

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

***Phytophthora nicotianae*: ação de meios de cultura e da qualidade da luz no crescimento e esporulação e aspectos fisiológicos e bioquímicos da interação com porta-enxertos cítricos**

Paulo César das Mercês Santos

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba
2015**

Paulo César das Mercês Santos
Engenheiro Agrônomo

***Phytophthora nicotianae*: ação de meios de cultura e da qualidade da luz no crescimento e esporulação e aspectos fisiológicos e bioquímicos da interação com porta-enxertos cítricos**

Orientador:
Prof. Dr. **NELSON SIDNEI MASSOLA JÚNIOR**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2015

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Santos, Paulo César das Mercês

Phytophthora nicotianae: ação de meios de cultura e da qualidade da luz no crescimento e esporulação e aspectos fisiológicos e bioquímicos da interação com porta-enxertos cítricos / Paulo César das Mercês Santos. - - Piracicaba, 2015.
169 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. CLAE 2. Caracterização fisiológica 3. Qualidade da luz 4. TCMD 5. Armadilha
6. Exsudatos radiculares 7. Zoósporos 8. Atividade zoosporicida I. Título

CDD 632.252
S237p

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

A Deus

OFEREÇO

Aos meus pais, Edmilson e Maria do Socorro; aos meus irmãos: Sílvia de Nazaré, Silvana Antônia, Elison Roberto e José Ricardo; aos meus sobrinhos; aos meus avôs paternos e maternos (*in memoriam*); aos meus tios e tias e aos meus primos e primas pelo amor, gratidão, amizade, cuidado, palavras de incentivo, apoio incondicional e companheirismo mesmo que a distância fosse o obstáculo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pelas boas oportunidades da vida, por sua infinita misericórdia, pela sabedoria adquirida e perseverança para vencer as dificuldades da vida;

Aos professores do curso de doutorado, em especial: Hilton Couto (Bioestatística), Armando Bergamin Filho (Epidemiologia e Controle), Paulo Sentelhas (Agrometeorologia e Doenças em Plantas), Luis Aranha Camargo (Genética das Interações Patógeno–Hospedeiro) e Sérgio Pascholati (Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica), pelos ensinamentos repassados e boa convivência ao longo do curso;

Aos professores do Departamento de Fitopatologia e Nematologia: Francisco Tanaka, Ivan Bedendo, Jorge Rezende, José Belasque Junior, José Otávio Menten pela amizade;

Ao professor Dr. Nelson Massola Júnior pelos ensinamentos, amizade, ajuda, orientação, paciência, palavras de apoio e compreensão;

Aos membros da banca examinadora pelas preciosas sugestões e correções que visaram o melhoramento do trabalho;

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/Universidade de São Paulo (Esalq/USP), pelo apoio institucional, que serviu de base para o meu crescimento profissional e pessoal;

Às agências de fomento à pesquisa do governo federal: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão das bolsas de estudo, ao longo do curso, pois os auxílios financeiros foram decisivos para o desenvolvimento da pesquisa;

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Fungos Fitopatogênicos: Ananias Cruz, Bruna Carvalho, Carlos Bragança, Carolina Medeiros, Flávia Rogério, Hugo Tozze Júnior, Isabela Barbeiro, Juliana Ramiro, Maria Eugenia Escanferla, Marina Barbieri, Roberto Chapola, Sergio Pérez-Gómez, Thaís Boufleur e Wagner Pereira, pelos ensinamentos, ajuda, companheirismo, compreensão e amizade;

Aos meus colegas discentes do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia da Esalq/USP: Adalgisa Thayne Ramos, Alécio Moreira, Ana Carolina Alves, Ana Raquel Soares, Arnaldo Esquivel-Fariña, Carla Pinto, Caroline Costa,

Dalilla Rezende, Daniela Flôres, David Spadotti, Débora Freitas, Elizeu Munhoz, Guilherme Flare, Isabela Primiano, Jerônimo Araújo Filho, Juan Edwards-Molina, Juliana Baggio, Laura Garita-Salazar, Luiz Rafael Pinto, Mariane Ishizuka, Meyriele Camargo, Patricia Kreyci, Paula Panosso, Pedro Mansilla-Córdova, Rafaela Roma, Renan Alves, Renata Mesquini, Rodrigo Toloy, Simone Brand, Thiago Melo, Ticyana Banzato, Victor Souza e Viviana Camelo-García, pelos momentos de interação e amizade conquistada durante a minha estadia em Piracicaba;

Aos pós-doutorandos: Ana Paula Amaral-Mello, Fabrício Gonçalves, Júlio Barbosa, Maisa Ciampi, Maria Cândida Gasparoto, Maria Cristina da Silva, Sílvia Blumer e Thaís Martins, pela amizade e ensinamentos repassados;

