugados a 12.000 rpm por 5 min para descarte do sobrenadante. O *pellet* do DNA precipitado foi lavado adicionando-se 100 µL de etanol 70% e centrifugado a 12.000 rpm por 5 min, por três vezes. O *pellet* e as paredes dos tubos foram secos em temperatura ambiente em capela de fluxo laminar. Depois de seco, o DNA foi ressuspensionado em 100 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1 mM EDTA). As amostras de DNA foram mantidas a 4°C.

O outro protocolo, baseado no kit Plant DNAzol da Invitrogen, utilizou aproximadamente 100 mg de micélio dos isolados, os quais foram macerados em nitrogênio líquido até obter um fino pó que foi transferido para tubos Eppendorf de 1,5 mL. Adicionaram-se 300 µL do reagente Plant DNAzol e homogeneizaram-se as amostras em agitador tipo vórtex, os tubos foram incubados a 25°C por 5 min. Na sequência, adicionaram-se 300 µL de clorofórmio incubando os tubos sobre as mesmas condições anteriores. Centrifugaram-se as amostras a 14.000 rpm por 4 min, removendo o sobrenadante para tubos limpos, onde foi adicionado 225 µL de etanol 100% para a precipitação do DNA. As amostras foram centrifugadas a 9.400 rpm por 4 min descartando-se o sobrenadante, em seguida adicionou-se 300 µL da mistura Plant DNAzol mais etanol 70% na proporção de 1:0,75 (v:v), homogeneizando os tubos em vórtex e armazenando-os à temperatura ambiente por 5 min. Centrifugaram-se as amostras a 9.400 rpm por 4 min descartando-se o sobrenadante; para lavar o *pellet* adicionaram-se 300 µL de etanol 75% seguido de centrifugação e descarte do sobrenadante. O *pellet* e as paredes dos tubos foram colocados para secar em capela de fluxo laminar até completa evaporação do etanol. O DNA foi ressuspensionado adicionando-se 70 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1 mM EDTA) e as amostras foram mantidas a 4°C.



### 3.4.2 Reação da polimerase em cadeia (PCR)

Para a amplificação das regiões ITS1, ITS2 e 5.8S do DNA ribossômico (rDNA), foram empregados os pares de *primers* IST5/ITS2 e ITS4/ITS3 (Figura 1), conforme o protocolo descrito por White et al. (1990). A reação de PCR foi executada com volume total de 100 µL, contendo DNA genômico, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 10xPCR Buffer, 0,2 mM de cada um dos dNTP, dATP, dCTP, dGTP e dTTP, 1 U de Taq polimerase (Promega) e 1mM de cada *primer*. Todas reações foram baseadas em 30 ciclos, sendo: 1 min a 94°C; 1 min 61°C; e 2 min a 72°C. Previamente aos ciclos, as amostras foram submetidas à temperatura de 94°C por 1 min, e de um período extra de extensão de 5 min a 72°C após os 30 ciclos. As reações de amplificação foram conduzidas em um termociclador Tpersonal Whatman Biometra (Biometra GmbH, Goettingen, Alemanha). Os produtos da reação de PCR foram purificados com o PureLink™ PCR Purification kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), e o sequenciamento direto foi realizado com o aparelho ABI Prism 377 DNA Sequencer (PE Applied Biosystem, Norwalk, CT, EUA), no Laboratório de Bioquímica Fitopatológica, do Instituto Biológico, São Paulo, São Paulo.

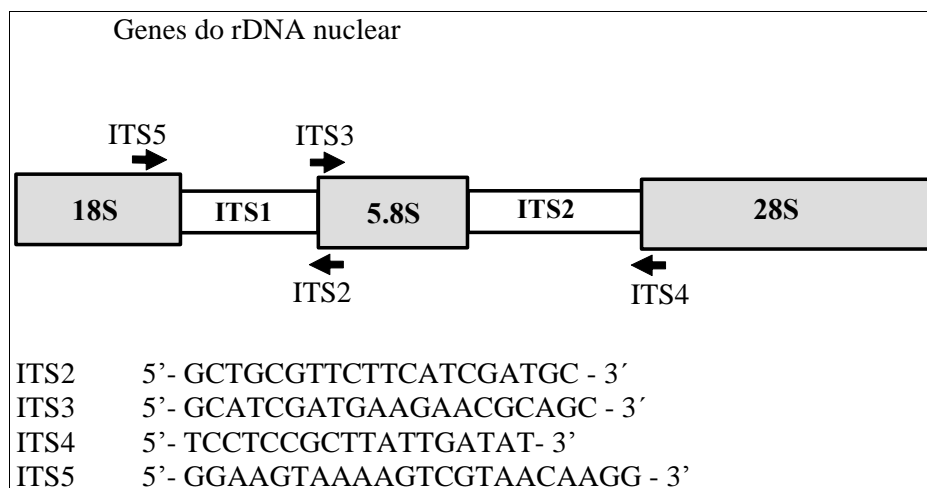


Figura 1 – Mapa do gene do DNA ribossomal nuclear, com a localização dos *primers* (Baseado em WHITE et al., 1990).

### 3.4.3 Análise dos dados

Seguindo Schneider (2003), as sequências de rDNA dos isolados foram comparadas com sequências de *Phytophthora* spp. disponíveis no *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Alinhamentos múltiplos foram obtidos utilizando-se o programa CLUSTAL W disponível on-line pelo endereço eletrônico (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>). A partir dos alinhamentos, foram inferidas árvores filogenéticas com o programa PAUP\*4.0 (Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, EUA) utilizando-se o método de máxima parcimônia (*maximum parsimony*), com o procedimento de busca heurística (*heuristic search/ stepwise addition/ random search*) e o método de agrupamento de vizinhos (*neighbor joining*). Os ramos das árvores foram testados por *bootstrap*, com 1.000 repetições.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Caracterização morfofisiológica dos isolados

#### 4.1.1 Características culturais e morfológicas

Foram obtidos 12 isolados associados à gomose da acácia-negra, provenientes de diferentes localidades da região sul do Brasil. As colônias em meio de cultura CA apresentaram micélio aéreo variando de denso a pouco denso. Foram ainda observados seis padrões de colônia sendo essas classificadas como: estrelado, cotonoso, rosáceo, estrelado para rosáceo, ligeiramente estrelado e ligeiramente rosáceo (Tabela 2, Figura 2).

Tabela 2 – Características culturais dos isolados de *Phytophthora* sp. da acácia-negra em meio de cultura CA.

Isolados	Colônias (CA)		Esporângios
	Tipo de colônia	Micélio	Forma
2	Estrelado para rosáceo	Aéreo, denso	Maioria ovoide, presença globoso
12	Ligeiramente estrelado	Aéreo, não muito denso	Maioria ovoide, presença obpiriforme
17	Cotonoso	Aéreo, denso	Ovoides
23	Ligeiramente rosáceo	Aéreo, não muito denso	Maioria ovóide, presença obpiriforme
61	Ligeiramente estrelado	Aéreo, não muito denso	Maioria ovoide, presença globoso
65	Ligeiramente estrelado	Aéreo, não muito denso	Maioria ovoide, presença obpiriforme
73	Rosáceo	Aéreo, não muito denso	Maioria ovoide, presença elipsoides
80	Cotonoso	Aéreo, denso	Ovoides
92	Cotonoso	Aéreo, não muito denso	Maioria ovoides, presença elipsoides
111	Estrelado	Aéreo, pouco denso	Maioria ovoide, presença globoso
AM5	Cotonoso	Aéreo, denso	Maioria ovoide, presença obpiriforme
AN2003	Cotonoso	Aéreo, denso	Maioria ovoide

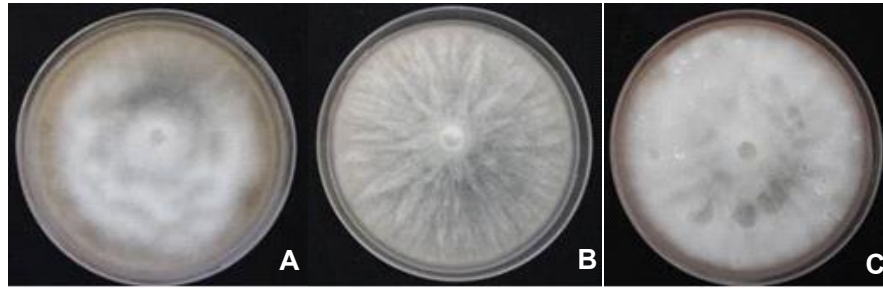


Figura 2 – Morfologia das culturas de *Phytophthora* sp. da acácia-negra a 24°C com sete dias de cultivo em meio de cultura CA: (A) padrão ligeiramente rosáceo, (B) padrão estrelado e (C) padrão cotonoso.

A produção dos esporângios foi abundante em extrato de solo não-autoclavado em luz contínua, apresentando esporângios papilados, persistentes, formados individualmente ou algumas vezes irregularmente simpodial (Figura 3).

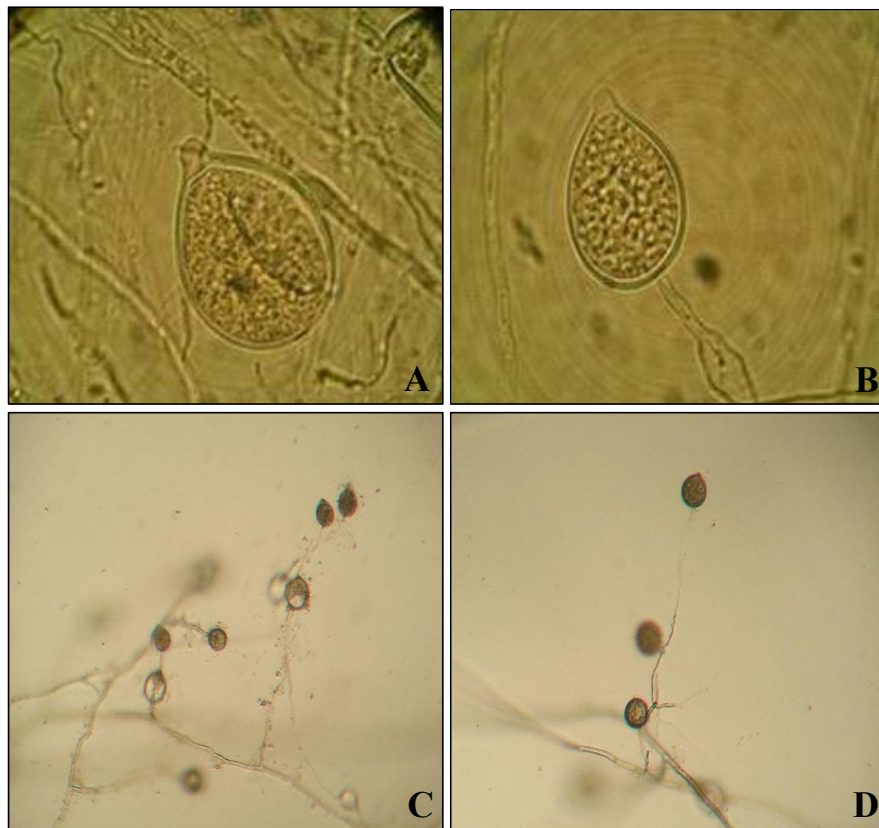


Figura 3 – Características dos esporângios de *Phytophthora* sp.: (A) esporângio papilado, (B) esporângio persistente, (C, D) ontogenia irregularmente simpodial.

Quanto à forma, os isolados apresentaram esporângios predominantemente ovoides, embora algumas outras formas também estivessem presentes, como elipsoides, obovoide, globoso, obpiriforme, e algumas vezes formas distorcidas (Tabela 2) (Figura 4).

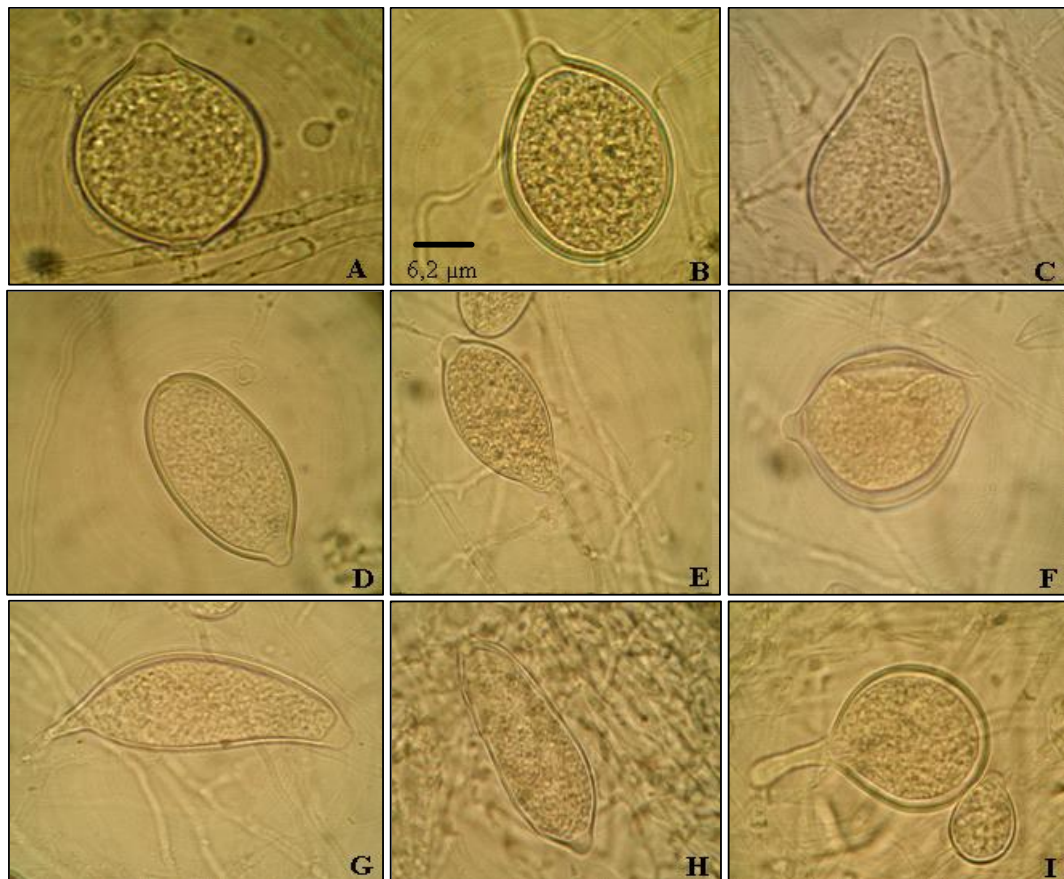


Figura 4 – Forma do esporângio. (A) globoso, (B) ovoide, (C) obpiriforme, (D) elipsoide, (E) obovoide, (F) bipapilado, (G, H, I) formas distorcidas.

As medidas dos esporângios estão representadas pela Tabela 3. Foram consideradas as medidas de comprimento e largura dos esporângios, as quais variaram de 27,90 – 74,74 x 21,70 – 52,70 µm (média 53,67 x 37,67 µm), a relação C/L foi de 1,43:1, profundidade média da papila de 7,02 µm e abertura do poro 7,15 µm.

Tabela 3 – Dimensões dos esporângios dos isolados de *Phytophthora* sp. Da acácia-negra em extrato de solo.

Isolados	Esporângio (µm)			Papila (µm)	
	Comprimento (C)	Largura (L)	C/L	Profundidade	Largura
2	43,40 <sup>1</sup> – 57,41 <sup>2</sup> – 68,20 <sup>3</sup> (± 6,08) <sup>4</sup>	31,00 – 38,75 – 49,60 (± 4,61)	1,5	6,20 – 6,45 – 9,30 (± 0,85)	6,20 – 7,32 – 9,3 (± 1,5)
12	31,00 – 56,79 – 71,60 (± 8,55)	21,70 – 39,68 – 46,50 (± 5,53)	1,4	3,10 – 7,69 – 12,40 (± 2,00)	6,20 – 8,56 – 12,40 (± 1,6)
17	46,50 – 54,06 – 62,00 (± 4,16)	34,10 – 41,29 – 49,60 (± 3,40)	1,3	6,20 – 7,50 – 9,30 (± 1,55)	6,20 – 7,38 – 9,3 (± 1,52)
23	49,60 – 53,75 – 62,00 (± 3,11)	27,90 – 34,10 – 40,30 (± 2,80)	1,6	6,20 – 7,13 – 9,30 (± 1,44)	6,20 – 6,94 – 9,30 (± 1,34)
61	37,20 – 44,76 – 52,70 (± 3,71)	27,90 – 33,54 – 40,30 (± 3,24)	1,3	6,20 – 6,45 – 9,30 (± 0,85)	6,20 – 6,32 – 9,30 (± 0,61)
65	43,40 – 51,46 – 55,80 (± 3,07)	34,10 – 37,57 – 55,80 (± 3,07)	1,4	3,10 – 6,88 – 9,30 (± 1,44)	6,20 – 6,88 – 9,30 (± 1,30)
73	27,90 – 55,24 – 68,20 (± 7,71)	27,90 – 55,24 – 40,30 (± 2,04)	1,6	6,20 – 7,56 – 12,40 (± 1,68)	6,20 – 6,88 – 9,30 (± 1,30)
80	46,50 – 55,24 – 71,30 (± 6,88)	27,90 – 34,91 – 46,50 (± 5,34)	1,5	6,20 – 7,13 – 12,40 (± 1,57)	6,20 – 6,57 – 9,30 (± 1,02)
92	52,70 – 59,27 – 68,20 (± 4,41)	31,00 – 37,76 – 46,50 (± 3,24)	1,4	6,20 – 7,25 – 9,30 (± 1,48)	6,20 – 8,18 – 9,30 (± 1,50)
111	43,40 – 50,28 – 62,00 (± 3,93)	37,20 – 43,15 – 52,70 (± 3,25)	1,4	6,20 – 6,94 – 6,30 (± 1,34)	6,20 – 6,20 – 6,20 (± 0,00)
AM5	49,60 – 56,79 – 74,74 (± 5,18)	27,90 – 36,02 – 43,40 (± 3,80)	1,6	3,10 – 6,57 – 9,30 (± 1,19)	6,20 – 8,12 – 12,40 (± 1,64)
AN2003	40,30 – 49,04 – 58,90 (± 4,04)	31,00 – 38,19 – 43,40 (± 3,16)	1,3	6,20 – 6,76 – 9,30 (± 1,20)	6,20 – 6,45 – 9,30 (± 0,85)

<sup>1</sup>Limite superior; <sup>2</sup>Média de 50 esporângios; <sup>3</sup>Limite inferior; <sup>4</sup>Desvio-padrão.

Foi observada a formação de clamidósporos globosos para todos isolados, estes apresentaram-se terminais ou intercalares (Figura 5C, 5D) com diâmetro de 24,8 – 55,80 µm (média de 37,16 µm) e espessura da parede de 1,55 – 6,20 µm (média 3,17 µm) (Tabela 4).

Tabela 4 – Dimensões dos clamidósporos dos isolados de *Phytophthora* sp. da acácia-negra em extrato de solo.

