

Análise filogenética de *Phytophthora capsici* Leonian do Estado de São Paulo baseada na seqüência de nucleotídeos da região ITS-5.8S rDNA

Daniel Dias Rosa^{1*}, Janaina Marianno de Marque¹, Roseli Chela Fenille², Nilton Luiz de Souza¹ e Eiko Eurya Kuramae³

¹Departamento de Produção Vegetal, Universidade Estadual Paulista, Caixa Postal 237, 18603-970, Botucatu, São Paulo, Brasil. ²Laboratório de Apoio Vegetal, Mapa, Praça Cívica, 100, Caixa Postal 149, 74003-010, Goiânia, Goiás, Brasil. ³The Centraalbureau voor Schimmelcultures, Fungal Biodiversity Center, Utrecht, The Netherlands. *Author for correspondence. e-mail: danieldr@hotmail.com

RESUMO. Análise filogenética através de características morfológicas e culturais é considerada inconsistente e de difícil aceitação científica, uma vez que não há como estabelecer a direção da evolução de caracteres morfológicos. Os marcadores moleculares são mais apropriados para análises filogenéticas. O seqüenciamento das regiões ITS1 e ITS2 (*Internal Transcribed Spacer*) e o gene 5.8S rDNA foram utilizados para estimar a variação e a distância genética entre 10 isolados de *Phytophthora capsici*. A quantidade de variação genética entre os isolados de *P. capsici* de diferentes regiões do Estado de São Paulo foi de 0,1% a 1,6% e de 0,1% a 1,1% nas regiões ITS1 e ITS2, respectivamente, e uma distância filogenética de 78,5% entre os isolados de *P. capsici* e *Phytophthora* spp.

Palavras chave: DNA ribossomal, ITS, filogenia, *Phytophthora* sp.

ABSTRACT. Phylogenetic analysis of *Phytophthora capsici* Leonian in the state of São Paulo based on the nucleotides sequence of ITS-5.8S rDNA region. Phylogenetic analysis through morphological and cultural traits is considered inconsistent and hard to be scientifically accepted once there is no way to establish the direction of evolution on morphological traits. Molecular markers are suitable for phylogenetic analysis. The sequencing of ITS1 and ITS2 (internal transcribed spacers) regions and of 5.8S gene from ribosomal DNA were used to estimate the genetic variation and distance of 10 *Phytophthora capsici* isolates. The amount of genetic variation amongst isolated *P. capsici* from distinct regions of São Paulo State was 0.1 to 1.6 and 0.1 to 1.1% at ITS1 and ITS2, respectively, and a phylogenetic distance of about 78.5% between *P. capsici* and *Phytophthora* spp. was observed.

Key words: Ribosomal DNA, ITS, phylogeny, *Phytophthora* sp.

Introdução

O gênero *Phytophthora* é estudado desde o início da fitopatologia (Erwin e Ribeiro, 1996) e abrange patógenos destrutivos a inúmeras espécies de plantas no mundo (Lee e Taylor, 1992). São descritas mais de 60 espécies das quais *Phytophthora capsici* Leonian é uma das muitas estudadas e conhecidas, devido aos danos que causa à cultura do pimentão. *Phytophthora capsici* foi descrita pela primeira vez por Leonian (1922) e, atualmente, está classificada taxonomicamente como pertencente ao reino Chromista (Hawksworth *et al.*, 1995). Esse patógeno é o agente causal da murchadeira em plantas de pimentão, mas também pode atacar outras espécies como tomate e berinjela (Azevedo e Silva, 1986).

A classificação taxonômica clássica de *P. capsici* leva em consideração importantes critérios, tais como: forma e natureza do esporângio, forma de inserção do anterídio com o oogônio e seletividade de hospedeiros (Stamps *et al.*, 1990). Técnicas moleculares também têm sido utilizadas conjuntamente com caracteres morfológicos, no intuito de auxiliar a classificação de *Phytophthora*. Através do uso de marcadores isoenzimáticos, Mchau e Coffey (1995) dividiram a espécie *P. capsici* em dois grandes grupos, CapA e CapB. As seqüências de nucleotídeos das regiões internas transcritas (ITS1 e ITS2) do gene ribossomal 5.8S rDNA, bem como o próprio gene 5.8S rDNA têm sido utilizadas na taxonomia de *Phytophthora* (Berbee e Taylor, 1992; Lee e Taylor, 1992), visando a um rápido diagnóstico de *P.*

capsici, Ristaine et al. (1999) desenvolveram oligonucleotídeos específicos, utilizando, assim, seqüências de nucleotídeos da região ITS 1-5.8S rDNA-ITS 2.