Aos funcionários e técnicos do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, Fabiana Wolak, Fernanda Groppo, Iraides Oliveira, Jeferson Brajão, José Edivaldo Buriolla, José Rodolfo Groppo, Liliane Teixeira, Maria Heloisa Moraes, Pedro Arthuso, Sílvia Machado e Sílvia Lourenço, pela amizade, atenção, cordialidade e disponibilidade no atendimento aos alunos;

Aos alunos das disciplinas de graduação LFN0424 Fitopatologia (curso de Engenharia Agrônômica) e LFN0321 Microbiologia (cursos de Engenharia Agrônômica e Engenharia Florestal) da Esalq, durante a Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE);

A Marcia Carvalho, Adilson da Silva, Cartiane Rocha, Leonardo Martins, Nardélio dos Santos e Tatiane Tokairin pela amizade construída ao longo da minha estadia em Piracicaba;

Aos funcionários da Divisão de Biblioteca e Documentação (DIBD) da Esalq/USP: Airton Barbosa, Alex de Oliveira, Eliana Garcia, Kátia Ferraz, Ligiana Damiano, Lurdes Gandra, Marcia Saad, Maria da Glória da Silva, Paulo Veríssimo Junior, Ronaldo Caprecci, Sandra dos Santos, Sílvia Maria Zinsly, Thais de Moraes, Vilma Zeferino, pela amizade, presteza e pronto atendimento nas solicitações bibliográficas;

Aos funcionários do Serviço de Pós-graduação: Celine de Sousa, Lia Moretti, Lucas Zanoni, Maria Maia, Mariana Cogo e Samuel Degaspari, pela presteza em orientar e solucionar os dissabores inerentes aos trâmites da Pós-graduação;

Aos funcionários do Rucas (Restaurante Universitário): Alessandra de Oliveira, Angelo Gabriel de Oliveira, Cleide Spessotto, Conceição Ferraz, Iria Correr, Lidionete Cruz, Madalena Müller, Maria Angelica Gallucci, Maria das Graças Abreu,

Maria Expedita Serafim, Maria José da Silva, Maria Lucia de Oliveira, Maria Neusa Pelegrino, Neide de Oliveira, Paula Poeta, Rosa Lopes, Roseli Scanavaca, Teresinha Lopes, Valquiria Procopio, que sempre fizeram com dedicação e segurança alimentar, a alimentação servida ao público universitário;

A Dona Maria Oliveira, mulher guerreira e batalhadora, que sempre fez, com garra, a limpeza dos espaços físicos do Departamento de Fitopatologia e Nematologia e da Biblioteca;

Aos meus queridos amigos, parentes e conterrâneos do Município de Primavera-PA;

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização dessa tese.

BIOGRAFIA

PAULO CÉZAR DAS MERCÊS SANTOS, terceiro filho de Edmilson Oliveira dos Santos e Maria do Socorro das Mercês Santos, nasceu em 20 de abril de 1982, na Cidade de Primavera, Pará, Brasil.

Em maio de 2004, ingressou na Universidade Federal Rural da Amazônia (Ufra) (*campus* de Belém–PA) e, em outubro de 2008, obteve o título de Engenheiro Agrônomo.

Em março de 2009, iniciou o curso de Pós-graduação *stricto sensu* (nível Mestrado) em Fitopatologia, sob a orientação do Professor Ph. D. Marcos Paz Saraiva Câmara, na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), *campus* de Dois Irmãos, Cidade do Recife, concentrando seus estudos na área de Fungos Fitopatogênicos. Em 17 de fevereiro de 2011, teve a dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora para a obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

Em março de 2011, iniciou o curso de Pós-graduação *stricto sensu* (nível Doutorado) em Fitopatologia, sob orientação do Professor Dr. Nelson Sidnei Massola Júnior, na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/Universidade de São Paulo (Esalq/USP), *campus* do Município de Piracicaba, concentrando novamente os seus estudos na área de Fungos Fitopatogênicos.

EPÍGRAFE

“É bem melhor ousar em coisas
poderosas,
ganhar gloriosos triunfos,
mesmo que se expondo ao
fracasso,
que alinhar-se com aqueles
pobres de espírito,
que nem gozam muito
nem sofrem muito,
porque vivem na penumbra
cinzenta,
onde não conhece vitória
nem derrota.”

ROOSEVELT, Theodore. **The strenuous life:** essays and addresses. New York: Charles Scribner's Sons, 1906. p. 6.