Isolados	Clamidósporo (µm)	
	Diâmetro	Espessura da parede
2	55,80 <sup>1</sup> – 40,92 <sup>2</sup> – 31,00 <sup>3</sup> (± 4,77) <sup>4</sup>	3,10 – 2,85 – 1,55 (± 0,57)
12	49,60 – 41,35 – 31,00 (± 4,46)	3,10 – 3,10 – 3,10 (± 0,00)
17	49,60 – 37,63 – 31,00 (± 3,86)	4,65 – 3,25 – 3,10 (± 0,47)
23	46,50 – 38,94 – 31,00 (± 4,21)	3,10 – 3,04 – 1,55 (± 0,31)
61	43,40 – 35,03 – 31,00 (± 3,08)	3,10 – 3,10 – 3,10 (± 0,00)
65	43,40 – 34,29 – 27,90 (± 5,51)	4,65 – 3,10 – 1,55 (± 0,31)
73	52,70 – 35,46 – 27,90 (± 5,13)	4,65 – 3,13 – 3,10 (± 0,22)
80	46,50 – 36,83 – 31,00 (± 4,23)	6,20 – 3,38 – 3,10 (± 0,75)
92	55,80 – 38,07 – 31,00 (± 5,94)	6,20 – 3,44 – 1,55 (± 0,95)
111	49,60 – 36,64 – 31,00 (± 4,28)	4,65 – 3,16 – 3,10 (± 0,31)
AM5	46,50 – 32,74 – 24,80 (± 4,78)	3,10 – 2,88 – 1,55 (± 0,54)
AN2003	49,60 – 38,01 – 31,00 (± 3,80)	6,20 – 3,66 – 3,10 (± 0,81)

<sup>1</sup>Limite superior; <sup>2</sup>Média de 50 clamidósporos; <sup>3</sup>Limite inferior; <sup>4</sup>Desvio-padrão.



Figura 5 – Forma dos oósporos e clamidósporos: (A, B) oósporo aplerótico, com anterídio anfígeno, (C) clamidósporo intercalar, (D) clamidósporo terminal.

#### 4.1.2. Teste de compatibilidade

Pelos cruzamentos realizados, foi comprovada a natureza heterotática dos isolados de *Phytophthora* sp., com presença dos grupos de compatibilidade A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>, os quais podem ser observados na Tabela 5. A formação dos oósporos foi observada após cinco dias de incubação no escuro, na junção das duas colônias dos isolados pareados na mesma placa (Figura 6B). Só houve produção de oósporo quando os isolados de grupos de compatibilidade diferentes foram pareados.



Tabela 5 – Grupo de compatibilidade, dimensões do oogônio e oósporo, e morfologia do anterídio dos isolados de *Phytophthora* sp. da acácia-negra.

Isolados	Grupos de compatibilidade A <sub>1</sub> = 61 e A <sub>2</sub> = 65	Diâmetro (µm)	
		Oogônio	Oósporo
2	A <sub>1</sub>	21,70 <sup>1</sup> – 27,03 <sup>2</sup> – 34,10 <sup>3</sup> (± 2,57) <sup>4</sup>	18,60 – 21,51 – 24,80 (± 1,95)
12	A <sub>2</sub>	26,35 – 30,66 – 34,10 (± 1,62)	18,60 – 23,50 – 29,45 (± 2,77)
17	A <sub>1</sub>	24,80 – 30,26 – 24,10 (± 1,94)	18,60 – 24,06 – 27,90 (± 1,72)
23	A <sub>2</sub>	24,80 – 29,51 – 34,10 (± 2,57)	15,50 – 23,37 – 27,90 (± 2,23)
61	A <sub>1</sub>	24,80 – 29,95 – 34,10 (± 2,06)	18,60 – 23,99 – 26,35 (± 1,57)
65	A <sub>2</sub>	24,80 – 29,95 – 34,10 (± 2,06)	18,60 – 23,99 – 26,35 (± 1,57)
73	A <sub>2</sub>	23,25 – 28,74 – 37,20 (± 2,41)	18,60 – 23,13 – 32,55 (± 2,40)
80	A <sub>2</sub>	24,80 – 28,99 – 37,20 (± 2,86)	18,60 – 23,37 – 27,90 (± 2,60)
92	A <sub>2</sub>	24,80 – 28,09 – 31,00 (± 1,65)	20,15 – 22,69 – 26,35 (± 1,36)
111	A <sub>2</sub>	24,80 – 29,05 – 31,00 (± 1,62)	21,70 – 23,50 – 29,45 (± 1,64)
AM5	A <sub>1</sub>	26,35 – 31,25 – 37,20 (± 2,94)	21,70 – 25,54 – 32,55 (± 2,72)
AN2003	A <sub>2</sub>	24,80 – 28,71 – 34,10 (± 1,91)	20,15 – 23,06 – 27,90 (± 1,73)

<sup>1</sup>Limite superior; <sup>2</sup>Média de 50 oogônios; <sup>3</sup>Limite inferior; <sup>4</sup>Desvio-padrão.

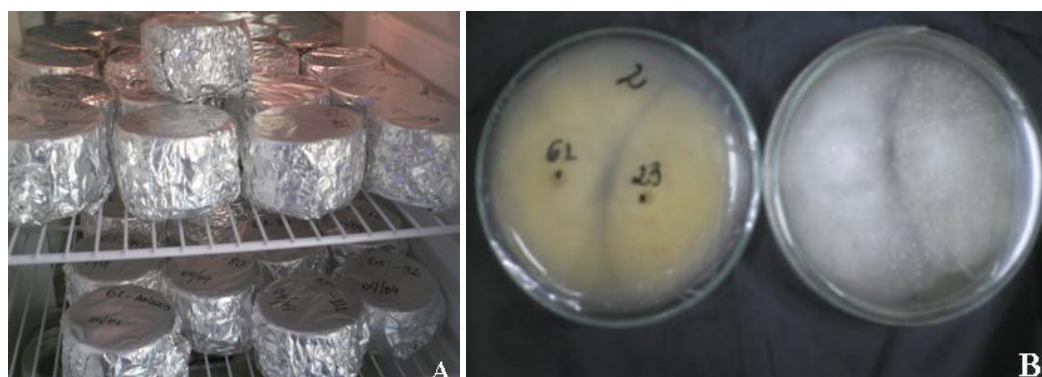


Figura 6 – Teste de compatibilidade: (A) placas de Petri, no teste de pareamento entre os isolados de *Phytophthora* sp., (B) placas de Petri com culturas pareadas de *Phytophthora* sp.

#### 4.1.3 Morfologia do anterídio e dimensões do oogônio e oósporo

A formação dos gametângios ocorreu em meio de cultura CA, após cinco dias no escuro contínuo. Os oogônios apresentaram diâmetro de 21,70 – 37,20  $\mu\text{m}$  (média de 29,29  $\mu\text{m}$ ). Os oósporos apresentaram-se globosos, apleróticos, com diâmetro de 15,50 – 32,55  $\mu\text{m}$  (média 23,43  $\mu\text{m}$ ) e não foram observadas ornamentações nas paredes em nenhum dos isolados (Tabela 5; Figura 5). Todos isolados apresentaram anterídio anfígeno.

#### 4.1.4 Teste de esporulação em meios líquido

Foi observado que os meios líquidos testados na esporulação de *Phytophthora* sp. interferem na produção dos esporângios. Houve diferença entre os meios, sendo o extrato de solo não autoclavado, o melhor meio líquido testado, apresentando as maiores médias de esporulação por  $\text{mm}^2$  (Tabela 6).

Tabela 6 – Influência do meio de cultura líquido na produção de esporângios em isolados de *Phytophthora* sp. da acácia-negra.

Meios líquidos	Esporângios / $\text{mm}^2$
H <sub>2</sub> O destilada esterilizada	0,21 ( $\pm$ 0,16)*
H <sub>2</sub> O destilada	0,25 ( $\pm$ 0,26)
Solução KNO <sub>3</sub>	0,64 ( $\pm$ 0,39)
Extrato de solo autoclavado	0,31 ( $\pm$ 0,29)
Extrato de solo não autoclavado	1,14 ( $\pm$ 0,37)
H <sub>2</sub> O de lagoa autoclavada	0,40 ( $\pm$ 0,39)
H <sub>2</sub> O de lagoa não autoclavada	0,56 ( $\pm$ 0,26)

\*Média de produção de esporângio em cinco campos de observação; Desvio-padrão.

#### 4.1.5 Efeito da temperatura no crescimento micelial dos isolados

Foi observado o efeito significativo da temperatura no crescimento micelial dos isolados de *Phytophthora* sp., havendo variação tanto para temperatura como entre os isolados (Tabela 7).

Tabela 7 – Comparação entre as médias de crescimento micelial (mm) dos isolados de *Phytophthora* sp. De acácia-negra, no meio de cultura CA em oito temperaturas diferentes.

Isolados	Temperaturas (°C)							
	8	12	16	20	24	28	32	36
2	23.50 a	49.50 a	78.83 a	84.83 ns	85.00 ns	85.00 ns	9.00 a	6.00 ns
12	19.17 a	44.00 a	79.17 a	85.00 ns	85.00 ns	85.00 ns	28.00 b	6.83 ns
17	12.67 b	33.00 b	72.50 b	81.00 ns	85.00 ns	85.00 ns	70.17 d	7.83 ns
23	26.67 a	44.83 a	82.17 a	84.17 ns	85.00 ns	85.00 ns	27.00 b	6.67 ns
61	15.00 b	37.83 b	76.33 b	80.17 ns	85.00 ns	84.83 ns	79.50 e	7.17 ns
65	10.50 b	35.83 b	74.17 b	83.17 ns	85.00 ns	85.00 ns	78.83 e	7.17 ns
73	21.83 a	44.67 a	79.83 a	81.17 ns	83.17 ns	84.67 ns	9.33 a	7.00 ns
80	12.33 b	34.33 b	74.67 b	82.17 ns	85.00 ns	85.00 ns	78.33 e	8.00 ns
92	13.33 b	29.50 b	61.00 c	77.67 ns	84.83 ns	85.00 ns	74.83 d	8.17 ns
111	6.33 b	31.67 b	73.33 b	82.67 ns	85.00 ns	84.83 ns	48.50 c	11.83 ns
AM5	11.33 b	37.50 b	80.33 a	85.00 ns	85.00 ns	84.50 ns	6.67 a	6.33 ns
AN2003	17.50 a	40.50 a	71.83 b	80.00 ns	85.00 ns	85.00 ns	78.50 e	7.17 ns

Médias seguidas por letras distintas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, em nível de 5% de probabilidade.

ns, não significativo (P = 0,05)

Houve pouco crescimento micelial entre os isolados aos 36°C, apenas o isolado 111 teve um leve incremento, não diferindo estatisticamente dos demais isolados. O maior diâmetro das colônias foi observado entre 20 e 28°C. Todos os isolados apresentaram crescimento micelial a 8°C, exceto o isolado 111. As

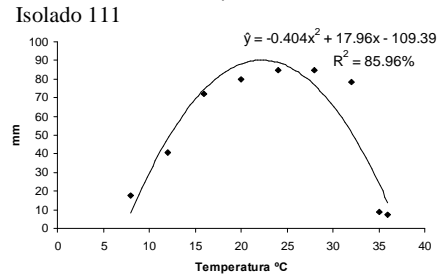
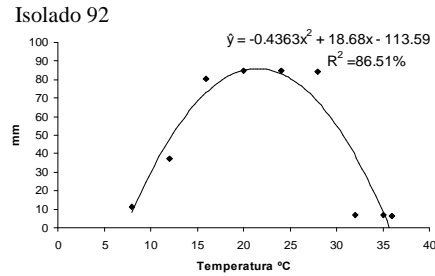
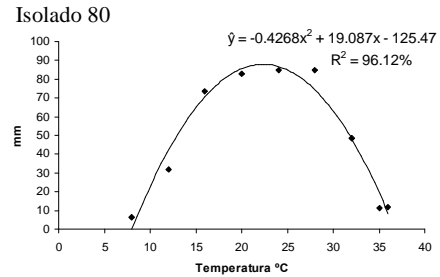
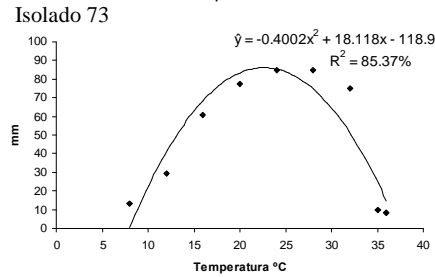
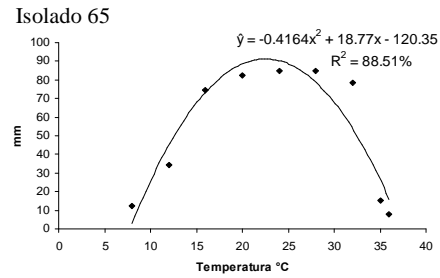
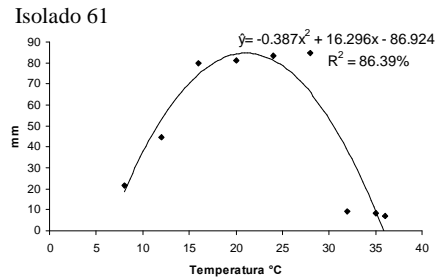
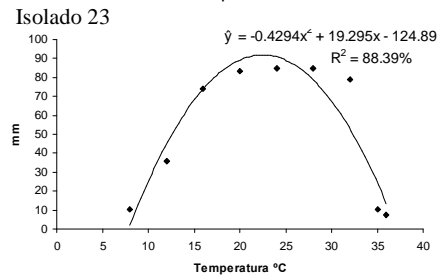
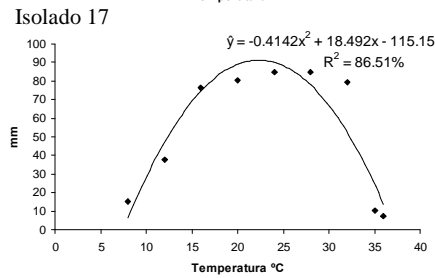
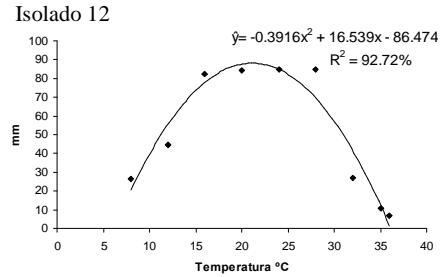
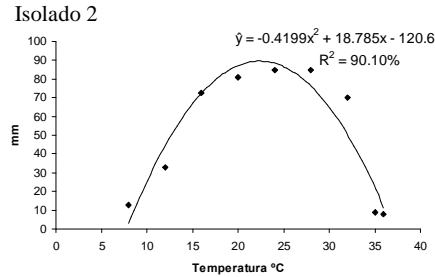
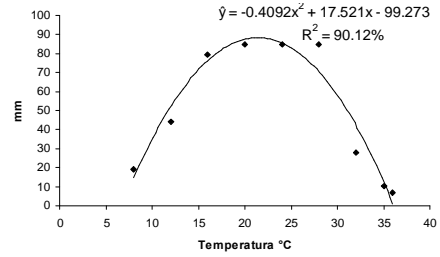
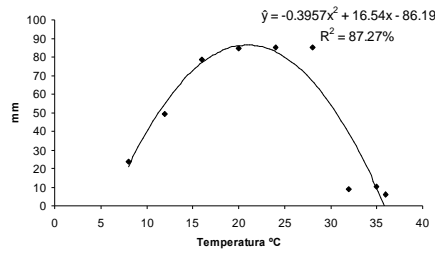
curvas de crescimento para o desdobramento de temperatura para cada isolado estão representadas pela Figura 7. Através das equações ajustadas por regressão, temperatura em função do crescimento micelial, estimou-se a temperatura ótima de crescimento micelial, ou seja, temperatura na qual foi observado maior pico de crescimento micelial para cada isolado (Tabela 8).

Tabela 8 – Temperatura ótima e ponto de máximo crescimento micelial dos isolados de *Phytophthora* sp.

Isolados	Pico de crescimento micelial (mm)	Temperatura ótima (°C)
2	86,7 <sup>1</sup>	20,9 <sup>2</sup>
12	88,3	21,4
17	89,5	23,4
23	88,1	21,1
61	91,2	22,3
65	91,9	22,5
73	84,9	21,0
80	91,2	22,5
92	86,2	22,6
111	86,2	22,4
AM5	86,5	21,4
AN2003	90,2	22,2

<sup>1</sup> Maior crescimento micelial correspondente à temperatura ótima.

<sup>2</sup> Temperatura estimada pelas equações ajustadas por regressão.



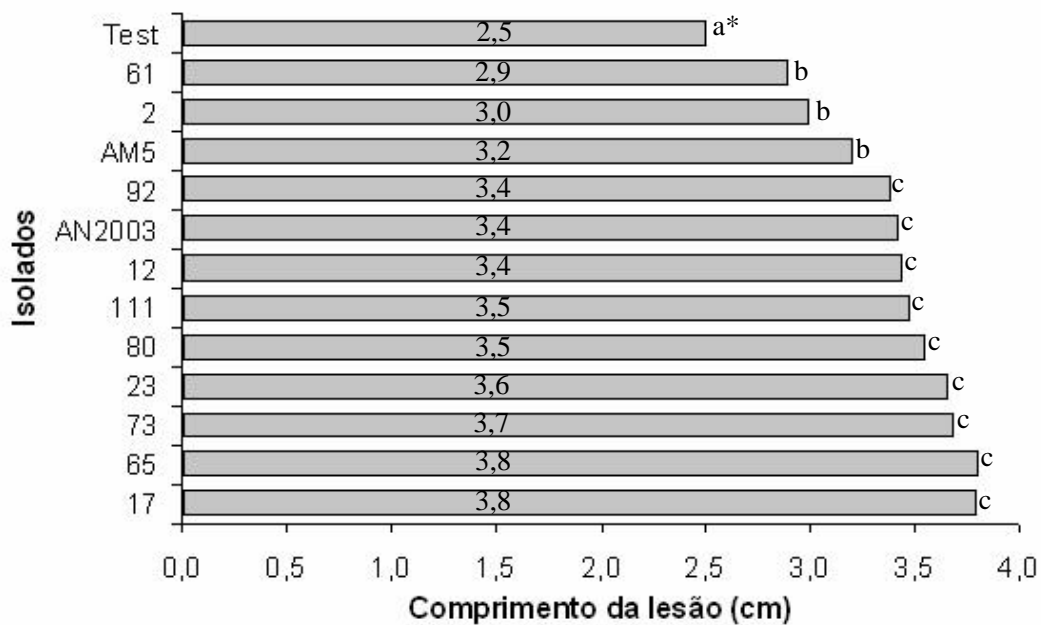
Isolado AM5

Isolado AN2003

Figura 7 – Equações ajustadas a partir do desdobramento da variável temperatura dentro de cada isolado.

## 4.2. Agressividade dos isolados

Todos os isolados foram patogênicos a acácia-negra, formando lesões nos ramos inoculados. A testemunha apresentou escurecimento da região circunvizinha ao ponto de inoculação, pela injúria causada pela retirada do tecido. Os sintomas observados nos ramos inoculados com o patógeno foram escurecimento sem exsudação de goma. Quanto à agressividade dos isolados houve diferença significativa para o tamanho das lesões, quando agrupados pelo teste de Scott-Knott ( $p = 0,05$ ) sendo os isolados AN2003, 111, 12, 80, 23, 73, 65, 92 e 17 mais agressivos, apresentando tamanho de lesões maiores que os isolados 61, 2, AM5. Todos os isolados diferiram da testemunha. Os dados foram transformados para logaritmo, e estão representados na Figura 8.



\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de agrupamento Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Test = testemunha.

Figura 8 – Comprimento das lesões em ramos destacados de acácia-negra inoculados com isolados de *Phytophthora* sp.