O uso da região ITS1-5.8S-ITS2 para fins de filogenia tem sido muito utilizado atualmente, por ser, muitas vezes, uma região específica para cada espécie e com baixas variações dentro do gênero (Cooke et al., 2000). As seqüências dessa região têm sido muito utilizadas na detecção e identificação de novas espécies de *Phytophthora* e outros oomycetos como *Pythium* (Paul, 2001).

A hipótese da evolução do gênero *Phytophthora* a partir de ancestrais do gênero *Pythium*, inicialmente proposta por Tucker (1931) e Gäumann (1952), foi somente comprovada com o uso de técnicas moleculares, através do seqüenciamento da região ITS-rDNA. Através das seqüências dessa região foi possível também o estudo mais aprofundado e comprovativo das relações filogenéticas entre o gênero *Phytophthora* e os outros oomycetos. Estudos realizados por Nues et al. (1994) e Briard et al. (1995) na família Pythiaceae, utilizando seqüências do 28S rDNA e ITS, demonstram uma divisão em grupos distintos, tais como do gênero *Phytophthora* e *Pythium*.

O objetivo deste estudo, portanto, foi analisar as relações filogenéticas existentes entre os isolados de *Phytophthora capsici* Leonian obtidos de plantas de pimentão de diferentes regiões produtoras no Estado de São Paulo.

Material e métodos

Condições de crescimento e extração de DNA

Os isolados de *Phytophthora capsici* dos quais extraiu-se DNA, assim como as seqüências obtidas junto ao GenBank, estão listados na tabela 1. O crescimento de cada isolado foi efetuado em 100mL de meio de cultura líquido batata-dextrose, em frascos de 250mL, para onde foram transferidos de 3 a 5 discos de 5mm de diâmetro, de meio de cultura com crescimento micelial do fungo. A cultura foi incubada à temperatura de 26°C, por 5 dias no escuro, sob agitação de 150 rpm. Após esse período, o micélio foi filtrado e lavado com água bidestilada e esterilizada. O micélio obtido foi macerado em nitrogênio líquido e a extração de DNA genômico total foi realizada segundo metodologia de Kuramae-Izioka (1997).

Seqüenciamento da região ITS-5.8S rDNA e análise dos dados.

Procedeu-se à reação de PCR dos isolados de *Phytophthora capsici* utilizando-se os oligonucleotídeo ITS4 e ITS5 (White et al., 1990) para ITS (*Internal Transcribed Spacers*) e gene 5.8S rDNA (DNA

Ribossômico). As amplificações foram realizadas empregando-se 100ng de DNA genômico, 1,5mM de MgCl₂, 2 U de Taq DNA polimerase, 0,2mM de cada dNTP, 50mM de KCl, 10mM Tris-HCl e 0,2mM de cada oligonucleotídeo. A reação foi procedida em termociclador utilizando-se o programa: 94°C por 2 min., para denaturação inicial; 35 ciclos de 94°C por 1 min., 55°C por 1min., 72°C por 2min., e ; 5min. a 72°C.

O fragmento de DNA amplificado foi visualizado em gel de agarose 1%, em um transiluminador (Sambrook et al., 1989). Os produtos de PCR foram purificados em coluna MicroSpin S-400 HR conforme instruções do fabricante (Amersham Pharmacia).

As reações de seqüenciamento foram realizadas para um volume de 10µL, utilizando-se 75ng do produto de PCR purificado ou do produto de clonagem, 2,0µL de "Big Dye Terminator" da Amersham, 3,5µL de água ultrapura MilliQ e 1mM de cada um dos "oligonucleotídeo" ITS2, ITS3, ITS4 e ITS5, de acordo com o protocolo para "Amersham Premix Terminator" (Amersham Pharmacia). Estas foram submetidas à reação de seqüenciamento em termociclador PTC-100 (MJ. Research, Alameda, CA, EUA) para um ciclo a 96°C por 2min., seguido de 35 ciclos a 96°C por 1min., 35°C por 1min., 72°C por 1,5min., e um ciclo a 72°C por 5min.