### 4.3 Caracterização molecular

Os segmentos das regiões 5.8S-ITS do rDNA amplificados dos isolados de *Phytophthora* sp. procedentes da acácia-negra apresentaram o mesmo tamanho para cada par de *primers*, sendo aproximadamente 600 pares de base para os *primers* ITS4/ITS3 e 350 pares de base para os *primers* ITS5/ITS2 (Figura 9).

A homologia de bases de DNA entre os isolados de *Phytophthora* da acácia-negra, analisados neste trabalho, variou de 95 a 100%. Entre as sequências de DNA dos isolados de *Phytophthora* da acácia-negra e as sequências obtidas do *GenBank*, foi observada maior homologia com a nova espécie descrita, *P. bisheria* Z.G. Abad, J.A Abad e F.J. Louws (ABAD et al., 2008), variando de 91 a 92%, seguido da espécie *P. nicotianae* com homologia variando de 82 a 83%.

Dos 898 nucleotídeos, ou seja, caracteres do rDNA analisados de cada isolado, 386 caracteres foram considerados sítios informativos para parcimônia (*parsimony-informative characters*) e 134 caracteres foram variáveis, porém não informativos para parcimônia (*variable characters parsimonu-uninformative*).

A árvore filogenética inferida pelo método de máxima parcimônia, resultante do consenso de dez árvores mais parcimoniosas, mostrou que os isolados da acácia-negra originados do Brasil formaram dois grupos (clados) com suporte pelo teste de *bootstrap* de 100% (Figura 10). O Grupo I foi formado pelos isolados Phy 12, Phy 73, Phy 02, AM5 e Phy23; e o Grupo II pelos isolados Phy 65, Phy 92, AN2003, Phy 111, Phy 17 e Phy 61. Esses dois grupos formaram um clado com *bootstrap* de 100%, o qual incluiu a espécie do *GenBank* *P. bisheria*.

A árvore filogenética inferida pelo método de vizinhos (*neighbor joining*) apresentou topologia um pouco diferenciada em relação à árvore inferida por máxima parcimônia (Figura 11). No entanto, também agrupou os isolados de *Phytophthora* da acácia em dois grupos com suporte pelo teste de *bootstrap* de 68% (grupo I) e 100% (grupo II), contendo os mesmos isolados da árvore

inferida por máxima parcimônia. Nesse caso, a espécie do *GenBank* *P. bisheria* agrupou-se no Grupo I, evidenciando maior similaridade com Phy 12, Phy 73, Phy 02, AM5 e Phy23.

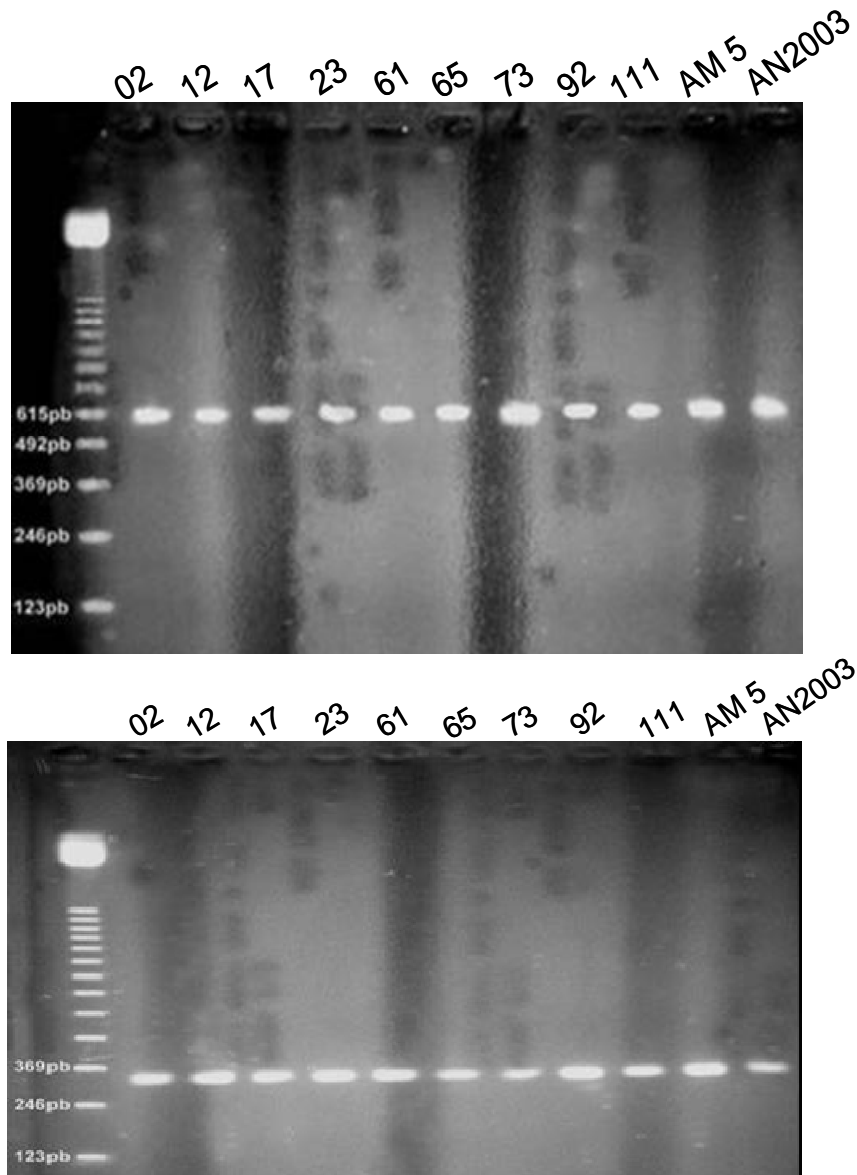


Figura 9 – Gel de agarose mostrando o produto de PCR obtido com os pares de primers ITS4/ITS3 (A) e ITS5/ITS2 (B), compreendendo as regiões ITS1, ITS2 e 5.8S do rDNA de *Phytophthora* sp. da acácia-negra.



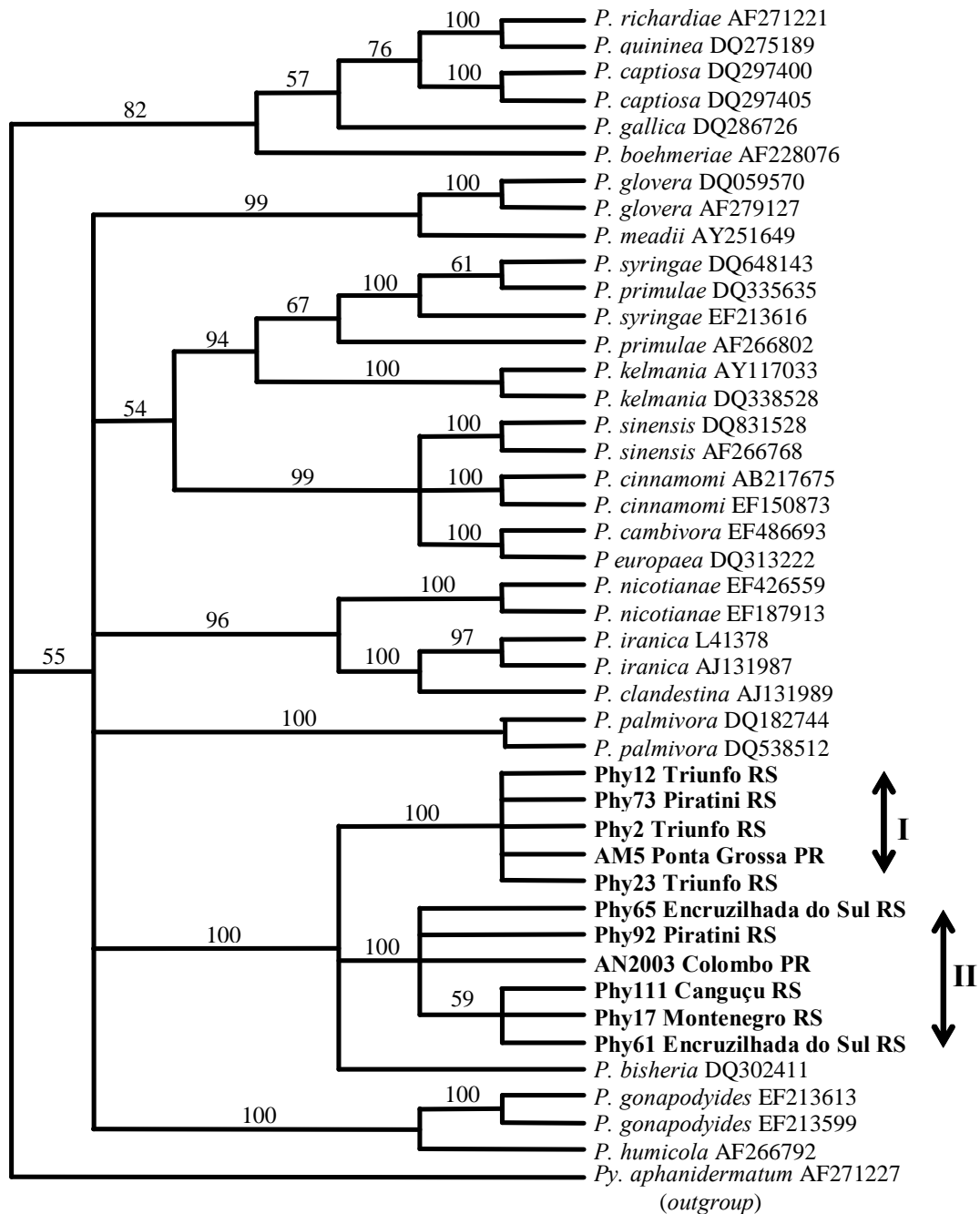


Figura 10 – Árvore filogenética consenso inferida pelo método de máxima parcimônia, a partir de sequências de DNA das regiões ITS1, ITS2 e 5.8S do rDNA de isolados de *Phytophthora* sp. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* na qual as repetições foram observadas (1.000 repetições). As sequências de rDNA dos isolados em negrito foram obtidas neste trabalho, enquanto as demais sequências foram obtidas do *GenBank* (com o número de acesso).

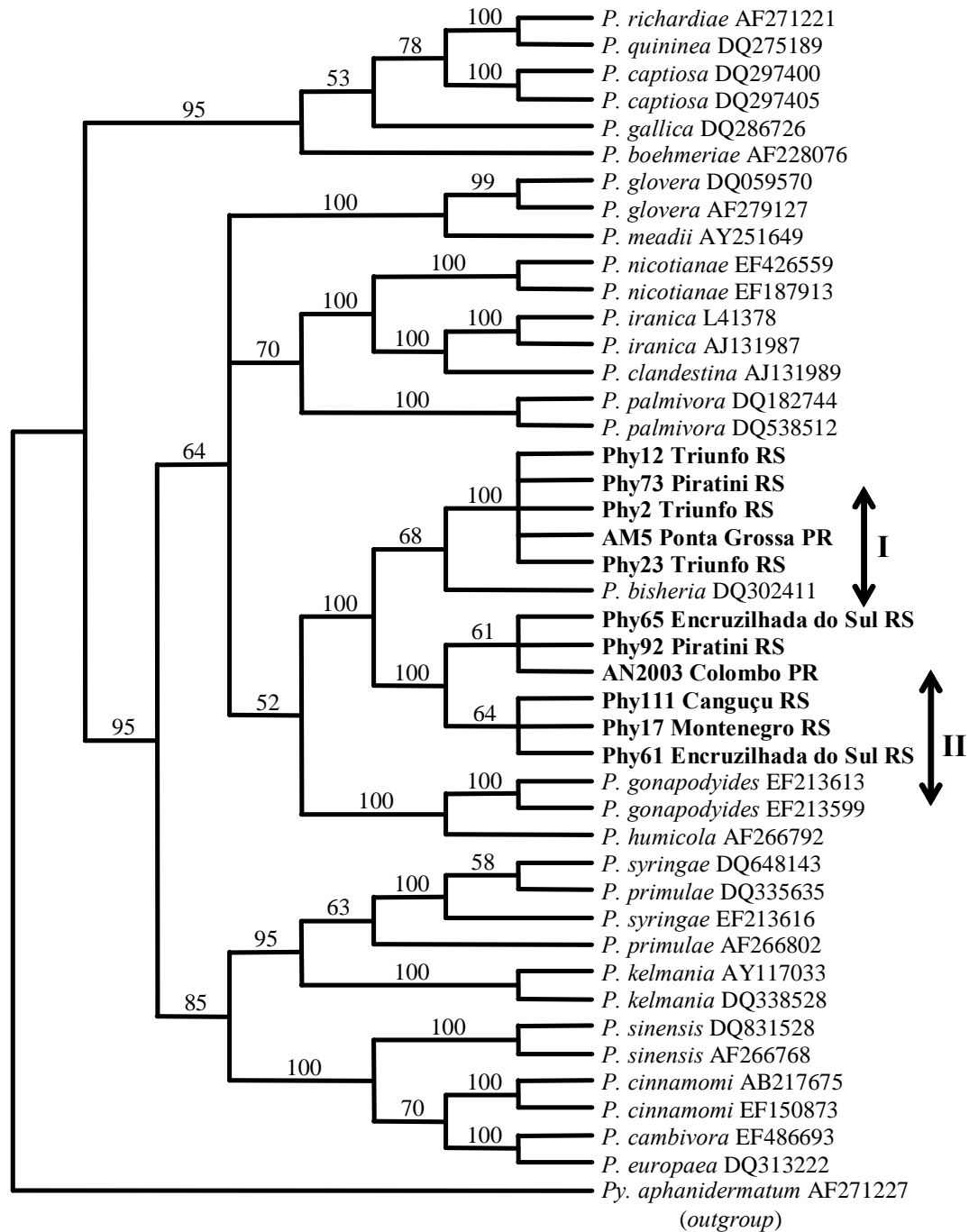


Figura 11 – Árvore filogenética inferida pelo método de agrupamento de vizinhos, a partir de seqüências de DNA das regiões ITS1, ITS2 e 5.8S do rDNA de isolados de *Phytophthora* sp. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* nas quais as repetições foram observadas (1.000 repetições). As seqüências de rDNA dos isolados em negrito foram obtidas neste trabalho, enquanto as demais seqüências foram obtidas do *GenBank* (com o número de acesso).

## 5. DISCUSSÃO

O presente trabalho caracterizou e identificou 12 isolados de *Phytophthora* sp., obtidos da casca de árvores de acácia-negra com sintomas de gomose. Os isolados foram coletados de amostras de cascas provenientes de plantios comerciais localizados nas principais áreas produtoras de acácia-negra do Rio Grande do Sul e também em algumas áreas experimentais do Estado do Paraná. Por anos, as causas da gomose da acácia-negra permaneceram obscuras, pela exsudação de goma ser provocada por diversos fatores. Na tentativa de elucidar o envolvimento de fitopatógenos associados à gomose da acácia-negra, um dos trabalhos pioneiros foi realizado na África do Sul por Zeijlemaker (1968) ao investigar as lesões da casca de árvores infectadas pela doença. O autor observou várias espécies de fungos, entre elas, uma espécie de *Phytophthora* aparecia com maior frequência. Com base na morfologia dos esporângios e na temperatura de crescimento dos isolados, Zeijlemaker caracterizou o agente causal da gomose em acácia-negra como *Phytophthora nicotianae*. Mais recentemente essa mesma espécie de *Phytophthora* foi identificada causando a gomose em plantios comerciais de acácia-negra no Brasil (SANTOS; LUZ; SOUZA, 2005).

As características morfológicas da espécie *P. nicotianae* de acordo com Erwin e Ribeiro (1996) são: esporângios papilados, persistentes apresentando várias formas como elipsoide, ovoide, piriforme, obpiriforme e esférico, medindo 11 a 60 µm de comprimento e 20 a 45 µm de largura, com relação C/L 1,1 a 1,7; esporângios papilados produzidos isoladamente ou em arranjo irregularmente simpodial; clamidósporos normalmente abundantes, podendo ser terminal ou intercalar e medindo de 13 a 60 µm de diâmetro; a maioria dos isolados são heterotáticos com anterídio anfígeno e oogônios esféricos medindo de 15 a 64 µm de diâmetro, oósporos apleróticos de 13 a 35 µm de diâmetro; temperatura

mínima de crescimento varia de 5 a 7°C, temperatura ótima de 27 a 32°C e temperatura máxima 37°C.

Os isolados em estudo apresentaram como características fortes para a identificação morfológica da espécie de *Phytophthora*, esporângios papilados, persistentes e posição de anterídio anfigeno. A presença de papila nos esporângios é característica das espécies dos Grupos I e II de Waterhouse, enquanto que a posição de anterídio anfigeno é característica apenas do Grupo II (STAMPS et al., 1990). Com base nessas características, os isolados foram identificados como pertencentes ao Grupo II de Waterhouse.

Esporângios papilados e persistentes foram observados por Santos, Luz e Souza (2005) em isolados de *P. nicotianae*, patogênicos a acácia-negra. Essa característica morfológica separa os isolados em estudo da espécie *P. boehmeriae* relatada no Brasil, também ocorrendo em acácia-negra. Pertencendo ao Grupo II de Waterhouse, essa espécie apresenta esporângios papilados, mas caducos quando cultivados em meio líquido, como observado por Santos, Luz e Souza (2006).

Outra característica de grande importância na taxonomia de espécies do gênero *Phytophthora* é a posição do anterídio (ERWIN; RIBEIRO, 1996). Nos isolados avaliados, a formação de gametângios, seguido da produção de oósporos, se deu a partir do pareamento entre os dois grupos de compatibilidade, sendo constatada a presença de anterídio anfigeno em todos isolados. Santos, Luz e Souza (2005) observaram a presença de anterídio anfigeno em culturas pareadas de *P. nicotianae* mantidas no escuro, após o sexto dia de incubação. Não foi observada a presença de ornamentação na parede dos oósporos, característica da espécie *P. katsurae*, do Grupo II.

Quanto à natureza homotática ou heterotática dos isolados, todos apresentaram culturas heterotáticas, sendo possível observar a presença dos dois grupos de compatibilidade A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub> entre eles. Dos 12 isolados, oito foram caracterizados como sendo do grupo A<sub>2</sub>, e quatro do grupo A<sub>1</sub>, sendo observada ainda, a ocorrência dos dois grupos de compatibilidade em isolados da mesma região. De acordo com Goodwin (1997), a ocorrência de isolados dos grupos A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub> numa região incidindo sobre a mesma cultura aumenta as chances de

reprodução sexuada e o surgimento de recombinantes, os quais podem apresentar melhores características de adaptabilidade ao meio, tais como maior agressividade e virulência. Islam et al. (2005) estudaram 57 isolados de *P. capsici* obtidos em sete lavouras comerciais de abóbora-menina (*Cucurbita moschata*) nos Estados Unidos, onde foram encontradas três lavouras com o Grupo A1, duas lavouras com o Grupo A2 e duas lavouras com a presença dos dois Grupos A1 e A2. De acordo com esses autores, a presença de ambos os grupos de compatibilidade nas lavouras de abóbora-menina aumentam o potencial da produção de oósporos e a recombinação genética de *P. capsici*. Resultados semelhantes foram observados no Brasil por Marque, Souza e Cutolo Filho (2004) ao caracterizar os grupos de compatibilidade de 24 isolados de *P. capsici* da cultura do pimentão, encontrando dez isolados pertencentes ao Grupo A<sub>1</sub> e 14 pertencentes ao Grupo A<sub>2</sub>, mostrando frequência de 1:1 na população, indicando o oósporo fonte de inóculo no solo.

Na caracterização fisiológica de isolados de *Phytophthora*, o parâmetro mais importante é o efeito da temperatura no crescimento micelial. De acordo com os resultados do efeito da temperatura, em meio CA, foi observado que tanto o isolado como a temperatura influenciaram no crescimento micelial dos isolados de *Phytophthora* em estudo. A temperatura de 8°C todos isolados apresentou crescimento micelial, exceto o isolado 111 que apresentou apenas traços de crescimento. O maior crescimento micelial foi observado entre 20 e 28°C. A maioria dos isolados apresentaram traços de crescimento aos 36°C, diferente do isolado 111 que mostrou maior crescimento que os demais isolados para esta temperatura.

O crescimento micelial em altas temperaturas é um caráter fisiológico que tem sido bastante usado para ajudar a classificar espécies que crescem bem em altas temperaturas (ERWIN; RIBEIRO, 1996), uma vez que as espécies possuem diferentes temperaturas máximas de crescimento, essa característica pode ajudar a separar espécies que sejam morfológicamente semelhantes.

A faixa de temperatura ótima para o crescimento micelial observada nos isolados em estudo ficaram bem abaixo da descrição da espécie *P. nicotianae* por

Erwin e Ribeiro (1996), apresentadas no início da discussão (27 – 32°C), sendo observado que o pico de crescimento dos isolados da acácia-negra ocorreu em torno dos 22°C.

Em isolados de *P. nicotianae* da acácia-negra, testados nos meios CA, BDA, e V-8 ágar, Santos, Luz e Souza (2005) não observaram crescimento micelial em nenhum dos meios a 36°C, com crescimento ocorrendo entre 10 a 35°C, e temperatura ótima entre 24 e 32°C. Entretanto, Fisher et al. (2004), estudando isolados de *P. nicotianae* patogênicos a lírio da paz (*Spathiphyllum wallisi*), constataram o crescimento micelial de isolados a 37°C, em meio BDA.

Algumas características culturais e morfológicas são tidas como secundárias na identificação das espécies do gênero *Phytophthora* por apresentarem menor importância na taxonomia, sendo utilizadas como complemento nas chaves taxonômicas, tais como: características da colônia, forma e dimensões de esporângios, presença e dimensões de clamidósporos, esporulação “*in vitro*”, entre outras.

Na caracterização cultural dos isolados de *Phytophthora* sp. da acácia-negra, foram observados seis padrões de crescimento: estrelado, cotonoso, rosáceo, estrelado para rosáceo, ligeiramente estrelado e ligeiramente rosáceo, sendo o micélio para todos isolados aéreo, variando de muito denso a pouco denso. Embora certas espécies mostrem padrões de micélio diferentes, esta característica não tem sido tão útil na identificação de espécies de *Phytophthora* (ERWIN; RIBEIRO, 1996). Segundo Waterhouse (1970), os tipos de colônia dependem da frequência, do ângulo e da extensão das ramificações das hifas. Muniz et al. (2004) relataram a presença de cultura com aspecto cotonoso para isolados de *P. nicotianae* cultivados em meio de cultura CA. Por sua vez, Santos, Luz e Souza (2005) observaram a presença de culturas petaloides em isolados de *P. nicotianae*, também cultivados em meio de cultura CA. Diferenças, nos padrões culturais de crescimento dentro de uma mesma espécie, também foram observadas em isolados de *P. capsici*, apresentando padrões de crescimento cotonoso, petaloide, rosáceo e estrelado (ISLAM et al., 2005). Esta variação entre isolados da mesma espécie pode ser atribuída ao genótipo de cada isolado,

cuja expressão fenotípica está relacionada com as interações entre genótipo e condições do meio, principalmente meio de cultura e temperatura de incubação.

Apesar de a maioria das espécies de *Phytophthora* produzirem esporângios prontamente na superfície dos meios de cultura à base de ágar, muitas requerem cultivos subsequentes em água, soluções minerais ou extrato de solo diluído sobre condições de luz (ERWIN; RIBEIRO, 1996), sendo estimuladas a produzir esporângios em presença de umidade e substratos não-estéreis.

Sete meios líquidos foram testados na esporulação “*in vitro*” dos isolados. A formação dos esporângios, em meio líquido, demonstrou a necessidade dos isolados de *Phytophthora* da acácia-negra ser submetidos a estímulos para esporular. Abdanur, Santos e Tratch (2003) já haviam relatado a importância do meio líquido na esporulação de isolados de *Phytophthora* da acácia-negra, utilizando para induzir a esporulação água destilada esterilizada e solução de KNO<sub>3</sub>. Santos et al. (2005) utilizaram a solução de KNO<sub>3</sub> para obter esporângios de *P. nicotianae* da acácia-negra.

Outros autores também demonstraram a influência estimuladora de líquidos na produção de esporângios para várias espécies de *Phytophthora*. Mehrlich (1934) citado por Chee e Newhook (1965), descreveu o aumento na produção de esporângios de *P. nicotianae* e *P. cinnamoni* com o uso do extrato de solo não-autoclavado. Elena e Paplomatas (1999) também induziram a formação de esporângios em isolados de *P. citrophthora*, cultivando primeiramente os isolados em um meio rico (caldo de ervilha), depois transferindo-os para o meio de extrato de solo não-autoclavado. O uso de água de lagoa na esporulação de espécies do gênero *Phytophthora* foi relatado por Hickman e Goode (1953), citados por Rodrigues (1985), para a produção de esporângios de *P. fragariae*.

Depois de testados os substratos para indução de esporulação nos isolados de *Phytophthora* da acácia-negra, o meio de extrato de solo não-autoclavado foi utilizado para estimular a esporulação com o objetivo de determinar a morfologia e mensuração dos esporângios e clamidósporos. A

forma predominante dos esporângios foi ovoide, embora tenham sido encontradas outras formas entre os isolados. O número, a dimensão e a forma dos esporângios além de variarem com as condições externas, como luz e temperatura, e composição do meio, podem também variar entre os isolados da mesma espécie (RODRIGUES, 1985) e com a idade das culturas (HAMM; HANSEN, 1987).

Nos isolados da acácia-negra, foram observadas variações de 27,90 – 74,74  $\mu\text{m}$  para comprimento e 21,70 – 52,70  $\mu\text{m}$  para largura dos esporângios. Erwin e Ribeiro (1996) descrevem intervalo menor para a espécie *P. nicotianae*, entre 11 – 60  $\mu\text{m}$  de comprimento e 20 – 45  $\mu\text{m}$  de largura. Isolados de *P. nicotianae* patogênicos a *Citrus sinensis*, estudados por Muniz, Queiroz e Menezes (2004), apresentaram intervalos de comprimento (24,6 – 78,7  $\mu\text{m}$ ) e largura (16,4 – 49,2  $\mu\text{m}$ ) semelhante aos encontrados nos isolados de acácia-negra deste estudo. Entretanto, Santos et al. (2005) observaram valores de 33,3 – 56,0  $\mu\text{m}$  para comprimento e 24,5 – 35,0  $\mu\text{m}$  para largura nos esporângios de *P. nicotianae* da acácia-negra. Na chave taxonômica, descrita por Stamps et al. (1990), o comprimento dos esporângios de *P. nicotianae* aparece entre 45 – 75  $\mu\text{m}$ . As dimensões dos esporângios têm se mostrado uma característica muito variável dentro da espécie, pelas variações nos meios de cultura.

Os clamidósporos são estruturas de sobrevivência produzida por algumas e não por todas espécies de *Phytophthora*, havendo apenas 35 espécies formadoras de clamidósporos dentre todas espécies descritas para o gênero *Phytophthora* (SMITH, 2007). Algumas espécies como *P. nicotianae*, *P. capsici* e *P. cactorum* são relatadas na literatura por formarem clamidósporos de forma abundante (ERWIN; RIBEIRO, 1996).

Foi observada a presença de clamidósporos em todos isolados estudados, apresentando-se globosos, terminais ou intercalares com diâmetro entre 24,8 – 55,80  $\mu\text{m}$  (média de 37,16  $\mu\text{m}$ ) e parede espessa variando de 1,55 – 6,20  $\mu\text{m}$ . Segundo Erwin e Ribeiro (1996), são considerados clamidósporos grandes aqueles que apresentam diâmetro superior a 35  $\mu\text{m}$ . Santos, Luz e Souza (2005), em isolados de *P. nicotianae* da acácia-negra, observaram clamidósporos



terminais, com diâmetro de 25,4 – 40,3 µm (média de 33 µm). De acordo com Stamps et al. (1990), as características dos clamidósporos podem ser usadas como um caráter taxonômico para diferenciar algumas espécies de *Phytophthora*. Entretanto, pela morfologia dos clamidósporos não variarem apreciavelmente entre espécies, a significância deste caráter na taxonomia em grande parte fica limitada à sua presença ou ausência (ERWIN; RIBEIRO, 1996).

Nesse estudo, a patogenicidade dos isolados foi comprovada por meio das lesões causadas nos ramos destacados de acácia-negra quando inoculados. Os 12 isolados demonstraram agressividade variada, por meio de lesões com comprimento estatisticamente diferentes, separando-os em dois grupos de agressividade. Também foi observado que nos ramos inoculados com os isolados houve lesões significativamente maiores que as produzidas nas testemunhas. Os sintomas reproduzidos foram de lesões necróticas, sem exsudação de goma. Os mesmos sintomas foram observados por Santos, Luz e Souza (2005), ao inocularem mudas de acácia-negra com isolados de *P. nicotianae*. A metodologia de ramos destacados para o teste de patogenicidade já havia sido demonstrada por Santos (1998b) ao inocular *Cylindrocladium* sp., e *Fusarium* sp., em ramos destacados de acácia-negra. Segundo o autor, a disponibilidade de plantas é um fator limitante para os testes em acácia-negra, além disso, os testes a campo devem ser restritos aos períodos mais quentes, época mais favorável às infecções.

Com base na caracterização morfofisiológica, os isolados da acácia-negra foram identificados como pertencentes à espécie *P. nicotianae*, embora tenham apresentado algumas diferenças para os parâmetros descritos para esta espécie.

Adicionalmente, nesse trabalho, foram analisados os dados do sequenciamento do DNA dos isolados de *Phytophthora* da acácia-negra, baseados na região ITS1-5.8S-ITS2, buscando a confirmação da espécie.

Os dados do sequenciamento da região ITS demonstraram que os isolados de *P. nicotianae* da acácia-negra, utilizados nesse estudo, são mais próximos da nova espécie descrita *P. bisheria*, do que de outros acessos de *P. nicotianae* depositadas no *GenBank*.

Embora os isolados de *Phytophthora* da acácia-negra tenham apresentado maior similaridade em relação às sequências das regiões ITS1, ITS2 e 5.8S gene do DNA ribossomal, com a nova espécie *P. bisheria*, morfologicamente essa espécie se distingue dos isolados da acácia-negra por apresentar esporângios semipapilados, anterídio parágino e culturas homotáticas (ABAD et al., 2008).

A não-conformidade entre dados moleculares e morfofisiológicos entre espécies de *Phytophthora* já haviam sido relatadas por outros autores, como observado a seguir. Em análise da região ITS de isolados de *P. citrophthora* obtidos de cacau e antúrio, foi demonstrado que esses isolados são mais próximos de *P. tropicalis* e *P. capsici* do que de *P. citrophthora* de citros. Embora morfologicamente os isolados tenham sido classificados como *P. citrophthora*, esta discrepância entre os dados morfológicos e moleculares pode ser indicativo de uma nova espécie (PAIM et al., 2006). Resultados semelhantes foram observados por Stukely et al. (2007) ao comparar os dados de sequenciamento do rDNA de uma espécie de *Phytophthora* isolada de florestas de eucalipto da Austrália, previamente classificada com base na morfologia como *P. citricola*, com os dados do sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 de outras espécies de *Phytophthora* depositadas no *GenBank*, observando maior similaridade entre seus isolados de *P. citricola* e as espécies *P. bisheria* e *P. multivesiculata*.

Não foi possível confirmar a espécie dos isolados da acácia-negra como sendo *P. nicotianae* pelos dados moleculares. As análises da região ITS1-5.8S-ITS2 aqui apresentadas sugerem que os isolados de *Phytophthora* obtidos da acácia-negra podem representar uma nova espécie filogenética, apesar de compartilhar características morfofisiológicas muito semelhantes à espécie *P. nicotianae*. Mais estudos taxonômicos deverão ser realizados para esclarecer as relações filogenéticas desses isolados de *Phytophthora* da acácia-negra, pelo sequenciamento de mais genes na tentativa de aumentar a confiabilidade dos resultados.

## 6. CONCLUSÕES

1- Pelas características morfofisiológicas, os 12 isolados de *Phytophthora* da acácia-negra foram enquadrados como a espécie *P. nicotianae* Breda de Haan.

2- A análise filogenética, baseada nas regiões ITS1-5.8S-ITS2 (rDNA), mostrou que os 12 isolados de *Phytophthora* da acácia-negra, formaram dois grupos.

3- A análise molecular evidenciou que os isolados identificados morfofisiologicamente como *P. nicotianae* apresentaram maior similaridade com a nova espécie descrita, *P. bisheria*.

## REFERÊNCIAS

ABAD, Z. G. et al. *Phytophthora bisheria* sp. nov.: a new species identified in isolates from the rosaceous raspberry, rose and strawberry in three continents. *Mycologia*, New York, v. 100, n. 1, p. 99-110, 2008.

ABDANUR, A.; SANTOS, A. F.; TRATCH, R. Crescimento micelial e esporulação de isolados de *Phytophthora* sp. patogênicos a acácia-negra. *Boletim de Pesquisa Florestal*, Curitiba, n. 47, p. 33-42, 2003.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. *Introductory mycology*. 4. ed. New York: John Wiley, 1996.

BALDAUF, S. L.; PALMER, J. D. Animals and fungi are each other's closest relatives: congruent evidence from multiple proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, D.C., v. 90, p. 11558-11562, 1993.

BARICHELLO, L. R.; SCHUMACHER, M. V.; VOGEL, H. L. M. Quantificação da biomassa de um povoamento de *Acacia mearnsii* De Wild na região sul do Brasil. *Ciência Florestal*, Santa Maria, v. 15, n. 2, p. 129-135, 2005.

BARZANTI, G. P.; CAPRETTI, P.; RAGAZZI, A. Characteristics of some *Phytophthora* species isolated from oak forest soils in central and northern Italy. *Phytopathologia Mediterrânea*, Bologna, v. 41, n. 2, p. 149-156, 2001.

BRASIER, C. M.; ROBREDO, F.; FERRAZ, J. F. P. Evidence for *Phytophthora cinnamomi* involvement in Iberian oak decline. *Plant Pathology*, Oxford, v. 42, p. 140-145, 1993.

BRASIER, C. M.; COOKE, D. E. L.; DUNCAN, J. M. Origin of a new *Phytophthora* pathogen through interspecific hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, D.C., v. 96, p. 5878-5883, 1999.

BROCKWELL, J. et al. *Nitrogen fixation in acacias: an untapped resource for sustainable plantations, farm forestry and land reclamation*. Australia: Australian Centre for International Agricultural Research, 2005. (Monograph, 115).

CHEE, K. H.; NEWHOOK, F. J. Relationship of microorganisms to sporulation of *Phytophthora cinnamomi* Rands. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, Wellington, v. 9, p. 32-43, 1966.

CHOWDAPPA, P. et al. Identification of *Phytophthora* species affecting plantation crops by RFLP of PCR-amplified internal transcribed spacer regions of ribosomal RNA. *Current Science*, Bangalore, v. 85, n. 1, p. 34-36, 2003.

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.

ELENA, K.; PAPLOMATAS, E.J. Collar rot caused by *Phytophthora citrophthora* on pear trees in Greece. *Phytoparasitica*, Bet Dagan, v. 27, n. 4, p. 291-298, 1999.

ERWIN, D. C.; RIBEIRO, O. K. *Phytophthora diseases worldwide*. St Paul: The American Phytopathological Society, 1996.

FERREIRA, D. F. *Sisvar - Sistema de Análise de Variância*. Lavras: UFLA, 2006. Disponível em: <<http://www.dex.ufla.br/~danielff/sisvar.zip>>. Acesso em: 15 dez. 2007.

FIGUEIREDO, M. B. Métodos de preservação de fungos patogênicos. *Biológico*, São Paulo, v. 63, n. 1/2, p. 73-82, 2001.

FINGER, C. A. G. et al. Curvas de altura-diâmetro de Acácia negra (*Acacia mearnsii* De Wild). *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 30, n. 3, p. 387-391, 2000.

FISHER, I. H. et al. Ocorrência de *Phytophthora parasítica* em Lírio da Paz no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, DF, v. 29, n. 6, p. 690, 2005.

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.

GOODWIN, S. B. The population genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 87, n. 4, p. 462-473, 1997.

GOULART, C. T. Informações preliminares sobre adubação da acácia-negra. *Agronomia Sulriograndense*, Porto Alegre, v. 4, p. 65-68, 1959.

HAMM, P. B.; HANSEN, E. M. Identification of *Phytophthora* spp. known to Attack Conifers in the Pacific Northwest. *Northwest Science*, Cheney, v. 61, n. 2, p. 103-109, 1987.

HAYDEN, K. J. et al. Detection and quantification of *Phytophthora ramorum* from California Forests using a real-time polymerase chain reaction assay. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 94, p. 1075-1083, 2004.

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.

INSLAM, S. Z. et al. Characterization of *Phytophthora capsici* isolates from processing pupkin in Illinois. *Plant Disease*, Saint Paul, v. 89, n. 2, p. 191-197, 2005.

KAMOUN, S. *Phytophthora*. In: KRONSTAD, J. (Ed.). *Fungal pathology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 237-265.

KOENIG, R. L.; PLOETZ, R. C.; KISTLER, H. C. *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* consists of a small number of divergent and globally distributed clonal lineages. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 87, n. 9, p. 915-923, 1997.

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.

LEE, S. B.; TAYLOR, J. W. Phylogeny of five fungus-like protocistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Journal of Molecular Biology and Evolution*, v. 9, n. 4, p. 636-653, 1992.

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

LUZ, E. D. M., MATSUOKA, K. Phytophthora: fungo, protista ou chromista? In: LUZ, E. D. M. N. et al. *Doenças causadas por Phytophthora no Brasil*. Campinas: Livraria Rural, 2001. p. 1-22.

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

MARQUE, J. M.; SOUZA, N. L.; CUTOLO FILHO, A. A. Compatibilidade, crescimento e esporulação de isolados de *Phytophthora capsici* obtidos de pimentão. *Summa Phytopathologica*, Jaguariúna, v. 30, p. 389-390, 2004.

MARTIN, F. N., TOOLEY, P. W. Phylogenetic relationships among *Phytophthora* species inferred from sequence analysis of mitochondrially encoded cytochrome oxidase I and II genes. *Mycologia*, New York, v. 95, n. 2, p. 269-284, 2003.

MARTINEZ, D. T. *Seleção genética de Acácia mearnsii De Wild. (acácia-negra) visando o aumento da qualidade e produtividade de madeira e tanino no Rio Grande do Sul*. 2006. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais)-Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MOCHIUTTI, S. *Produtividade e sustentabilidade de plantações de Acácia-negra (Acacia mearnsii De Wild.) no Rio Grande do Sul*. 2007. 270 f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais)-Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

MORA, A. L. *Aumento da produção de sementes geneticamente melhoradas de Acacia mearnsii De Wild. (Acácia negra) no Rio Grande do Sul*. 2002. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais)-Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

MUNIZ, M. F. S.; QUEIROZ, F. M.; MENEZES, M. Caracterização de isolados de *Phytophthora* patogênicos a *Citrus sinensis* no Estado de Alagoas. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, DF, v. 29, p. 201-204, 2004.