O seqüenciamento foi realizado em placas de 48cm, utilizando-se um gel de poliacrilamida "Long Ranger" da FMC BioProducts. O seqüenciamento foi efetuado em um seqüenciador de nucleotídeo (PE Applied Biosystems Model 377 DNA Sequencer) de acordo com instruções do fabricante. As quatro seqüências obtidas pelos quatro oligonucleotídeos, para cada isolado, foram analisadas e alinhadas utilizando-se "Phred/Phrap/Consed" (Ewing et al., 1998; Gordon et al., 1998). A seqüência-consenso obtida do alinhamento teve qualidade "Phred" maior que 20. A seqüência-consenso de todos os isolados de *Phytophthora capsici* mais as seqüências da região ITS-5.8S rDNA dos isolados do GenBank (Tabela 1) foram alinhadas usando o software ClustalX. Ao utilizar o software ClustalX, foi gerada uma árvore filogenética entre os isolados através do método "Neighbor-joining" (Saito e Nei., 1987) com valores de 1000 "bootstrap" e visualizada no programa Treeview (Page, 1996) e njplotWIN95 do kit ClustalX (Thompson et al., 1997). Foi gerado um arquivo nexus, o qual foi empregado para a análise de relações filogenéticas dos isolados. Obteve-se, assim, uma matriz de similaridade, utilizando-se o software PAUP* (version 4.0b5a, Swafford, 2001) com análise heurística de 50 réplicas de "tree-bisection-reconnection" (TBR) para análise do algoritmo "branch-swapping" para relações filogenéticas.

Tabela 1. Isolados de *Phytophthora* spp. e *Pythium zingiberum* estudados.

Isolado	Acesso ^(a)	Hospedeiro	Origem	Ano
P1 - <i>Phytophthora capsici</i>	----	<i>Capsicum annuum</i> L.	Sorocaba/SP/Brasil	1998
P5 - <i>Phytophthora capsici</i>	----	<i>Capsicum annuum</i> L.	Paulínia/SP/Brasil/	1999
P6 - <i>Phytophthora capsici</i>	----	<i>Capsicum annuum</i> L.	Bernardino de Campos/SP/Brasil	1999
P7 - <i>Phytophthora capsici</i>	----	<i>Capsicum annuum</i> L.	Bernardino de Campos/SP/ Brasil	1999
P8 - <i>Phytophthora capsici</i>	----	<i>Capsicum annuum</i> L.	Guareí/SP/ Brasil/	2000
P12 - <i>Phytophthora capsici</i>	----	<i>Capsicum annuum</i> L.	Paulínia/SP/Brasil	1998
P13 - <i>Phytophthora capsici</i>	----	<i>Capsicum annuum</i> L.	São Miguel Arcanjo/SP/ Brasil	1998
P15 - <i>Phytophthora capsici</i>	----	<i>Capsicum annuum</i> L.	Bragança Paulista/SP/Brasil/	1998
P22 - <i>Phytophthora capsici</i>	----	<i>Capsicum annuum</i> L.	Ubatuba/SP/Brasil/	1998
P23 - <i>Phytophthora capsici</i>	----	<i>Capsicum annuum</i> L.	Jarinu/SP/Brasil	1999
<i>Phytophthora fragariae</i> var. <i>fragariae</i>	AF266762	<i>Fragaria x ananassa</i>	Escócia	1979
<i>Phytophthora fragariae</i> var. <i>rubi</i>	AF266761	<i>Rubus idaeus</i>	Suíça	1935
<i>Phytophthora infestans</i>	AF266779	<i>Solanum tuberosum</i>	Holanda	1986
<i>Phytophthora citricola</i>	AF266788	<i>Rubus idaeus</i>	Irlanda	1986
<i>Phytophthora cithophthora</i>	AF266785	<i>Actinidia chinensis</i>	Chile	1989
<i>Phytophthora capsici</i>	gi 8927493	<i>Piper nigrum</i>	Índia	1989
<i>Phytophthora capsici</i>	gi 7453609	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Coreia	----
<i>Phytophthora capsici</i>	gi 7453608	<i>Capsicum annuum</i>	Coreia	----
<i>Pythium zingiberum</i>	gi 6468692	----	Japão	----
<i>Phytophthora palmivora</i>	AF266780	<i>Theobroma cacao</i>	Papua Nova Guínea	1994
<i>Phytophthora humicola</i>	AF266792	<i>Citrus</i> sp.	Taiwan	1981
<i>Phytophthora gonapodyides</i>	AF266793	<i>Salix matsudana</i>	Reino Unido	1972
<i>Phytophthora megasperma</i>	AF266794	<i>Malus silvestris</i>	Austrália	1968
<i>Phytophthora cactorum</i>	AF266772	<i>Rubus idaeus</i>	País de Gales	1985
<i>Phytophthora nicotinae</i>	AF266776	----	Austrália	----
<i>Phytophthora tentaculata</i>	AF266775	<i>Chrysanthemum leucanth.</i>	Alemanha	1992
<i>Phytophthora iranica</i>	AJ131987	<i>Solanum melongena</i>	Irã	1969
<i>Phytophthora phaseoli</i>	AF266778	<i>Phaseolus lunatus</i>	----	----
<i>Phytophthora sojae</i>	AF266769	<i>Glicine max</i>	Austrália	1994
<i>Phytophthora melonis</i>	AF266767	<i>Cucumis</i> sp.	China	1988
<i>Phytophthora vignae</i>	AF266766	<i>Vigna sinensis</i>	Austrália	1988
<i>Phytophthora europaea</i>	AF449493	<i>Quercus</i> sp.	Alemanha	2002
<i>Phytophthora lateralis</i>	AF266804	<i>Chamaecyparis lawsoniana</i>	U.S.A	1942
<i>Phytophthora syringae</i>	AF266803	<i>Rubus idaeus</i>	Escócia	1985
<i>Phytophthora brassicae</i>	AF266801	<i>Brassica chinensis</i>	Reino Unido	2000
<i>Phytophthora porri</i>	AF266801	<i>Brassica chinensis</i>	Holanda	1995