ORCHARD, A. E.; MASLIN, B. R. Proposal to conserve the name *Acacia* (*Leguminosae: Mimosoideae*) with a conserved type. *Taxon*, Utrecht, v. 54, p. 262-263, 2003.

PAIM, M. C. A. *Diversidade genética, taxonômica e patogenicidade de Phytophthora citrophthora e Phytophthora palmivora*. 2005. Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2005.

PAIM, M. C. A. et al. Pathogenicity of *Phytophthora* species to *Anthurium andraeanum* in Brazil. *Australasian Plant Pathology*, v. 35, p. 275-277, 2006.

POSER, G. L. VON.; D'AVILA R. R. P.; HORN, M. A. Acácia-negra. *Ciência Hoje*, São Paulo, v. 11, n. 63, p. 68-70, 1990.

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

RIZZO, D. M.; GARBELOTTO, M. Sudden oak death: endangering California and Oregon forest ecosystems. *Frontiers in Ecology of the Environment*, v. 1, n. 5, p. 197-204, 2003.

RODRIGUES, C. *Caracterização morfofisiológica de isolados de Phytophthora, obtidos de figo e de goiaba*. 1985. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1985.

ROUX, J.; WINGFIELD, M. J. Survey and virulence of fungi occurring on diseased *Acacia mearnsii* in South – Africa. *Forest Ecology and Management*, Amsterdam, v. 99, p. 327-336, 1997.

ROUX, J.; KEMP, G. H.; WINGFIELD, M. J. Diseases of black wattle in South – Africa – a review. *South African Forestry Jour*, v. 174, p. 35-40, 1995.

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

SANTOS, A. F.; LUZ, E. D. M. N. Distribuição de *Phytophthora nicotianae* e *P. boehmeriae* nas plantações brasileiras de acácia-negra. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, DF, v. 31, n. 4, 2006.

SANTOS, A. F. dos.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JR. A. Caracterização de tipos de sintomas da gomose as Acácia-negra (*Acacia mearnsii*) no Sul do Brasil. *Boletim de Pesquisa Florestal*, Curitiba, n. 37, p. 31-40, 1998.

SANTOS, A. F. *Cicatrização e exsudação em troncos de acácia-negra submetidos a injúrias*. Colombo: EMBRAPA-CNPQ, 1998a. (Pesquisa em andamento, 58).



SANTOS, A. F. Metodologia para determinação da patogenicidade de fungos à Acácia-negra. Colombo: EMBRAPA-CNPf, 1998b. (Pesquisa em andamento, 59).

SANTOS, A. F. Gomose de *Phytophthora* da acácia-negra. In: LUZ, E. D. M. N. et al. *Doenças causadas por Phytophthora no Brasil*. Campinas: Livraria Rural, 2001. p. 67-90.

SANTOS, A. F.; LUZ, E. D. M. N.; BEZERRA, J. L. Etiologia e manejo das principais doenças da acácia-negra que ocorrem no Brasil. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, v. 15, p. 335-358, 2007.

SANTOS, A. F. *Caracterização da gomose da Acácia-negra (Acacia mearnsii): I. Distribuição de lesões nos troncos*. Colombo: EMBRAPA-CNPf, 1997. (Pesquisa em andamento, 47).

SANTOS, A. F.; LUZ, E. D. M. N. Gomose da acácia-negra causada por *Phytophthora nicotianae* no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, DF, v. 28, supl., p. 24, 2003.

SANTOS, A. F.; LUZ, E. D. M. N.; SOUZA, J. T. *Phytophthora boehmeriae* causando a gomose da acácia-negra no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, DF, v. 29, supl., p. 144, 2004.

SANTOS, A. F.; LUZ, E. D. M. N.; SOUZA, J. T. First report of *Phytophthora boehmeriae* on black wattle in Brazil. *Plant Pathology*, Oxford, v. 55, p. 813, 2006.

SANTOS, A. F.; AUER, C. G. *Caracterização da gomose de acácia-negra: III. Incidência em plantios*. Colombo: EMBRAPA-CNPf, 1998. (Pesquisa em Andamento, 66).

SANTOS, A. F.; LUZ, E. D. M. N. A gomose da acácia-negra no Brasil. *Summa Phytopathologica*, Jaguariúna, v. 33, n. 2, p. 113-118, 2007.

SAS-Institute. *User's guide: statistics: versão 8.1. 4. ed.* Cary: SAS/STAT, 2000. v. 2.

SCHNEIDER, H. *Métodos de análise filogenética: um guia prático*. 2. ed. Riberão Preto: Holos, 2003.

SCHNEIDER, P. R.; TONINI, H. Utilização de variáveis Dummy em equações de volume para *Acacia mearnsii* De Wild. *Ciência Florestal*, Santa Maria, v. 13, n. 2, p. 121-129, 2003.

SCHNEIDER, P. R. et al. Produção de madeira e casca verde por índice de sítio e espaçamento inicial de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.). *Ciência Florestal*, Santa Maria, v. 11, n. 1, p. 151-165, 2001.

SOTTA, E. D. et al. *Avaliação dos danos causados pela gomose em acácia-negra*. Curitiba: EMBRAPA-CNPF, 1994.

SCHUCH, S. L. C. Sintomatologia da gomose da Acácia-negra (*Acacia mollissima* Wild.) no Rio Grande do Sul. *Agronomia Sulriograndense*, Porto Alegre, v. 11, n. 1, p. 129-127, 1975.

SCHUCH, S. L. C.; PEDERZOLLI, R. C. D. Ocorrência da gomose da Acácia-negra (*Acacia mollissima* Wild.). *Agronomia Sulriograndense*, Porto Alegre, v. 11, n. 2, p. 313-317, 1975.

SHERRY, S. P. *The Black Wattle (Acacia mearnsii De Wild.)*. Pietermaritzburg: Wattle Research Institute, 1971.

SMITH, A. L. *Biology of Chlamydospores of Phytophthora ramorum*. 2007. 140 f. Thesis (Master of Science in Botany and Plant Pathology)-Oregon State University, Oregon, 2007.

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

STUKELY M. J. C. et al. A new homothallic *Phytophthora* from the jarrah forest in Western Australia. *Australasian Plant Disease Notes*, n. 2, p. 49-51, 2007.

WATERHOUSE, G. M. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Mycological papers*, n. 92, p. 22, 1963.

WATERHOUSE, G. M. The genus *Phytophthora* de Bary. *Mycological papers*, n. 122, p. 1-59, 1970.

WERRES, S. et al. *Phytophthora ramorum* sp. nov., a new pathogen on *Rhododendron* and *Viburnum*. *Mycological Research*, Cambridge, n. 105, p. 1155-1165, 2001.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. et al. (Ed.). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-322.

ZEILJEMAKER, F. C. J. *The gummosis of black wattle :a complex of disease*. Pietermaritzburg: Wattle Research Institute, 1968. (Report 1967-68).

ZEILJEMAKER, F. C. J. Black-butt diseases of black wattle caused by *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 61, n. 2, p. 144-145, 1971.

## APÊNDICE

Alinhamento de nucleotídeos de sequência do gene ITS (*primers* ITS5/ITS2 e ITS4/ITS3) de isolados de *Phytophthora* sp. da acácia-negra e de amostras buscadas no *GenBank*<sup>1</sup>.

AF271221	<i>P. richardiae</i>	-----CCACACCTAAAA-----TTTCCACGTGAACCGTATT-----T	33
DQ275189	<i>P. quininea</i>	-----CCACACCTAAAA-----CTTCCACGTGAACCGTATT-----T	33
DQ297400	<i>P. captiosa</i>	-----CCACACCTTAAAAAAA-----TTCCACGTGAACGTATTG-TCAA	38
DQ297405	<i>P. captiosa</i>	-----CCACACCTTAAAAAAA-----TTCCACGTGAACGTATTG-TCAA	38
DQ059570	<i>P. glovera</i>	-----ATCATTACCACACCTAAAAAAA-----CTTCCACGTGAACCGTATCAACCCT	47
AF279127	<i>P. glovera</i>	-----CCACACCTAAAAAAA-----CTTCCACGTGAACCGTATCAACCCT	40
AY251649	<i>P. meadii</i>	-----CCACACCTAAAAAAA-----CTTCCACGTGAACCGTATCAACCCT	40
DQ648143	<i>P. syringae</i>	-----CCACACCTAAAAAAA-----CTTCCACGTGAACCGTATCAAAAAC	40
DQ335635	<i>P. primulae</i>	-----CCACACCTAAAAAAA-----CTTCCACGTGAACCGTATCAAAAAC	40
EF213616	<i>P. syringae</i>	CTGCGGAAGGATCATTACCACACCTAAAAAAA-----CTTCCACGTGAACCGTATCAAAAAC	77
AF266802	<i>P. primulae</i>	-----CCACACCTAAAAAAA-----CTTCCACGTGAACCGTATCAACCCT	39
AY117033	<i>P. kelmania</i>	-----CCACACCTAAAAAAA-----CTTCCACGTGAACCGTATCAACCCT	40
DQ338528	<i>P. kelmania</i>	-----CCACACCTAAAAAAA-----CTTCCACGTGAACCGTATCAACCCT	40
DQ831528	<i>P. sinensis</i>	-----GTATCAAC--A	9
AF266768	<i>P. sinensis</i>	-----CCACACCTAAAAAAA-----CTTCCACGTGAACCGTATCAAC--A	38
AB217675	<i>P. cinnamomi</i>	-----CCACACCTAAAAAAA-----CTTCCACGTGAACCGTATCAACCCA	40
EF150873	<i>P. cinnamomi</i>	-----CCACACCTAAAAAAA-----CTTCCACGTGAACCGTATCAACCCA	40
EF486693	<i>P. cambivora</i>	CTGCGGAAGGATCATTACCACACCTAAAAAAA-----CTTCCACGTGAACCGTATCAACCCA	417
DQ313222	<i>P. europeae</i>	-----CCACACCTAAAAAAA-----CTTCCACGTGAACCGTATCAACCCA	41
EF426559	<i>P. nicotianae</i>	-----CCACACCTAAAAAAC---TTTCCACGTGAACCGTTTCAACCCA	40
EF187913	<i>P. nicotianae</i>	CTGCGGAAGGATCATTACCACACCTAAAAAAC---TTTCCACGTGAACCGTTTCAACCCA	70
L41378	<i>P. iranica</i>	CTGCGGAAGGATCATTACCACACCTAAAAATA---TTTCCACGTGAACCGTTTCAACCAA	64
AJ131987	<i>P. iranica</i>	-----CCACACCTAAAAATA---TTTCCACGTGAACCGTTTCAACCAA	39
AJ131989	<i>P. clandestina</i>	-----CCACACCTAAAAA-A---TTTCCACGTGAACCGTTTCAACCCA	38
DQ182744	<i>P. palmivora</i>	-----CCACACCTAAAAA-AC---TTTCCACGTGAACCGTATCAA---A	36
DQ538512	<i>P. palmivora</i>	-----AAGGATCATTACCACACCTAAAAA-A---TTTCCACGTGAACCGTATCAA---A	46
Phy12		--GCGGAAGGATCATTACCACACCTAAAAAAAACCTTT-CCACGTGAACCGTATCAACCCT	57
Phy73		--GCGGAAGGATCATTACCACACCTAAAAAAAACCTTT-CCACGTGAACCGTATCAACCCT	57
Phy2		--GCGGAAGGATCATTACCACACCTAAAAAAAACCTTT-CCACGTGAACCGTATCAACCCT	57
AM5		--GCGGAAGGACATTACCACACCTAAAAAAAACCTTT-CCACGTGAACCGTATCAACCCT	57
Phy23		--GCGGAAGGATCATTACCACACCTAAAAAAAACCTTT-CCACGTGAACCGTATCAACCCT	57
Phy65		--GCGGAAGGATCATTACCACACCTAAAAAAAACCTTTTCCACGTGAACCGTATCAACCCT	58
Phy92		--GCGGAAGGATCATTACCACACCTAAAAAAAACCTTTTCCACGTGAACCGTATCAACCCT	58
AN2003		--GCGGAAGGATCATTACCACACCTAAAAAAAACCTTTTCCACGTGAACCGTATCAACCCT	58
Phy111		--GCGGAAGGATCATTACCACACCTAAAAAACACTTTTCCACGTGAACCGTATCAACCCT	58
Phy17		--GCGGAAGGATCATTACCACACCTAAAAAACACTTTTCCACGTGAACCGTATCAACCCT	58
Phy61		--GCGGAAGGATCATTACCACACCTAAAAAACACTTTTCCACGTGAACCGTATCAACCCT	58
DQ302411	<i>P. bisheria</i>	-----CCACACCTAAAAAAAACCTTT-CCACGTGAACCGTATCAACCCT	42
EF213613	<i>P. gonapodyides</i>	CTGCGGAAGGATCATTACCACACCTAAAAAAA-CTTT-CCACGTGAACCGTATCAACCCC	79
EF213599	<i>P. gonapodyides</i>	CTGCGGAAGGATCATTACCACACCTAAAAAAA-CTTT-CCACGTGAACCGTATCAACCCC	79
AF266792	<i>P. humicola</i>	-----CCAGACCTAAAAAAA-----CTTT-CCACGTGAACCGTATCAACCCC	40
AF228076	<i>P. boehmeriae</i>	-----AAGGATCATTACCACACCTAAAAAAA-----CTTCCACGTGAACCGT-TCAACC--	48
DQ286726	<i>P. gallica</i>	-----CCACACCTAAAAAAA-----CTTCCACGTGAACCGTATTA--CCA	38
AF271227	<i>Py. aphanidermatum</i>	-----CCACACCTAAAAAAA-----CTTCCACGTGAACCGTTGAAA----	36

\*\*

continuação

AF271221	<i>P. richardiae</i>	TTGACGTTGGGGACTC-----CTGGCTTC-----	57
DQ275189	<i>P. quininea</i>	TTGACGTTGGGGACTC-----CTGGCTTC-----	57
DQ297400	<i>P. captiosa</i>	CCAAATTCGGGGACT--CCTTGCTAGTGTGCTTTCG-----GGCG---TGC	79
DQ297405	<i>P. captiosa</i>	CCAAATTCGGGGACT--CCTTGCTAGTGTGCTTTCG-----GGCG---TGC	79
DQ059570	<i>P. glovera</i>	TTTAGTTGGGGTCTTGT-----	65
AF279127	<i>P. glovera</i>	TTTAGTTGGGGTCTTGT-----	58
AY251649	<i>P. meadii</i>	TTTAGTTGGGGTGTGCTTGGCATT-----TG-----C-----	70
DQ648143	<i>P. syringae</i>	CTTTTATTGGGGGCT--TCTGTCTGGT---CTGGC----TT-----CGGCTG--GAT	81
DQ335635	<i>P. primulae</i>	CTTTTATTGGGGGCT--TCTGTCTGGT---CTGGC----TT-----CGGCTG--GAA	81
EF213616	<i>P. syringae</i>	CTTTTATTGGGGGCT--TCTGTCTGGT---CTGGC----TT-----CGGCTG--GAT	118
AF266802	<i>P. primulae</i>	TTTTTATTGGGGGCT--GCTGACTGGA---CTGGC----TT-----CGGCTG--GAC	80
AY117033	<i>P. kelmania</i>	TTTAAATTGGGGGCT--TCCGTCTGGC---CGGCCGTTCT-----CGGCTG--G-C	84
DQ338528	<i>P. kelmania</i>	TTTAAATTGGGGGCT--TCCGTCTGGC---CGGCCGTTCT-----CGGCTG--G-C	84
DQ831528	<i>P. sinensis</i>	AGTAGTTGGGGGCTGCTCTGTGTGGCTAGCTGTCGATGTCAAAGTCGGGACTGGCTGC	69
AF266768	<i>P. sinensis</i>	AGTAGTTGGGGGCTGCTCTGTGTGGCTAGCTGTCGATGTCAAAGTCGGGACTGGCTGC	98
AB217675	<i>P. cinnamomi</i>	ATTAGTTGGGGGCTGCTCTGGGCGC--GGCTGTCGATGTCAAAGTCGACGGCTG--CTGC	98
EF150873	<i>P. cinnamomi</i>	ATTAGTTGGGGGCTGCTCTGGGCGC--GGCTGTCGATGTCAAAGTCGACGGCTG--CTGC	98
EF486693	<i>P. cambivora</i>	CTTAGTTGGGGGCTAGTCCCG--CGGCTGGCTGTCGATGTCAAAGTTGACGGCTG--CTGC	475
DQ313222	<i>P. europeae</i>	TTTAGTTGGGGGCTTGCTCTG--GTGGCTGGCTGTCGATGTCAAAGTTGACGGCTG--CTGC	99
EF426559	<i>P. nicotianae</i>	ATAG--TTGGGGTCTATTTTGGCGCGGCT--GCTGGCTTA--ATTGTT--GGCG--GCTGC	93
EF187913	<i>P. nicotianae</i>	ATAG--TTGGGGTCTATTTTGGCGCGGCT--GCTGGCTTA--ATTGTT--GGCG--GCTGC	123
L41378	<i>P. iranica</i>	AAAAATTGGGGGCTTGTTTGGCGCGGCT--ACTGGCTTT--ATTGCT--GGCG--GCTGC	119
AJ131987	<i>P. iranica</i>	AAAAATTGGGGGCTTGTTTGGCGCGGCT--ACTGGCTTT--ATTGCT--GGCG--GCTGC	94
AJ131989	<i>P. clandestina</i>	AAAAATT--GGGGTCTTGTTTGGTGGTGGCT--GCTGGCTTT--ATTGCT--GGCG--GCTGC	92
DQ182744	<i>P. palmivora</i>	ACTTAGTTGGGGTCTCTTTCCGGCGCGGCT--GCTGGCTTC--ATTGCT--GGCG--GCTGC	91
DQ538512	<i>P. palmivora</i>	ACTTAGTTGGGGTCTCTTTCCGGCGCGGCT--GCTGGCTTC--ATTGCT--GGCG--GCTGC	101
Phy12		TTTAA--TTGGGATTTTCTCGGTGTGCGGCTAGCTGGCCTTTATTGGCT--GGTAGGCTGC	115
Phy73		TTTAA--TTGGGATTTTCTCGGTGTGCGGCTAGCTGGCCTTTATTGGCT--GGTAGGCTGC	115
Phy2		TTTAA--TTGGGATTTTCTCGGTGTGCGGCTAGCTGGCCTTTATTGGCT--GGAAGGCTGC	115
AM5		TTTAA--TTGGGATTTTCTCGGTGTGCGGCTAGCTGGCCTTTATTGGCT--GGCAGGCTGC	115
Phy23		TTTAA--TTGGGATTTTCTCGGTGTGCGGCTAGCTGGCCTTTATTGGCT--GGTAGGCTGC	115
Phy65		TTTAA--TTGGGATTTGCTCGGTGTGCGGCTAGCTGGCCTTTATTGGCT--GGCAGGCTGC	116
Phy92		TTTAA--TTGGGATTTGCTCGGTGTGCGGCTAGCTGGCCTTTATTGGCT--GGCAGGCTGC	116
AM3		TTTAA--TTGGGATTTGCTCGGTGTGCGGCTAGCTGGCCTTTATTGGCT--GGCAGGCTGC	116
Phy11		TTTAA--TTGGGATTTGCTCGGTGTGCGGCTAGCTGGCCTTTATTGGCT--GGCAGGCTGC	116
Phy17		TTTAA--TTGGGATTTGCTCGGTGTGCGGCTAGCTGGCCTTTATTGGCT--GGCAGGCTGC	116
Phy61		TTTAA--TTGGGATTTGCTCGGTGTGCGGCTAGCTGGCCTTTATTGGCT--GGCAGGCTGC	116
DQ302411	<i>P. bisheria</i>	TTTAA--TTGGGATTTGCTTGGTGTGCGGCTAGCTGGCCTTTATTGGCT--GGCAGGCTGC	100
EF213613	<i>P. gonapodyides</i>	TATAATTGGGGGCTTGGCTCGGCGCGGTGCGTGTGCTGGCTGTAATGGGTCGGCTGCTGC	139
EF213599	<i>P. gonapodyides</i>	TATAATTGGGGGCTTGGCTCGGCGCGGTGCGTGTGCTGGCTGTAATGGGTCGGCTGCTGC	139
AF266792	<i>P. humicola</i>	TTAAGATTGGGAACCTTGGCTCGGCGCGGTGCGTGTGCTGGCTGTAATGGGTCGGCTGCTGC	100
AF228076	<i>P. boehmeriae</i>	TTTTAGTTGGGGACT--CCTCGTCGGC-----GGCTTT-----CGGGTGC	87
DQ286726	<i>P. gallica</i>	CCCAGTTGGGGACTCTCTGTTGGTGGTTGGG--GCTGGCTAGCGCTGGCT---TTGACTGT	94
AF271227	<i>Py. aphanidermatum</i>	TCATGTTCTGTGCTCTCTTT-----	56

\* \*

continuação

AF271221	<i>P. richardiae</i>	-GGCCGGTTGAGACCTATCACG-----CGACCG-CTCGGGCTGA-----AAAGTCG	101
DQ275189	<i>P. quininea</i>	-GGCCGGTTGAGACCTATCACG-----CGACCG-CTCGGGCTGA-----AAAGTCG	101
DQ297400	<i>P. captiosa</i>	CGGTAGGTTGAGACCCATCAAAA-----CGAAAA-CATCGACTGA-----AAGGTCG	124
DQ297405	<i>P. captiosa</i>	CGGTAGGTTGAGACCCATCAAAA-----CGAAAA-CATCGACTGA-----AAGGTCG	124
DQ059570	<i>P. glovera</i>	-----ACCCTATCAT-----GGCGAATG-TTTGGACTTC-----GGTCC	98
AF279127	<i>P. glovera</i>	-----ACCCTATCAT-----GGCGAATG-TTTGGACTTC-----GGTCC	91
AY251649	<i>P. meadii</i>	---TGAGCCGCGCCCTATCAT-----GGCGAATG-TTTGGACTTC-----GGTCT	111
DQ648143	<i>P. syringae</i>	-TGGGTGGCGG-CTCTATCA-----TGGCGACCGCTCTGAGCTTC-----GGCCTG	125
DQ335635	<i>P. primulae</i>	-TGGGTGGCGG-CTCTATCA-----TGGCGACCGCTCTGAGCTTC-----GGCCTG	125
EF213616	<i>P. syringae</i>	-TGGGTGGCGG-CTCTATCA-----TGGCGACCGCTCTGAGCTTC-----GGCCTG	162
AF266802	<i>P. primulae</i>	-TGGGTGGCGG-CTCTAGC-----GCGACCGTTCTGGGCTTC-----GGCTTG	121
AY117033	<i>P. kelmania</i>	-TGGGTGGCGG-CTCTATCA-----TGGCGACCGCT-TGGGCCTC-----GGCCTG	127
DQ338528	<i>P. kelmania</i>	-TGGGTGGCGG-CTCTATCA-----TGGCGACCGCT-TGGGCCTC-----GGCCTG	127
DQ831528	<i>P. sinensis</i>	-TATGTGGCGGGCTCTATCA-----TGGCGATTGGTTTGGGTCCCTCCTCGTGGGAACT	122
AF266768	<i>P. sinensis</i>	-TATGTGGCGGGCTCTATCA-----TGGCGATTGGTTTGGGTCCCTCCTCGTGGGAACT	151
AB217675	<i>P. cinnamomi</i>	-TGCGTGGCGGGCCCTATCAC-----TGGCGAGCG-TTTGGGTCCCTCTCG-GGGAACT	150
EF150873	<i>P. cinnamomi</i>	-TGCGTGGCGGGCCCTATCAC-----TGGCGAGCG-TTTGGGTCCCTCTCG-GGGAACT	150
EF486693	<i>P. cambivora</i>	-TGTGTGTGGCGGGCCCTATCA-----TGGCGAGCG-TTTGGGTCCCTCTCG-GGGAACT	526
DQ313222	<i>P. europeae</i>	-TGTGTGGCGGGCCCTATCA-----TGGCGAGCG-TTTGGGTCCCTCTCG-GGGAACT	150
EF426559	<i>P. nicotianae</i>	-TGCTGAGTGAGCCCTATCAAAAAAAGGCGAACG-TTTGGGCTTC-----GGCCT	142
EF187913	<i>P. nicotianae</i>	-TGCTGAGTGAGCCCTATCAAAAAAAGGCGAACG-TTTGGGCTTC-----GGCCT	172
L41378	<i>P. iranica</i>	-TGCTGGACGAGCCCTAAC-----GCGAAAAG-TTTAGACTAC-----GGTCT	159
AJ131987	<i>P. iranica</i>	-TGCTGGACGAGCCCTAAC-----GCGAAAAG-TTTAGACTTC-----GGTCT	134
AJ131989	<i>P. clandestina</i>	-TGCTGGATGAGCCCTAAC-----GCGAAAAG-TTTAGACTTC-----GGTCT	132
DQ182744	<i>P. palmivora</i>	-TGTGGGAGAGCTCTATCAT-----GGCGAGCG-TTTGGGCTTC-----GGTCT	134
DQ538512	<i>P. palmivora</i>	-TGTGGGAGAGCTCTATCAT-----GGCGAGCG-TTTGGGCTTC-----GGTCT	144
Phy12		GTGCTGGGCGAGTCCTATCATG-----G-CAAACG-TTTGGGCTTC-----GGTCT	159
Phy73		GTGCTGGGCGAGTCCTATCATG-----G-CAAACG-TTTGGGCTTC-----GGTCT	159
Phy2		GTGCTGGGCGAGTCCTATCATG-----G-CAAACG-TTTGGGCTTC-----GGTCT	159
AM5		GTGCTGGGCGAGTCCTATCATG-----G-CAAACG-TTTGGGCTTC-----GGTCT	159
Phy23		GTGCTGGGCGAGTCCTATCATG-----G-CAAACG-TTTGGGCTTC-----GGTCT	159
Phy65		GTGCTAGGCGAGTCCTATCATG-----G-CAAACG-TTTGGGCTTC-----GGCTT	160
Phy92		GTGCTAGGCGAGTCCTATCATG-----G-CAAACG-TTTGGGCTTC-----GGCTT	160
AM3		GTGCTAGGCGAGTCCTATCATG-----G-CAAACG-TTTGGGCTTC-----GGCTT	160
Phy11		GTGCTAGGCGAGTCCTATCATG-----G-CAAACG-TTTGGGCTTC-----GGCTT	160
Phy17		GTGCTAGGCGAGTCCTATCATG-----G-CAAACG-TTTGGGCTTC-----GGCTT	160
Phy61		GTGCTAGGCGAGTCCTATCATG-----G-CAAACG-TTTGGGCTTC-----GGCTT	160
DQ302411	<i>P. bisheria</i>	GTGCTGGGCGAGTCCTATCATG-----G-CAAACG-TTTGGGCTTC-----GGTCT	144
EF213613	<i>P. gonapodyides</i>	-TGCTGGGCGGGCTCTATCATG-----GGCGAGCG-TTTGGGCTTC-----GGCTC	183
EF213599	<i>P. gonapodyides</i>	-TGCTGGGCGGGCTCTATCATG-----GGCGAGCG-TTTGGGCTTC-----GGCTC	183
AF266792	<i>P. humicola</i>	-TGCTGCGCGGGCTCTATCATG-----GGCGAGCG-TTTGGGCTTC-----GGCTC	144
AF228076	<i>P. boehmeriae</i>	TGGTGGGTTGAGACCTATCAAAA-----ACGAGTGATTTGGGCTGC-----AAGGCTC	134
DQ286726	<i>P. gallica</i>	CGATGGGTTGAGACCTATCAAAA-----CGACGCGTTTGGGCTGC-----AAGGCCT	140
AF271227	<i>Py. aphanidermatum</i>	---CGGGAGGGCTGAA-----CGAAGG---TGGGCTGCCT-----AATTG	90

\* \* \*

continuação

AF271221	<i>P. richardiae</i>	GGGCCAGTAGC-----CTTTTTTAAACCCATTCCGAAC- ACTGAACCATACTGTGGGG	155
DQ275189	<i>P. quininea</i>	GGGCCAGTAGC-----CTTTTTT-AAACCCATTCCGAAC- ACTGAACCATACTGTGGGG	154
DQ297400	<i>P. captiosa</i>	GAGCCAGTAGT----TACCTTTGTAAACCCCTTACTAAAT- ACTGAA--AACTGTGGGG	177
DQ297405	<i>P. captiosa</i>	GAGCCAGTAGT----TACCTTTGTAAACCCCTTACTAAAT- ACTGAA--AACTGTGGGG	177
DQ059570	<i>P. glovera</i>	GGGCGAGTAGC---TTTTTGTTTTAAACCCATTTCACAAT- TCTGATT-ATACTGTGGGG	153
AF279127	<i>P. glovera</i>	GGGCGAGTAGC---TTTTTGTTTTAAACCCATTTCACAAT- TCTGATT-ATACTGTGGGG	146
AY251649	<i>P. meadii</i>	GGGCTAGTAGC---TTTTTGTTTTAAACCCATTTAACAAT- ACTGATT-ATACTGTGGGG	166
DQ648143	<i>P. syringae</i>	GAGCTAGTAGCCC--ACT--TTTTAAACCCATTCTTAATT- ACTGAAC-AACTGTGGGG	179
DQ335635	<i>P. primulae</i>	GAGCTAGTAGCCC--ACT--TTTTAAACCCATTCTTAATT- ACTGAAC-AACTGTGGGG	179
EF213616	<i>P. syringae</i>	GAGCTAGTAGCCC--ACT--TTTTAAACCCATTCTTAATT- ACTGAAC-AACTGTGGGG	216
AF266802	<i>P. primulae</i>	GGGCTAGTAGCTT--TCT--TTTTAAACCCATTCTTAATT- ACTGAA--ATACTGTGGGG	175
AY117033	<i>P. kelmania</i>	G-GCTAGTAGCGT--ATT--TTTTAAACCCATTCTTAATT- ACTGAAT-ATACTGTGGGG	180
DQ338528	<i>P. kelmania</i>	G-GCTAGTAGCGT--ATT--TTTTAAACCCATTCTTAATT- ACTGAAT-ATACTGTGGGG	180
DQ831528	<i>P. sinensis</i>	GGATCATGAGCCC--ACC--TTTTAAACCCATTCTTGATT- ACTGAAT-ATACTGTGGGG	176
AF266768	<i>P. sinensis</i>	GGATCATGAGCCC--ACC--TTTTAAACCCATTCTTGATT- ACTGAAT-ATACTGTGGGG	205
AB217675	<i>P. cinnamomi</i>	GAGCTAGTAGCCT--CTC--TTTTAAACCCATTCTGTAAT- ACTGAAC-ATACTGTGGGG	204
EF150873	<i>P. cinnamomi</i>	GAGCTAGTAGCCT--CTC--TTTTAAACCCATTCTGTAAT- ACTGAAC-ATACTGTGGGG	204
EF486693	<i>P. cambivora</i>	GAGCCAGTAGCCCTTATT--TTTTAAACCCATTCTGTAAT- ACTGAAT-ATACTGTGGGG	582
DQ313222	<i>P. europeae</i>	GAGCCAGTAGCCCTTTTC--TTTTAAACCCATTCTGTAAT- ACTGAAT-ATACTGTGGGG	206
EF426559	<i>P. nicotianae</i>	GATTTAGTAGTCTTTTTTCTTTTAAACCCATTCTTAAT- ACTGAAT-ATACTGTGGGG	200
EF187913	<i>P. nicotianae</i>	GATTTAGTAGTCTTTTTTCTTTTAAACCCATTCTTAAT- ACTGAAT-ATACTGTGGGG	230
L41378	<i>P. iranica</i>	GGGCTAGTAGC-----TTTATTTTAAACCCATTCTTAAT- ACTGAAT-ATACTGTGGGG	212
AJ131987	<i>P. iranica</i>	GGGCTAGTAGC-----TTTATTTTAAACCCATTCTTAAT- ACTGAAT-ATACTGTGGGG	187
AJ131989	<i>P. clandestina</i>	GGGCTAGTAGC-----TTTATTTTAAACCCATTCTTAAT- ACTGAAT-ATACTGTGGGG	185
DQ182744	<i>P. palmivora</i>	GAACTAGTAGC-----TTTTTAAACCCATTCTTTATA- ACTGATT-ATACTGTAGGG	185
DQ538512	<i>P. palmivora</i>	GAACTAGTAGC-----TTTTTAAACCCATTCTTTATA- ACTGATT-ATACTGTAGGG	195
Phy12		GAGCAAGTAGC---TTTT--T--TAAACCATTTCTTAAAT- ACTGATT-ATACTGTGGGG	210
Phy73		GAGCAAGTAGC---TTTT--T--TAAACCATTTCTTAAAT- ACTGATT-ATACTGTGGGG	210
Phy2		GAGCAAGTAGC---TTTT--T--TAAACCATTTCTTAAAT- ACTGATT-ATACTGTGGGG	210
AM5		GAGCAAGTAGC---TTTT--T--TAAACCATTTCTTAAAT- ACTGATT-ATACTGTGGGG	210
Phy23		GAGCAAGTAGC---TTTT--T--TAAACCATTTCTTAAAT- ACTGATT-ATACTGTGGGG	210
Phy65		GAGCTAGTAGC---TTTT--TTTTAAACCATTTCTTAAAT- ACTGATT-ATACTGTGGGG	213
Phy92		GAGCTAGTAGC---TTTT--TTTTAAACCATTTCTTAAAT- ACTGATT-ATACTGTGGGG	213
AM3		GAGCTAGTAGC---TTTT--TTTTAAACCATTTCTTAAAT- ACTGATT-ATACTGTGGGG	213
Phy11		GAGCTAGTAGC---TTTT--TTTTAAACCATTTCTTAAAT- ACTGATT-ATACTGTGGGG	213
Phy17		GAGCTAGTAGC---TTTT--TTTTAAACCATTTCTTAAAT- ACTGATT-ATACTGTGGGG	213
Phy61		GAGCTAGTAGC---TTTT--TTTTAAACCATTTCTTAAAT- ACTGATT-ATACTGTGGGG	213
DQ302411	<i>P. bisheria</i>	GAGCAAGTAGC---TTTT--TT--TAAACCATTTCTT- AAT-ACTGATT-ATACTGTGGGG	195
EF213613	<i>P. gonapodyides</i>	GAGCTAGTAGC---TATCAATTTTAAACCCCTTCTTAAAT- ACTGAAC-ATACTGTGGGG	238
EF213599	<i>P. gonapodyides</i>	GAGCTAGTAGC---TATCAATTTTAAACCCCTTCTTAAAT- ACTGAAC-ATACTGTGGGG	238
AF266792	<i>P. humicola</i>	GAGCTAGTAGC---TTTTCTTTTAAACCCCTTCTTAAAT- ACTGAA--ATACTGTGGGG	199
AF228076	<i>P. boehmeriae</i>	GAGTTGCGAGT----TTTCTTTTAAACCCATTACCTAAAT- ACTGATT-ATACTGTGGGG	189
DQ286726	<i>P. gallica</i>	GAGT--GTTGCTGTTTCTCTTGTAAACCCATTCTTAAAT- ACTGAAT-ATACTGTGGGG	196
AF271227	<i>Py. aphanidermatum</i>	TAGTCTGCCGA---TGTATTTTCAAACCCATTACCTAAAT- ACTGATCTATACTCCAAAA	147
		* * * * *	



continuação

AF271221	<i>P. richardiae</i>	ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC	215
DQ275189	<i>P. quininea</i>	ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC	214
DQ297400	<i>P. captiosa</i>	ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC	236
DQ297405	<i>P. captiosa</i>	ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC	236
DQ059570	<i>P. glovera</i>	ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC	213
AF279127	<i>P. glovera</i>	ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC	206
AY251649	<i>P. meadii</i>	ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC	226
DQ648143	<i>P. syringae</i>	ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC	239
DQ335635	<i>P. primulae</i>	ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC	239
EF213616	<i>P. syringae</i>	ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC	276
AF266802	<i>P. primulae</i>	ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC	235
AY117033	<i>P. kelmania</i>	ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC	240
DQ338528	<i>P. kelmania</i>	ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC	240
DQ831528	<i>P. sinensis</i>	ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC	236
AF266768	<i>P. sinensis</i>	ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC	265
AB217675	<i>P. cinnamomi</i>	ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC	264
EF150873	<i>P. cinnamomi</i>	ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC	264
EF486693	<i>P. cambivora</i>	ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC	642
DQ313222	<i>P. europeae</i>	ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC	266
EF426559	<i>P. nicotianae</i>	ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC	260
EF187913	<i>P. nicotianae</i>	ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC	290
L41378	<i>P. iranica</i>	ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC	272
AJ131987	<i>P. iranica</i>	ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC	247
AJ131989	<i>P. clandestina</i>	ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC	245
DQ182744	<i>P. palmivora</i>	ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC	245
DQ538512	<i>P. palmivora</i>	ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC	255
Phy12		ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCANNG-----	253
Phy73		ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCANNG-----	253
Phy2		ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCANNG-----	253
AM5		ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCANNG-----	253
Phy23		ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCANNG-----	253
Phy65		ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCANNG-----	256
Phy92		ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCANNG-----	256
AM3		ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCANNG-----	256
Phy11		ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCANNG-----	256
Phy17		ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCANNG-----	256
Phy61		ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCANNG-----	256
DQ302411	<i>P. bisheria</i>	ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC	255
EF213613	<i>P. gonapodyides</i>	ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC	298
EF213599	<i>P. gonapodyides</i>	ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC	298
AF266792	<i>P. humicola</i>	ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC	259
AF228076	<i>P. boehmeriae</i>	ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC	249
DQ286726	<i>P. gallica</i>	ACGAAAGTCCTTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC	256
AF271227	<i>Py. aphanidermatum</i>	ACGAAAGTTTATGGTTTTAATCT-ATAACAACCTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC	206
		***** ** ***** ** ***** *	