a- Número de acesso do GenBank, NCBI, das seqüências utilizadas neste estudo.

As seqüências de *P. capsici* foram alinhadas juntamente com as seqüências do NCBI (Tabela 1), considerando-se a seqüência de *Pythium zingiberum* como “Outgroup” para as análises de suas relações filogenéticas. Após alinhamento, efetuaram-se as análises das regiões ITS1, 5.8S rDNA e ITS2, separadamente.

Para detecção de polimorfismos nas seqüências dos isolados de *P. capsici*, utilizou-se o programa computacional DnaSP versão 3 (Rozas e Rozas, 1999), empregando-se o método de DNA polimorfismo. Essa análise detectou os tipos de polimorfismos e as relações desses polimorfismos entre os isolados de *P. capsici*.

Resultados e discussão

Ao utilizar os “oligonucleotídeos” ITS 4 e ITS 5, obteve-se o fragmento da região ITS1-5.8S rDNA-ITS2 de cada um dos 10 isolados de *P. capsici*. Os fragmentos amplificados variaram de 854pb a 860 pb, com as regiões ITS1 e ITS2 variando entre 192-239pb e 395-470pb, respectivamente. Os fragmentos amplificados do gene 5.8S rDNA variaram entre 142-145pb.

Análise filogenética

A análise filogenética das seqüências das regiões ITS-5.8S rDNA dos isolados de *P. capsici*, obtidos de plantas de pimentão (*Capsicum annuum*) com sintomas de murcha, foi realizada conjuntamente com seqüências disponíveis no Banco Mundial de Seqüências (National Center for Biotechnology Information - NCBI). Do NCBI foram obtidas seqüências de *P. fragariae* var. *rubi*, *P. fragariae* var. *fragariae*, *P. infestans*, *P. citricola*, *P. cithophthora*, *P. palmivora*, *P. humicola*, *P. gonapodyides*, *P. megasperma*, *P. cactorum*, *P. nicotinae*, *P. tentaculata*, *P. iranica*, *P. phaseoli*, *P. sojae*, *P. melonis*, *P. vignae*, *P. europaea*, *P. lateralis*, *P. syringae*, *P. brassicae*, *P. porri* e *Pythium zingiberum*, bem como as três únicas seqüências inteiras da região ITS-5.8S rDNA de *P. capsici* disponíveis no NCBI até o presente momento (Tabela 1). Na análise da região ITS1, constatou-se que os 10 isolados de *P. capsici*, obtidos no Estado de São Paulo, apresentaram de 98,4% a 100% de similaridade genética com o isolado de *P. capsici* (gi|8927493), sendo que para 6 deles (P5, P7, P12, P15 e P23) a similaridade foi de 100% (Tabela 2). Na análise de sítios

Tabela 2. Porcentagem de similaridade entre isolados de *Phytophthora capsici* e o isolado de *Phytophthora capsici* (gi|8927493|) do NCBI nas regiões ITS 1 e ITS 2.