continuação

AF271221	<i>P. richardiae</i>	ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	275
DQ275189	<i>P. quininea</i>	ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	274
DQ297400	<i>P. captiosa</i>	ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	296
DQ297405	<i>P. captiosa</i>	ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	296
DQ059570	<i>P. glovera</i>	ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	273
AF279127	<i>P. glovera</i>	ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	266
AY251649	<i>P. meadii</i>	ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	286
DQ648143	<i>P. syringae</i>	ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	299
DQ335635	<i>P. primulae</i>	ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	299
EF213616	<i>P. syringae</i>	ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	336
AF266802	<i>P. primulae</i>	ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	295
AY117033	<i>P. kelmania</i>	ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	300
DQ338528	<i>P. kelmania</i>	ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	300
DQ831528	<i>P. sinensis</i>	ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	296
AF266768	<i>P. sinensis</i>	ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	325
AB217675	<i>P. cinnamomi</i>	ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	324
EF150873	<i>P. cinnamomi</i>	ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	324
EF486693	<i>P. cambivora</i>	ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	702
DQ313222	<i>P. europeae</i>	ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	326
EF426559	<i>P. nicotianae</i>	ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	320
EF187913	<i>P. nicotianae</i>	ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	350
L41378	<i>P. iranica</i>	ATCGATGAAGGACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	332
AJ131987	<i>P. iranica</i>	ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	307
AJ131989	<i>P. clandestina</i>	ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	305
DQ182744	<i>P. palmivora</i>	ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	305
DQ538512	<i>P. palmivora</i>	ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	315
Phy12		-----CGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	277
Phy73		-----CGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	277
Phy2		-----CGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	277
AM5		-----CGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	277
Phy23		-----CGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	277
Phy65		-----CGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	280
Phy92		-----CGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	280
AM3		-----CGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	280
Phy11		-----CGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	280
Phy17		-----CGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	280
Phy61		-----CGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	280
DQ302411	<i>P. bisheria</i>	ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	315
EF213613	<i>P. gonapodyides</i>	ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	358
EF213599	<i>P. gonapodyides</i>	ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	358
AF266792	<i>P. humicola</i>	ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	319
AF228076	<i>P. boehmeriae</i>	ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	309
DQ286726	<i>P. gallica</i>	ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	316
AF271227	<i>Py. aphanidermatum</i>	ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA	266
		*****	

continuação

AF271221	<i>P. richardiae</i>	TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTATGCCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	335
DQ275189	<i>P. quininea</i>	TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTATGCCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	334
DQ297400	<i>P. captiosa</i>	TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTATGCCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	356
DQ297405	<i>P. captiosa</i>	TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTATGCCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	356
DQ059570	<i>P. glovera</i>	TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	333
AF279127	<i>P. glovera</i>	TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	326
AY251649	<i>P. meadii</i>	TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	346
DQ648143	<i>P. syringae</i>	TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	359
DQ335635	<i>P. primulae</i>	TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	359
EF213616	<i>P. syringae</i>	TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	396
AF266802	<i>P. primulae</i>	TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTTCGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	355
AY117033	<i>P. kelmania</i>	TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	360
DQ338528	<i>P. kelmania</i>	TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	360
DQ831528	<i>P. sinensis</i>	TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	356
AF266768	<i>P. sinensis</i>	TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	385
AB217675	<i>P. cinnamomi</i>	TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	384
EF150873	<i>P. cinnamomi</i>	TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	384
EF486693	<i>P. cambivora</i>	TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	762
DQ313222	<i>P. europeae</i>	TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	386
EF426559	<i>P. nicotianae</i>	TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	380
EF187913	<i>P. nicotianae</i>	TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	410
L41378	<i>P. iranica</i>	TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTCCCGGTTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	392
AJ131987	<i>P. iranica</i>	TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	367
AJ131989	<i>P. clandestina</i>	TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	365
DQ182744	<i>P. palmivora</i>	TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	365
DQ538512	<i>P. palmivora</i>	TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	375
Phy12		TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	337
Phy73		TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	337
Phy2		TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	337
AM5		TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	337
Phy23		TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	337
Phy65		TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	340
Phy92		TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	340
AM3		TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	340
Phy11		TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	340
Phy17		TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	340
Phy61		TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	340
DQ302411	<i>P. bisheria</i>	TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	375
EF213613	<i>P. gonapodyides</i>	TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	418
EF213599	<i>P. gonapodyides</i>	TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	418
AF266792	<i>P. humicola</i>	TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTTCGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	379
AF228076	<i>P. boehmeriae</i>	TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTATGCCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	369
DQ286726	<i>P. gallica</i>	TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTATGCCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	376
AF271227	<i>Py. aphanidermatum</i>	TCGAAATTTTGAACGCATATGCACTTCCGGGTATGCCTGGGAGTATGCCTGTATCAGT	326
		*****	

continuação

AF271221	<i>P. richardiae</i>	GTCCGTACATGAAACTTGGCTCCCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGATGGGGACGCGCAGA	395
DQ275189	<i>P. quininea</i>	GTCCGTACATCAAACCTTGGCTCCCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGATGGGGACGCGCAGA	394
DQ297400	<i>P. captiosa</i>	GTCCGTATATCAAACCTTGGCTTCCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGATGGGAACGTGCAGA	416
DQ297405	<i>P. captiosa</i>	GTCCGTATATCAAACCTTGGCTTCCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGATGGGAACGTGCAGA	416
DQ059570	<i>P. glovera</i>	GTCCGTACATCAAACCTTGGCTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGGA-GGATGTGC-CAGA	391
AF279127	<i>P. glovera</i>	GTCCGTACATCAAACCTTGGCTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGGA-GGATGTGC-CAGA	384
AY251649	<i>P. meadii</i>	GTCCGTACATCAAACCTTGGCTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGGA-GGATGTGC-CAGA	404
DQ648143	<i>P. syringae</i>	GTCCGTACATCAAACCTTGGCTCCCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGATGGGGATGCACAGA	419
DQ335635	<i>P. primulae</i>	GTCCGTACATCAAACCTTGGCTCCCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGATGGGGATGCACAGA	419
EF213616	<i>P. syringae</i>	GTCCGTACATCAAACCTTGGCTCCCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGATGGGGATGCACAGA	456
AF266802	<i>P. primulae</i>	GTCCGTACAATAAACCTTGGCTCCCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGATGGGGATGC-CAGA	414
AY117033	<i>P. kelmania</i>	GTCCGTACACTAAACCTTGGCTCCCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGATGGGGACGCGCAGA	420
DQ338528	<i>P. kelmania</i>	GTCCGTACACTAAACCTTGGCTCCCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGATGGGGACGCGCAGA	420
DQ831528	<i>P. sinensis</i>	GTCCGTACATCAAACCTTGGCTCTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGATGGAGACGC-CAGA	415
AF266768	<i>P. sinensis</i>	GTCCGTACATCAAACCTTGGCTCTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGATGGAGACGC-CAGA	444
AB217675	<i>P. cinnamomi</i>	GTCCGTACATCAAACCTTGGCTCTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGATGGAGGTGC-CAGA	443
EF150873	<i>P. cinnamomi</i>	GTCCGTACATCAAACCTTGGCTCTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGATGGAGGTGC-CAGA	443
EF486693	<i>P. cambivora</i>	GTCCGTACATCAAACCTTGGCTCTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGATGGGGACGC-CAGA	821
DQ313222	<i>P. europeae</i>	GTCCGTACATCAAACCTTGGCTCTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGATGGGGACGC-CAGA	445
EF426559	<i>P. nicotianae</i>	GTCCGTACATTAACCTTGACTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGGA-GGAGATGT-CAGA	438
EF187913	<i>P. nicotianae</i>	GTCCGTACATTAACCTTGACTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGGA-GGAGATGT-CAGA	468
L41378	<i>P. iranica</i>	GTCCGTACATCAAACCTTGACTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGGA-GGAGATGT-CAGA	450
AJ131987	<i>P. iranica</i>	GTCCGTACATCAAACCTTGACTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGGA-GGAGATGT-CAGA	425
AJ131989	<i>P. clandestina</i>	GTCCGTACATCAAACCTTGACTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGGA-GGAGATGT-CAGA	423
DQ182744	<i>P. palmivora</i>	GTCCGTACATCAAACCTTGGTTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGT-GGATGTGC-CAGA	423
DQ538512	<i>P. palmivora</i>	GTCCGTACATCAAACCTTGGTTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGT-GGATGTGC-CAGA	433
Phy12		GTCCGTACATCAAACCTTGGTTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGGA-GGATATGC-CAGA	395
Phy73		GTCCGTACATCAAACCTTGGTTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGGA-GGATATGC-CAGA	395
Phy2		GTCCGTACATCAAACCTTGGTTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGGA-GGATATGC-CAGA	395
AM5		GTCCGTACATCAAACCTTGGTTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGGA-GGATATGC-CAGA	395
Phy23		GTCCGTACATCAAACCTTGGTTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGGA-GGATATGC-CAGA	395
Phy65		GTCCGTACATCAAACCTTGGTTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGGA-GGATGTGC-CAGA	398
Phy92		GTCCGTACATCAAACCTTGGTTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGGA-GGATGTGC-CAGA	398
AM3		GTCCGTACATCAAACCTTGGTTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGGA-GGATGTGC-CAGA	398
Phy11		GTCCGTACATCAAACCTTGGTTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGGA-GGATGTGC-CAGA	398
Phy17		GTCCGTACATCAAACCTTGGTTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGGA-GGATGTGC-CAGA	398
Phy61		GTCCGTACATCAAACCTTGGTTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGGA-GGATGTGC-CAGA	398
DQ302411	<i>P. bisheria</i>	GTCCGTACATCAAACCTTGGTTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGGA-GGATATGC-CAGA	433
EF213613	<i>P. gonapodyides</i>	GTCCGTACATCAACCTTGGTTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGGA-GGATATGC-CAGA	476
EF213599	<i>P. gonapodyides</i>	GTCCGTACATCAACCTTGGTTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGGA-GGATATGC-CAGA	476
AF266792	<i>P. humicola</i>	GTCCGTACATCAACCTTGGTTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGGA-GGATATGC-CAGA	437
AF228076	<i>P. boehmeriae</i>	GTCCGTACATCAACCTTGGCTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGATGGA-ATGC-CAGA	427
DQ286726	<i>P. gallica</i>	GTCCGTACATCAACCTTGGCTTCCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGATGGA-ATGC-CAGA	435
AF271227	<i>Py. aphanidermatum</i>	GTCCGTACATCAAACCTTGGCTTTCTTT-TTCTGTGTAGTCAG-GGAGAGAGATGG-CAGA	383
		***** * ** *** * *** ** * ***** * ** * * ****	

continuação

AF271221	<i>P. richardiae</i>	-CGTGAAGTGTCTTGCGCGCGC---GCTTCTGCCGGCTGCTGCG--AGTCCTTTGAAAT	449
DQ275189	<i>P. quininea</i>	-CGTGAAGTGTCTTGCGCGCGC---GCTTCGGCCGGCTGCTGCG--AGTCCTTTGAAAT	448
DQ297400	<i>P. captiosa</i>	-TGTGAAGTGTCTTGCGCGCGC---GCTTCGG--CGGTGCTG-GCGAGTCCTTTAAAT	469
DQ297405	<i>P. captiosa</i>	-TGTGAAGTGTCTTGCGCGCGC---GCTTCGG--CGGTGCTG-GCGAGTCCTTTAAAT	469
DQ059570	<i>P. glovera</i>	-TGTGAAGTGTCTTGCGTGTGT---CCTTCGGGTCGA--CTGCG--AGTCCTTTAAAT	443
AF279127	<i>P. glovera</i>	-TGTGAAGTGTCTTGCGTGTGT---CCTTCGGGTCGA--CTGCG--AGTCCTTTAAAT	436
AY251649	<i>P. meadii</i>	-TGTGAAGTGTCTTGCGGTTTGTGTGCTTCGGGCCGAGGCTGCG--AGTCCTTTGAAAT	461
DQ648143	<i>P. syringae</i>	-CGTGAAGTGTCTTGCGA-CTGG---GCTTCGGCTCGG--CTGCG--AGTCCTTTAAAT	470
DQ335635	<i>P. primulae</i>	-CGTGAAGTGTCTTGCGA-CTGG---GCTTCGGCTCGG--CTGCG--AGTCCTTTAAAT	470
EF213616	<i>P. syringae</i>	-CGTGAAGTGTCTTGCGA-CTGG---GCTTCGGCTCGG--CTGCG--AGTCCTTTAAAT	507
AF266802	<i>P. primulae</i>	-TGTGAAGTGTCTTGCGA-CTGG---ACTTTGATCTAG--ATGCG--AGTCCTTTAAAT	465
AY117033	<i>P. kelmania</i>	-TGTGAAGTGTCTTGCGG-CTGG---TCTTCGGTCCGG--CTGCG--AGTCCTTTGAAAT	471
DQ338528	<i>P. kelmania</i>	-TGTGAAGTGTCTTGCGG-CTGG---TCTTCGGTCCGG--CTGCG--AGTCCTTTGAAAT	471
DQ831528	<i>P. sinensis</i>	-CGTGAGGTGTCTTGCGCGCGG---CCTTCGGGCTGC--CTGCG--AGTCCCTTGAAAT	467
AF266768	<i>P. sinensis</i>	-CGTGAGGTGTCTTGCGCGCGG---CCTTCGGGCTGC--CTGCG--AGTCCCTTGAAAT	496
AB217675	<i>P. cinnamomi</i>	-CGTGAGGTGTCTTGCGG-GCGG---TCTTCGGACTGG--CTGTG--AGTCCCTTGAAAT	494
EF150873	<i>P. cinnamomi</i>	-CGTGAGGTGTCTTGCGG-GCGG---TCTTCGGACTGG--CTGTG--AGTCCCTTGAAAT	494
EF486693	<i>P. cambivora</i>	-CGTGAGGTGTCTTGCGG-GTGG---TCTTCGGGCTGC--CTGCG--AGTCCCTTGAAAT	872
DQ313222	<i>P. europeae</i>	-CGTGAGGTGTCTTGCGG-GTGG---TCTTCGGGCTGC--CTGCG--AGTCCCTTGAAAT	496
EF426559	<i>P. nicotianae</i>	-TGTGAAGTGTCTTGC-GATTGG---TCTTCGGACCGG--CTGCG--AGTCCTTTAAAT	489
EF187913	<i>P. nicotianae</i>	-TGTGAAGTGTCTTGC-GATTGG---TCTTCGGACCGG--CTGCG--AGTCCTTTAAAT	519
L41378	<i>P. iranica</i>	-TATGAAGTGTCTTGC-GGTTGG---TTTTCGGACCGA--CTGCG--AGTCCTTTAAAT	501
AJ131987	<i>P. iranica</i>	-TATGAAGTGTCTTGC-GGTTGG---TTTTCGGACCGA--CTGCG--AGTCCTTTAAAT	476
AJ131989	<i>P. clandestina</i>	-TATGAAGTGTCTTGC-GGTTGG---TTTTCGGACCGA--CTGCG--AGTCCTTTAAAT	474
DQ182744	<i>P. palmivora</i>	-TGTGAAGTGTCTTGC-GGCTGG---TCTTCGGATCGG--CTGTG--AGTCCTTTGAAAT	474
DQ538512	<i>P. palmivora</i>	-TGTGAAGTGTCTTGC-GGCTGG---TCTTCGGATCGG--CTGTG--AGTCCTTTGAAAT	484
Phy12		-TGTGAAGTGTCTTGC-GGCTGG---CTTTCGGGTCGG--CTGCG--AGTCCTTTAAAT	446
Phy73		-TGTGAAGTGTCTTGC-GGCTGG---CTTTCGGGTCGG--CTGCG--AGTCCTTTAAAT	446
Phy2		-TGTGAAGTGTCTTGC-GGCTGG---CTTTCGGGTCGG--CTGCG--AGTCCTTTAAAT	446
AM5		-TGTGAAGTGTCTTGC-GGCTGG---CTTTCGGGTCGG--CTGCG--AGTCCTTTAAAT	446
Phy23		-TGTGAAGTGTCTTGC-GGCTGG---CTTTCGGGTCGG--CTGCG--AGTCCTTTAAAT	446
Phy65		ATGTGAAGTGTCTTGC-GGCTGG---CCTTCGGGTGA--CTGCG--AGTCCTTTAAAT	450
Phy92		ATGTGAAGTGTCTTGC-GGCTGG---CCTTCGGGTGA--CTGCG--AGTCCTTTAAAT	450
AM3		ATGTGAAGTGTCTTGC-GGCTGG---CCTTCGGGTGA--CTGCG--AGTCCTTTAAAT	450
Phy11		ATGTGAAGTGTCTTGC-GGCTGG---CCTTCGGGTGA--CTGCG--AGTCCTTTAAAT	450
Phy17		ATGTGAAGTGTCTTGC-GGCTGG---CCTTCGGGTGA--CTGCG--AGTCCTTTAAAT	450
Phy61		ATGTGAAGTGTCTTGC-GGCTGG---CCTTCGGGTGA--CTGCG--AGTCCTTTAAAT	450
DQ302411	<i>P. bisheria</i>	-TGTGAAGTGTCTTGC-GGCTGG---CTTTCGGGTCGG--CTGCGCGAGTCCTTTGAAAT	486
EF213613	<i>P. gonapodyides</i>	-CGTGAAGTGTCTTGCTGGCGGT---CTTTCGAGCTG--CCG-GTGAGTCCTTTGAAAT	529
EF213599	<i>P. gonapodyides</i>	-CGTGAAGTGTCTTGCTGGCGGT---CTTTCGAGCTG--CCG-GTGAGTCCTTTGAAAT	529
AF266792	<i>P. humicola</i>	-CGTGAAGTGTCTTGCTAGCGGT---CTTTCGAGCTG--CCG-GCGAGTCCTTTGAAAT	490
AF228076	<i>P. boehmeriae</i>	-CGTGAAGTGTCTTGCTAGCGGT---TCTTCGGACTGCGGCGGCG--AGTCCTTTGAAAT	481
DQ286726	<i>P. gallica</i>	-CGTGAAGTGTCTTGCTAGCGGT---TCTTCGGACTGCGGCGGCG--AGTCCTTTGAAAT	494
AF271227	<i>Py. aphanidermatum</i>	ATGTGAGGTGTCTCGCTGGCTCCC---TTTTCGGAGGAG--AAGACGCGAGTCCCTTTAAAT	440
		* * * * *	