	P1	P5	P6	P7	P8	P12	P13	P15	P22	P23	gi 8927493
P1		99,4	98,9	99,4	98,9	99,4	99,4	99,4	98,9	99,4	99,4
P5	99,8		99,4	100	99,4	98,9	99,4	99,4	98,9	99,4	100
P6	99,1	98,9		99,4	98,9	99,4	99,4	99,4	98,9	99,4	99,4
P7	99,8	99,5	99,3		99,4	100	100	100	99,4	100	100
P8	98,9	98,5	99,3	99,3		99,4	99,4	99,4	100	99,4	99,4
P12	99,5	99,3	99,5	99,3	99,1		100	100	99,4	100	100
P13	99,1	98,9	98,6	98,9	98,4	99,1		100	99,4	100	100
P15	100	99,8	99,1	99,8	98,9	99,5	99,1		99,4	100	100
P22	99,3	99,1	98,9	99,1	98,6	99,3	99,8	99,3		99,4	99,4
P23	99,5	99,3	98,6	99,3	98,4	99,1	98,6	99,5	98,9		100
gi 8927493	99,3	99,3	98,8	99,1	98,6	99,3	99,8	99,3	100	98,8	

polimórficos, verificaram-se 3 sítios polimórficos na região ITS1, sendo somente um deles, presente no isolado P6, parcimonicamente significativo, ocorrendo, dessa forma, a mudança do nucleotídeo G (guanina) para A (adenina), na posição 185 bp da região ITS1.

Na análise da região do gene 5.8S rDNA, constatou-se similaridade variando de 99,8% a 100%, sendo que dos 10 isolados, 8 (P1, P6, P7, P8, P12, P13, P22 e P23) apresentaram 100% de similaridade com o isolado de *P. capsici* (gi|8927493). Na análise de polimorfismo, foi encontrado apenas um sítio polimórfico parcimonico no gene 5.8S rDNA, nos isolados P5 e P15, ocorrendo a troca do nucleotídeo G (Guanina) por T (Timina), na posição 37 bp do gene 5.8S rDNA.

Na análise da região ITS2, foi constatada similaridade genética variando de 98,4% a 100% entre os isolados de *P. capsici* e o isolado de *P. capsici* (gi|8927493). Diferentemente do verificado em relação à região ITS1, na região ITS2 somente o isolado P22 apresentou similaridade de 100% com o isolado de *P. capsici* (gi|8927493), demonstrando uma maior variabilidade dessa região (tabela 2). Observou-se na região ITS2 15 sítios polimórficos, 2 sítios no isolado P6, 3 sítios no P8, 1 sítio no P12, 2 sítios no P7, 1 sítio no P1, 3 sítios no P5 e 3 sítios no P15. Desses 15 sítios polimórficos, 12 foram parcimonicamente significativos, nos isolados P1, P5, P6, P7, P12 e P15, com três mudanças do nucleotídeo A para T, 2 mudanças de C para T, 2 mudanças de A para G e 5

mudanças de T para C. Tais mudanças ocorreram nas posições 409, 447, 485, 515, 598, 609, 684, 747, 761, 767, 809 e 825 da região do ITS2.

Quando efetuou-se a comparação dos isolados obtidos da mesma região do estado, como, por exemplo, os isolados P6 e P7, oriundos da região de Bernardino de Campos, obteve-se a similaridade de 99,4% e 99,3% para regiões ITS1 e ITS2, respectivamente. Em geral, contudo, não se obteve qualquer correlação entre a região de origem e os índices de similaridade de 100%.

Na matriz de similaridade das sequências ITS1-5.8S-ITS2 dos 10 isolados de *P. capsici* com os isolados de *Phytophthora* do NCBI, evidenciou-se uma similaridade genética variando de 88,3% a 99,9% e quando esses foram comparados ao isolado de *Pythium zingiberum*, do NCBI, constatou-se similaridade genética variando de 64,6% a 65,2% (Tabela 3).

As relações filogenéticas entre os isolados de *P. capsici* e os isolados do NCBI foram analisadas pelo método “Neighbor-joining” e análise de heurística. A análise demonstrou uma maior proximidade dos isolados de *P. capsici*, obtidos no Estado de São Paulo, com os isolados de *P. capsici* (gi|8927493|), *P. capsici* (gi|7453609|) e *P. capsici* (gi|7453608|), seguidos por *P. citrophthora* e *P. citricola* (Figura 1), corroborando, dessa forma, os resultados obtidos por Förster et al. (1995, 2000), que analisaram a evolução dos Oomycetos incluindo as relações filogenéticas e evolutivas do gênero *Phytophthora*.

Tabela 3. Porcentagem de similaridade gerada com alinhamento das regiões ITS1-5.8S rDNA-ITS2 dos isolados de *P. capsici* junto a outros isolados obtidos do GenBank.

Padrões	Isolados									
	P1	P5	P6	P7	P8	P12	P13	P15	P22	P23
<i>P. fragariae</i> var. <i>fragariae</i> gi 8927468	88,90	88,80	88,40	88,90	88,70	88,80	89,30	88,80	89,50	88,80
<i>P. fragariae</i> var. <i>nubi</i> gi 8927467	88,80	88,70	88,30	88,80	88,60	88,70	89,20	88,70	89,30	88,70
<i>P. infestans</i> gi 8927485	90,60	90,50	90,20	90,60	90,30	90,60	90,60	90,50	90,70	90,50
<i>P. citricola</i> gi 8927494	97,10	96,90	96,70	97,10	96,90	97,10	97,30	96,90	97,50	96,90
<i>P. citrophthora</i> gi 17467328	95,30	95,10	94,90	95,30	95,00	95,40	95,40	95,10	95,40	95,10
<i>Pythium zingiberum</i> gi 6468692	64,80	64,80	64,60	64,80	65,00	65,10	65,20	64,70	65,20	65,10
<i>P. capsici</i> gi 8927493	99,50	99,30	99,10	99,50	99,10	99,50	99,90	99,30	99,90	99,30
<i>P. capsici</i> gi 7453609	99,20	99,10	98,80	99,20	99,10	99,20	99,60	99,10	99,90	99,10
<i>P. capsici</i> gi 7453608	99,20	99,10	98,80	99,20	99,10	99,20	99,60	99,10	99,90	99,10