continuação

AF271221	<i>P. richardiae</i>	GTAA--GACCTGTTCT-TCTCTTTGCCCGAAAAGCG-TTGCCTGAGTGTGGTTGTGGAGG	505
DQ275189	<i>P. quininea</i>	GTAA--GACCTGTTCT-TCTCTTTGCCCGAAAAGCG-TTGCCTGAGTGTGGTTGTGGAGG	504
DQ297400	<i>P. captiosa</i>	ACAA-GATACTGTTCT-TCTCTTTGCTCGAAAAGCGTGTGGGAT--G-TGGTTGTGGAGG	524
DQ297405	<i>P. captiosa</i>	ACAA-GATACTGTTCT-TCTCTTTGCTCGAAAAGCGTGTGGGAT--G-TGGTTGTGGAGG	524
DQ059570	<i>P. glovera</i>	GTAC-TGAACTGTACT-TCTCTTTGCTCAAAAAGCG-TGGTGTG-TG-TGGTTGTGGAGG	498
AF279127	<i>P. glovera</i>	GTAC-TGAACTGTACT-TCTCTTTGCTCAAAAAGCG-TGGTGTG-TG-TGGTTGTGGAGG	491
AY251649	<i>P. meadii</i>	GTAC-TGAACTGTACT-TCTCTTTGCTCGAAAAGCG-TGGTGTG-TG-TGGTTGTGGAGG	516
DQ648143	<i>P. syringae</i>	GTAC-AGAACTGTACT-TCTCTTTGCTCGAAAAGCG-TTATATT-AC-TGGTTGTGGAGG	525
DQ335635	<i>P. primulae</i>	GTAC-AGAACTGTACT-TCTCTTTGCTCGAAAAGCG-TTATATT-AC-TGGTTGTGGAGG	525
EF213616	<i>P. syringae</i>	GTAC-AGAACTGTACT-TCTCTTTGCTCGAAAAGCG-TTATATT-AC-TGGTTGTGGAGG	562
AF266802	<i>P. primulae</i>	GTACTAAAAGTGTACT-TCTCTTTGCTCGAAAAGCG-TGACGTT-GC-TGGTTGTGGAGG	520
AY117033	<i>P. kelmania</i>	GTAC-TACTGTACT-TCTCTTTGCTCGAAAAGCG-TGACGTT-GC-TGGTTGTGGAGG	526
DQ338528	<i>P. kelmania</i>	GTAC-TACTGTACT-TCTCTTTGCTCGAAAAGCG-TGACGTT-GC-TGGTTGTGGAGG	526
DQ831528	<i>P. sinensis</i>	GTAC-TGAACTGTACT-TCTCTTTGCTCGAAAAGCG-TGACGTT-GT-TGGTTGTGGAGG	522
AF266768	<i>P. sinensis</i>	GTAC-TGAACTGTACT-TCTCTTTGCTCGAAAAGCG-TGACGTT-GT-TGGTTGTGGAGG	551
AB217675	<i>P. cinnamomi</i>	GTAC-TGAACTGTACT-TCTCTTTGCTCGAAAAGCG-TGACGTT-GC-TGGTTGTGGAGG	549
EF150873	<i>P. cinnamomi</i>	GTAC-TGAACTGTACT-TCTCTTTGCTCGAAAAGCG-TGACGTT-GC-TGGTTGTGGAGG	549
EF486693	<i>P. cambivora</i>	GTAC-TGAACTGTACT-TCTCTTTGCTCGAAAAGCG-TGACGTT-GT-TGGTTGTGGAGG	927
DQ313222	<i>P. europeae</i>	GTAC-TGAACTGTACT-TCTCTTTGCTCGAAAAGCG-TGACGTT-GT-TGGTTGTGGAGG	551
EF426559	<i>P. nicotianae</i>	GTAC-TAAACTGAACT-TCTCTTTGCTCGAAAAGTGGTGGCGTT-GC-TGGTTGTGAAGG	545
EF187913	<i>P. nicotianae</i>	GTAC-TAAACTGAACT-TCTCTTTGCTCGAAAAGTGGTGGCGTT-GC-TGGTTGTGAAGG	575
L41378	<i>P. iranica</i>	GTAC-TAAACTGAACT-TCTCTTTGCTCGAAAAGTGGTGGCGTT-GC-TGGTTGTGAAGG	557
AJ131987	<i>P. iranica</i>	GTAC-TAAACTGAACT-TCTCTTTGCTCGAAAAGTGGTGGCGTT-GC-TGGTTGTGAAGG	532
AJ131989	<i>P. clandestina</i>	GTAC-TAAACTGAACT-TCTCTTTGCTCGAAAAGTGGTGGCGTT-GC-TGGTTGTGAAGG	530
DQ182744	<i>P. palmivora</i>	GTAC-TGAACTGTACT-TCTCTTTGCTCGAAAAGCG-TGGCGTT-GC-TGATTGTGGAGG	529
DQ538512	<i>P. palmivora</i>	GTAC-TGAACTGTACT-TCTCTTTGCTCGAAAAGCG-TGGCGTT-GC-TGATTGTGGAGG	539
Phy12		GTAC-AGAACTGTACT-TCTCTTTGCTCAAAAAGTA-TGGCGTTTGC-TGGTTGTGGAGG	502
Phy73		GTAC-AGAACTGTACT-TCTCTTTGCTCAAAAAGTA-TGGCGTTTGC-TGGTTGTGGAGG	502
Phy2		GTAC-AGAACTGTACT-TCTCTTTGCTCAAAAAGTA-TGGCGTTTGC-TGGTTGTGGAGG	502
AM5		GTAC-AGAACTGTACT-TCTCTTTGCTCAAAAAGTA-TGGCGTTTGC-TGGTTGTGGAGG	502
Phy23		GTAC-AGAACTGTACT-TCTCTTTGCTCAAAAAGTA-TGGCGTTTGC-TGGTTGTGGAGG	502
Phy65		GTAC-TGAACTGTATT-CCTCTTTGCTCGAAAAGTA-AGGCGTT-GC-TTGTGTGGAGG	505
Phy92		GTAC-TGAACTGTATT-CCTCTTTGCTCGAAAAGTA-AGGCGTT-GC-TTGTGTGGAGG	505
AM3		GTAC-TGAACTGTATT-CCTCTTTGCTCGAAAAGTA-AGGCGTT-GC-TTGTGTGGAGG	505
Phy11		GTAC-TGAACTGTATT-CCTCTTTGCTCGAAAAGTA-AGGCGTT-GC-TTGTGTGGAGG	505
Phy17		GTAC-TGAACTGTATT-CCTCTTTGCTCGAAAAGTA-AGGCGTT-GC-TTGTGTGGAGG	505
Phy61		GTAC-TGAACTGTATT-CCTCTTTGCTCGAAAAGTA-AGGCGTT-GC-TTGTGTGGAGG	505
DQ302411	<i>P. bisheria</i>	GTAC-TGAACTGTACT-TCTCTTTGCTCGAAAAGTG-AGGCGTT-GC-TGGTTGTGGAGG	541
EF213613	<i>P. gonapodyides</i>	GTAC-TGAACTGTACTCTCTCTTTGCGCGAAAAGCG-TGGCGTT-GC-TGGTTGTGGAGG	585
EF213599	<i>P. gonapodyides</i>	GTAC-TGAACTGTACTCTCTCTTTGCGCGAAAAGCG-TGGCGTT-GC-TGGTTGTGGAGG	585
AF266792	<i>P. humicola</i>	GTAC-TGAACTGTACTCTCTCTTTGCTCGAAAAGCG-TGGCGTT-GC-TGGTTGTGGAGG	546
AF228076	<i>P. boehmeriae</i>	GTAG--ATACTGTTCT-TCTCTTTGCTCGAAAAGCTGTGCAGAATGT-ATGTTGTGGAGG	537
DQ286726	<i>P. gallica</i>	GTAG--ATACTGTTCT-TCTCTTTGCTTGAAGAAGCTTTCGAGAT--G-TGGTTGTGGAGG	548
AF271227	<i>Py. aphanidermatum</i>	GTAC---GTTGCTCT-TTCTGTGTCTAAGTGAAGTGTGATTCTC-GAATCGCGGTGA	495
		* * * * *	

continuação

AF271221	<i>P. richardiae</i>	-CTGCCGTTTTCGGCCATGT-CGGC-GACTGATTT-CGTGCTGAGGCGTGT---GGGGAG	557
DQ275189	<i>P. quininea</i>	-CTGCCGTTTTCGGCCATGT-CGGC-GACTGATTT-CGTGCTGAGGCGTGT---GGGGAG	556
DQ297400	<i>P. captiosa</i>	-CTGCC-TGCGTGGCCAGT-CGGC-GACTGATTT-CGTGCTGAGACGGT----GGGGAG	574
DQ297405	<i>P. captiosa</i>	-CTGCC-TGCGTGGCCAGT-CGGC-GACTGATTT-CGTGCTGAGACGGT----GGGGAG	574
DQ059570	<i>P. glovera</i>	-CTGCC-TGCGTGGCCAGT-CGGC-GACCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTT-AAAGGAGGA	553
AF279127	<i>P. glovera</i>	-CTGCC-TGCGTGGCCAGT-CGGC-GACCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTT-AAAGGAGGA	546
AY251649	<i>P. meadii</i>	-CTGCC-TGCGTGGCCAGT-CGGC-GACCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTT-AATGGAGGA	571
DQ648143	<i>P. syringae</i>	-CTGCC-TGTGCGGCAAGT-CGGC-GACCGGTTTGTTAAGTTCGCGGCGTTT-AATGGAGGA	580
DQ335635	<i>P. primulae</i>	-CTGCC-TGTGCGGCAAGT-CGGC-GACCGGTTTGTTAAGTTCGCGGCGTTT-AATGGAGGA	580
EF213616	<i>P. syringae</i>	-CTGCC-TGTGCGGCAAGT-CGGC-GACCGGTTTGTTAAGTTCGCGGCGTTT-AATGGAGGA	617
AF266802	<i>P. primulae</i>	-CTGCC-TGTATGGCCAGT-CGGC-GACCGGTTTGTCTGCTGCGGTGTTT-A-TGGAGAA	574
AY117033	<i>P. kelmania</i>	-CTGCC-TGTGTGGCCATGT-CGGC-GACCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTT-AATGGAGGA	581
DQ338528	<i>P. kelmania</i>	-CTGCC-TGTGTGGCCATGT-CGGC-GACCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTT-AATGGAGGA	581
DQ831528	<i>P. sinensis</i>	-CTGCC-TGTATGGCCAGT-CGGC-GACCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTT-AATGGAGGA	577
AF266768	<i>P. sinensis</i>	-CTGCC-TGTATGGCCAGT-CGGC-GACCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTT-AATGGAGGA	606
AB217675	<i>P. cinnamomi</i>	-CTGCC-TGTATGGCCAGT-CGGC-GACCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTT-AATGGAGGA	604
EF150873	<i>P. cinnamomi</i>	-CTGCC-TGTATGGCCAGT-CGGC-GACCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTT-AATGGAGGA	604
EF486693	<i>P. cambivora</i>	-CTGCC-TGTGTGGCCAGT-CGGC-GACCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTT-AATGGAGGA	982
DQ313222	<i>P. europeae</i>	-CTGCC-TGTGTGGCCAGT-CGGC-GACCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTT-AATGGAGGA	606
EF426559	<i>P. nicotianae</i>	-CTGCT-ATTGTGGCAAAT-TGGC-GACTGGTTTGTCTGCTGCGGCGTT--AATGGAAGA	599
EF187913	<i>P. nicotianae</i>	-CTGCT-ATTGTGGCAAAT-TGGC-GACTGGTTTGTCTGCTGCGGCGTT--AATGGAGA	629
L41378	<i>P. iranica</i>	-CTGTT-ACTGTGGCCAAT-TGGC-GACCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTT--AATGGAAGA	611
AJ131987	<i>P. iranica</i>	-CTGTT-ACTGTGGCCAAT-TGGC-GACCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTT--AATGGAAGA	586
AJ131989	<i>P. clandestina</i>	-CTGTT-ACTGTGGCCAAT-TGGC-GACCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTT--AATGGAAGA	584
DQ182744	<i>P. palmivora</i>	-CTGCT-TGCGTAGCCAGTCTGGC-GACCGGTTTGTCTGCTGTGGCATT--AATGGAGGA	584
DQ538512	<i>P. palmivora</i>	-CTGCT-TGCGTAGCCAGTCTGGC-GACCGGTTTGTCTGCTGTGGCATT--AATGGAGGA	594
Phy12		-CTGCC-CATGTGGCCAGT-CGGC-GACCGGTTTGTCTGCTGCGGTGTTTTACTGGAGGA	558
Phy73		-CTGCC-CATGTGGCCAGT-CGGC-GACCGGTTTGTCTGCTGCGGTGTTTTACTGGAGGA	558
Phy2		-CTGCC-CATGTGGCCAGT-CGGC-GACCGGTTTGTCTGCTGCGGTGTTTTACTGGAGGA	558
AM5		-CTGCC-CATGTGGCCAGT-CGGC-GACCGGTTTGTCTGCTGCGGTGTTTTACTGGAGGA	558
Phy23		-CTGCC-CATGTGGCCAGT-CGGC-GACCGGTTTGTCTGCTGCGGTGTTTTACTGGAGGA	558
Phy65		-CTGCC-CGTGTGGCCAGT-CGGC-GACTGGTTTGTCTGCTGCGGTGTTTTACTGGAGGA	561
Phy92		-CTGCC-CGTGTGGCCAGT-CGGC-GACTGGTTTGTCTGCTGCGGTGTTTTACTGGAGGA	561
AM3		-CTGCC-CGTGTGGCCAGT-CGGC-GACTGGTTTGTCTGCTGCGGTGTTTTACTGGAGGA	561
Phy11		-CTGCC-CGTGTGGCCAGT-CGGC-GACTGGTTTGTCTGCTGCGGTGTTTTACTGGAGGA	561
Phy17		-CTGCC-CGTGTGGCCAGT-CGGC-GACTGGTTTGTCTGCTGCGGTGTTTTACTGGAGGA	561
Phy61		-CTGCC-CGTGTGGCCAGT-CGGC-GACTGGTTTGTCTGCTGCGGTGTTTTACTGGAGGA	561
DQ302411	<i>P. bisheria</i>	-CTGCC-CGCGTGGCCAGT-CGGC-GACCGGTTTGTCTGCTGCGGTGTTTTACTGGAGGA	597
EF213613	<i>P. gonapodyides</i>	-CTGCC-TGTGTGGCCAGT-CGGC-GACCGGTTTGTAGCTGTGACGTTT-AATGGAGGA	640
EF213599	<i>P. gonapodyides</i>	-CTGCC-TGTGTGGCCAGT-CGGC-GACCGGTTTGTAGCTGTGACGTTT-AATGGAGGA	640
AF266792	<i>P. humicola</i>	-CTGCC-CGTATGGCCAGT-CGGC-GACCGGTTTGTAGCTGTAGTATAT-ACTGGAGGA	601
AF228076	<i>P. boehmeriae</i>	-CTGCC-ATCACGGCATGT-CGGC-GACTGATTT-CGTGCTGAGGCGTTT---TGGAGAG	589
DQ286726	<i>P. gallica</i>	-CTGCC-ATCATGGCAAGT-CGGC-GACTGATTT-CGTGCTGAGGCGTTT---TGGAGAG	600
AF271227	<i>Py. aphanidermatum</i>	TCTGTTTGGATCGCTTTGGCCATTGGGCGACTT--CGTTAGGACATT--AAAGGAAGC	551
		*** * ** *	**

continuação

AF271221	<i>P. richardiae</i>	AGGCTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACCT-CT-GCTTATTGGTCTTTTTTT	615
DQ275189	<i>P. quininea</i>	AGGCTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACCT-CT-GCTTATTGGGCTTTTTTC	614
DQ297400	<i>P. captiosa</i>	GGGCTTGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACCT-CT-GCTTATTGGGCTCTTTTC	632
DQ297405	<i>P. captiosa</i>	GGGCTTGATTTCGCGGTATGGTTGGCT-----	600
DQ059570	<i>P. glovera</i>	GTGTCCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAG-GC-GCTTATTGAATGCTTTTC	611
AF279127	<i>P. glovera</i>	GTGTCCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAG-GC-GCTTATTGAATGCTTTTC	604
AY251649	<i>P. meadii</i>	GTGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAG-GC-GCTTATTGATGCTTTTC	629
DQ648143	<i>P. syringae</i>	GTGTTCGATTTCGCGGTATGGATTGGCTTCGGCTGAACAG-AC-GCTTATTGAGTACTTTTC	638
DQ335635	<i>P. primulae</i>	GTGTTCGATTTCGCGGTATGGATTGGCTTCGGCTGAACAG-AC-GCTTATTGAGTACTTTTC	638
EF213616	<i>P. syringae</i>	GTGTTCGATTTCGCGGTATGGATTGGCTTCGGCTGAACAG-AC-GCTTATTGAGTACTTTTC	675
AF266802	<i>P. primulae</i>	GTGTTTAAATTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAATGC-GCTTATTAATGTTTTTC	633
AY117033	<i>P. kelmania</i>	GTGTTCGATTTCGCGGTATGATCGGCTTCGGCTGAACAG-AC-GCTTATTGGGTGCTTTTC	639
DQ338528	<i>P. kelmania</i>	GTGTTCGATTTCGCGGTATGATCGGCTTCGGCTGAACAG-AC-GCTTATTGGGTGCTTTTC	639
DQ831528	<i>P. sinensis</i>	GTGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAATGC-GCTTATTGGATGCTTTTC	636
AF266768	<i>P. sinensis</i>	GTGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAATGC-GCTTATTGGATGCTTTTC	665
AB217675	<i>P. cinnamomi</i>	GTGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAAAGC-GCTTATTGGATGTTCTTC	663
EF150873	<i>P. cinnamomi</i>	GTGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAAAGC-GCTTATTGGATGTTCTTC	663
EF486693	<i>P. cambivora</i>	GTGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAATGC-GCTTATTGGACGTCTTTC	1041
DQ313222	<i>P. europeae</i>	GTGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAATGC-GCTTATTGGACGTCTTTC	665
EF426559	<i>P. nicotianae</i>	GTGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAATGC-ACTTATTGGACGTTTTTTC	658
EF187913	<i>P. nicotianae</i>	GTGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAATGC-ACTTATTGGACGTTTTTTC	688
L41378	<i>P. iranica</i>	ATGCTTGATTTCGCGGTATGATTGGCTTCGGCTGAACAATGC-GCTTATTGGGTGTTTATC	670
AJ131987	<i>P. iranica</i>	ATGCTTGATTTCGCGGTATGATTGGCTTCGGCTGAACAATGC-GCTTATTGGGTGTTTATC	645
AJ131989	<i>P. clandestina</i>	ATGCTTGATTTCGCGGTATGATTAGCTTCGGCTGAACAATGC-GCTTATTGGGTGTTTATC	643
DQ182744	<i>P. palmivora</i>	GTGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAG-AC-GCTTATTAATATTTCTT	642
DQ538512	<i>P. palmivora</i>	GTGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAG-AC-GCTTATTGTAATTTCTT	652
Phy12		GTGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAGAC--GCTTATTGGATGTTTTTC	616
Phy73		GTGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAGAC--GCTTATTGGAAGTTTTTC	616
Phy2		GTGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAGAC--GCTTATTGGATGTTTTTC	616
AM5		GTGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAGAC--GCTTATTGGATGTTTTTC	616
Phy23		GTGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAGAC--GCTTATTGGATGTTTTTC	616
Phy65		GTGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAGAC--GCTTATTGGGTGTTTTTC	619
Phy92		GTGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAGAC--GCTTATTGGGTGTTTTTC	619
AM3		GTGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAGAC--GCTTATTGGGTGTTTTTC	619
Phy11		GTGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAGAC--GCTTATTGGGTGTTTTTC	619
Phy17		GTGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAGAC--GCTTATTGGGTGTTTTTC	619
Phy61		GTGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAGAC--GCTTATTGGGTGTTTTTC	619
DQ302411	<i>P. bisheria</i>	GTGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAGGC--GCTTATTGGACGTTTTTTC	655
EF213613	<i>P. gonapodyides</i>	GTGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAATCT-GCTTATTGGGTGCTTTTC	699
EF213599	<i>P. gonapodyides</i>	GTGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAATCT-GCTTATTGGGTGCTTTTC	699
AF266792	<i>P. humicola</i>	GTGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAATCT-GCTTATTGGGTACTTTTC	660
AF228076	<i>P. boehmeriae</i>	GGGTTTCGATTTCGCGGTAGTGTGGTTTCGGCCGAACAATCT-GCTTATTGGGTCTTTTC	648
DQ286726	<i>P. gallica</i>	G-GCTTGATTTCGCGGTAGTGTGGTTTCGGCTGAACAATCT-GCTTATTGTGCTTTTTTC	658
AF271227	<i>Py. aphanidermatum</i>	AACCTCTATTGGCGGTATGTTAGGCTTCGGCCGACGTTGCAGCTGACAGAGTGGTTT	611

<sup>1</sup>As sequências Phy 02, Phy 12, Phy 17, Phy 23, Phy 61, Phy 65, Phy 73, Phy 92, Phy 111, AM5, AN2003 são originadas deste estudo, enquanto as demais foram buscadas do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)