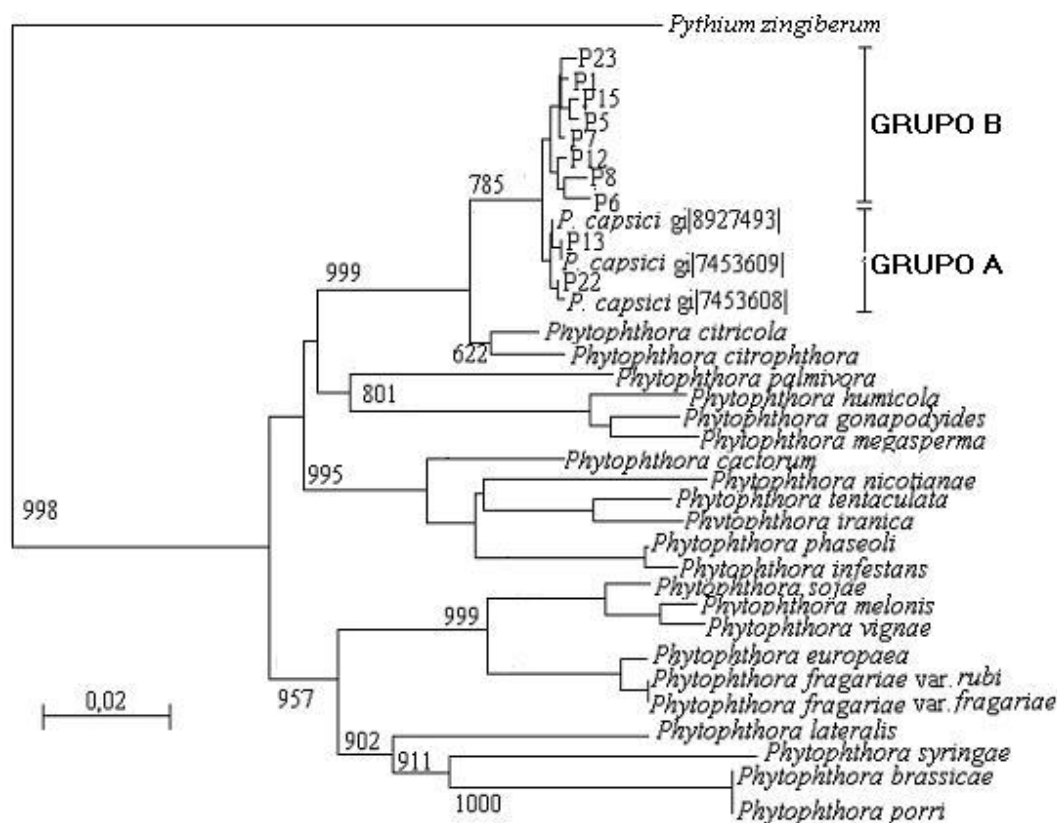


Figura 1. Dendrograma filogenético ilustrando a distância derivada das seqüências das regiões ITS-5.8S rDNA, Análise baseada no método de "Neighbour-joining", construído com base em 1000 réplicas dos dendrogramas com base no algoritmo de "bootstrap". O número nas ramificações representa o valor de 1000 "bootstrap". O isolado *Pythium zingiberum* foi utilizado como "outgroup".

No dendrograma obtido pela análise filogenética, (Figura 1), observa-se a formação de grupos, sendo os isolados de *P. capsici* agrupados em dois grupos, A e B.

No grupo A, ficaram os isolados do NCBI de *P. capsici* (gi|8927493|), *P. capsici* (gi|7453609|) e *P. capsici* (gi|7453608|) e os isolados P13 e P22, com similaridade de 99,9%. Ambos os isolados pertencem ao subgrupo de compatibilidade vegetativa A1.

No grupo B, ficaram os demais isolados, podendo esse ser dividido em três subgrupos. No primeiro subgrupo, ficaram os isolados P1, P7 e P23, todos do grupo de compatibilidade vegetativa A2, com similaridade genética de 99,4% em relação aos isolados do NCBI. No segundo subgrupo, ficaram os isolados P6, P12 e P8, os quais pertencem aos grupos de compatibilidade vegetativa A1, A1 e A2, respectivamente, sendo a similaridade genética em torno de 99,2% entre esses e os isolados do NCBI. Já no terceiro subgrupo, ficaram os isolados P5 e P15, dos grupos de compatibilidade vegetativa A1 e A2, respectivamente, com similaridade genética entre ambos e os isolados do NCBI em torno de 99,3%.

Essa separação deve-se, possivelmente, à variabilidade de nucleotídeos dentro do gene 5.8S rDNA desses isolados, no qual há a presença de uma troca parcimonicamente significativa de nucleotídeos, de guanina para timina, na posição 137 do gene (Figura 1, Tabela 2), demonstrando a existência de polimorfismo de diferenciação dentro da mesma espécie oriunda de diferentes regiões geográficas.

Neste estudo, mostrou-se a existência da variabilidade genética de *Phytophthora capsici* e juntamente sua filogenia, sendo, muitas vezes, constatada uma diferença filogenética de 1,4% entre os isolados de *P. capsici*. Essa diferença constatada pode, muitas vezes, significar diferenças de subgrupos, como no caso de *R. solani*, onde diferenças de 1,5% na seqüência de nucleotídeos da região ITS-5.8S rDNA podem separar os subgrupos GA1 IA e GA1 IB (Gonzalez *et al.*, 2001), demonstrando, assim, que a diferenciação genética das seqüências dos isolados do Estado de São Paulo, em relação as seqüências dos isolados obtidos no

GenBank, indica um índice satisfatório de variabilidade na população do patógeno.

No presente estudo, constatou-se que a região ITS1-5.8S rDNA-ITS2 apresenta-se como uma boa ferramenta para estudos filogenéticos e de taxonomia, como já indicado na literatura. As pequenas variações entre indivíduos de regiões distintas geograficamente e a boa discriminação entre espécies colocaram a análise de similaridade da sequência dessa região como importante método auxiliar da taxonomia de *Phytophthora capsici*.

Referências

- AZEVEDO, L.A.S.; SILVA, L. Patogenicidade de *Phytophthora capsici* Leonian isolado de frutos de moranga híbrida (Tetsukabuto) a frutos de sete espécies olerícolas. *Fitopatol. Bras.*, Brasília, v. 11, p. 1005-1008, 1986.
- BERBEE, M.L.; TAYLOR, J.W. Dating the evolutionary radiations of the true fungi. *Can. J. Bot.*, Ottawa, v. 71, n. 3, p. 1114-1127, 1992.
- BRIAND, M. et al. Ribosomal RNA sequence divergence within the Pythiaceae. *Mycol. Res.*, London, v. 99, n. 4, p. 1119-1127, 1995.
- COOKE, D.E.L. et al. A Molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. *Fungal Gen. Biol.*, San Diego, v. 30, n. 1, p. 17-32, 2000.
- EWING, B. et al. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.*, New York, v. 8, n. 1, p. 175-185, 1998.
- ERWIN, D.C.; RIBEIRO, O.K. *Phytophthora Diseases World wide*. APS Press, Am. Phytopathol. Soc., St.Paul. 1996.
- FÖRSTER, H. et al. Phylogenetic relationships of *Phytophthora* species based on ribosomal ITS 1 DNA sequence analysis with emphasis on Waterhouse groups V and VI. *Mycol. Res.*, London, v. 104, n.3, p. 1055-1061, 2000.
- FÖRSTER, H. et al. Towards a better understanding of the evolutionary history of the species of the genus *Phytophthora* using isoenzymes, DNA RFLP's, and spacer sequences. In: DOWLEY, L.J. et al. *Phytophthora*. European Association for Potato research, Dublin: Boole, Ltd., 1995. cap. 1, p. 42-54.
- GAÜMANN, E.A. *The Fungi*. A description of their morphological features and evolutionary development. New York and London: Hafner Publishing, 1952.
- GONZALEZ, D. et al. Ribosomal DNA systematics of *Ceratobasidium* and *Thanatephorus* with *Rhizoctonia* anamorphs. *Mycologia*, New York, v. 93, n. 6, p. 1138-1150, 2001.
- GORDON, D. et al. Consed: A graphical tool for sequence finishing. *Genome Research*, New York, v. 8, n. 1, p. 195-202, 1998.
- HAWKSWORTH, D.L. et al. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi, 8. ed. Wallingford: CAB International, 1995.
- KURAMAE-IZIOKA, E.E. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. *Revista Unimar, Maringá*, v. 19, n. 3, p. 683-689, 1997.
- LEE, S.B.; TAYLOR, J.W. Phylogeny of five fungus-like protist *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Mol. Biol. Evol.*, Oxford, v. 9, n. 1, p. 636-653, 1992.
- LEONIAN, L.H. Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici* sp. nov. *Phytopathology*, St. Paul, v. 12, n. 1, p. 401-408, 1922.
- MCHAU, G.R.A.; COFFEY, M.D. Evidence for the existence of two subpopulations in *Phytophthora capsici* and a redescription of the species. *Mycol. Res.*, New York, v. 99, n. 1, p. 89-102, 1995.
- NUES, R.W. et al. Separate structural elements within internal transcribed spacer 1 of *Saccharomyces cerevisiae* precursor ribosomal RNA direct the formation of 17S and 26S rDNA. *Nucleic Acids Res.*, Oxford, v. 22, n. 1, p. 912-919, 1994.
- PAUL, B. ITS1 region of the rDNA of *Pythium proliferatum*, a new species its taxonomy and its comparison with related species. *FEMS Microbios. Lett.*, Cambridge, v. 206, n. 1, p. 191-196, 2001.
- PAGE, R.D.M. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comp. Appl. Biosci.*, v. 12, n. 1, p. 357-358, 1996.
- RISTAINÉ, J.B. et al. PCR amplification of ribosomal DNA for species identification in the plant pathogen genus *Phytophthora*. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, DC., v. 64, n. 1, p. 948-954, 1998.
- ROZAS, J.; ROZAS, R. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics*, Oxford, v. 15, n. 1, p. 174-175, 1999.
- SAMBROOK, J. et al. *T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2.ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, NY. 1989.
- SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbor-joining Method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, Lawrence, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.
- STAMPS, D.J. et al. Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. CABI Mycology Institute. Mycology Paper n. 162, pp. 28, 1990.
- SWAFFORD, D.L. PAUP. Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). Version 4.0. Sunderland, MA, U.S.A.: Sinauer Associates. 2001.
- THOMPSON, J.D. et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, Oxford, v. 24, n. 4, p. 4876-4882, 1997.
- TUCKER, C.M. Taxonomy of the genus *Phytophthora*. Univ. Mo. Agric. Exp. Stn. Res. Bull. 153. 1931.
- WHITE, T.J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA gene for phylogenetics. In: INNIS, M.A. et al. *PCR protocols*, a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990, p. 315-322.

Received on February 24, 2003.

Accepted on November 28, 2003.