SUMÁRIO

RESUMO.....	17
ABSTRACT	19
LISTA DE FIGURAS	21
LISTA DE TABELAS	23
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	25
LISTA DE SÍMBOLOS.....	29
1 INTRODUÇÃO	33
2 DESENVOLVIMENTO	37
2.1 Revisão bibliográfica	37
2.1.1 Origem, classificação botânica da família Rutaceae, condições edafoclimáticas de cultivo e variedades utilizadas em plantios comerciais.....	37
2.1.2 Propagação de plantas cítricas e porta-enxertos	39
2.1.3 Os porta-enxertos citrumeleiro Swingle e tangerineira Sunki	41
2.1.4 Doenças incitadas por <i>Phytophthora</i> e sua interação com o hospedeiro cítrico	44
2.1.5 Considerações sobre o reconhecimento de hospedeiros por estraminipilas do gênero <i>Phytophthora</i> e vice-versa e os mecanismos de interação de ambos.....	52
2.1.6 Detecção de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência em plantas de citros inoculadas por <i>Phytophthora nicotianae</i>	65
2.1.7 Prohexadione-Calcium (Pro-Ca)	67
2.1.8 Armadilhas para atração de zoósporos de <i>Phytophthora nicotianae</i>	68
2.1.9 Elicitinas em espécies de <i>Phytophthora</i> , α -plurivorina e anticorpo.....	70
2.1.10 Atividade zoosporicida de compostos fenólicos (polimetoxiflavonas e flavonoides)	72
2.1.11 Meios de cultura e qualidade da luz no crescimento micelial e na esporulação de <i>Phytophthora nicotianae</i>	75
2.2 Objetivo geral	77
2.3 Objetivos específicos	78
2.4 Material e métodos.....	78
2.4.1 Locais de condução dos experimentos e amostragem	78

2.4.2 Cessão, cultivo, indução para a esporulação, calibração e preservação do isolado de <i>Phytophthora nicotianae</i>	79
2.4.3 Obtenção e armazenagem das sementes, autoclavagem do substrato e cultivo das plântulas dos porta-enxerto cítricos.....	81
2.4.4 Detecção de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência	82
2.4.4.1 Instalação do ensaio, coleta, criodessecação e trituração das raízes	82
2.4.4.2 Extração e detecção dos compostos fenólicos	83
2.4.4.3 Análise estatística dos dados	84
2.4.5 Inibição da síntese de compostos fenólicos através do tratamento das raízes com Prohexadione-Ca (Pro-Ca) e detectados pela técnica HPLC.....	85
2.4.5.1 Instalação e condução do ensaio.....	85
2.4.5.2 Análise estatística dos dados	86
2.4.6 Validação de um protótipo de armadilha para atração de zoósporos de <i>Phytophthora nicotianae</i> por exsudatos radiculares de porta-enxertos cítricos.....	87
2.4.6.1 Confeção das armadilhas	87
2.4.6.2 Obtenção dos exsudatos radiculares.....	89
2.4.6.3 Calibração dos exsudatos radiculares	90
2.4.6.4 Montagem e validação das armadilhas.....	90
2.4.6.5 Análise estatística dos dados	91
2.4.7 Uso do anticorpo contra a elicítina “ α -plurivorina” no estudo do consumo de água por raízes de plântulas de tangerineira Sunki e inoculadas com <i>Phytophthora nicotianae</i>	92
2.4.8 Atividade zoosporicida de compostos fenólicos (polimetoxiflavonas e flavonoides) na motilidade e germinação de zoósporos de <i>Phytophthora nicotianae</i>	94
2.4.8.1 Produção de zoósporos	94
2.4.8.2 Compostos químicos	94
2.4.8.3 Bioensaios	95
2.4.9 Avaliação de meios de cultura no crescimento micelial e na esporulação de <i>Phytophthora nicotianae</i>	96
2.4.9.1 Condução e meios de cultura	96
2.4.9.2 Avaliação do crescimento e da esporulação.....	97
2.4.9.3 Análise estatística dos dados	98

2.4.10 Avaliação da qualidade da luz no crescimento micelial e na esporulação de <i>Phytophthora nicotianae</i>	99
2.4.10.1 Condução e meios de cultura	99
2.4.10.2 Avaliação do crescimento e esporulação	100
2.4.10.3 Análise estatística dos dados	100
2.5 Resultados e discussão.....	100
2.5.1 Detecção de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência	100
2.5.2 Inibição da síntese de compostos fenólicos através do tratamento das raízes com Prohexadione-Ca e detectados pela técnica HPLC.....	103
2.5.3 Validação de um protótipo de armadilha para atração de zoósporos de <i>Phytophthora nicotianae</i> por exsudatos radiculares de porta-enxertos cítricos	104
2.5.4 Uso do anticorpo contra a elicítina “ α -plurivorina” no estudo do consumo de água por raízes de plântulas de tangerineira Sunki e inoculadas com <i>Phytophthora nicotianae</i>	106
2.5.5 Atividade zoosporicida de compostos fenólicos (polimetoxiflavonas e flavonoides) na motilidade e germinação de zoósporos de <i>Phytophthora nicotianae</i>	110
2.5.6 Avaliação de meios de cultura no crescimento micelial e na esporulação de <i>Phytophthora nicotianae</i>	112
2.5.7 Avaliação da qualidade da luz no crescimento micelial e na esporulação de <i>Phytophthora nicotianae</i>	114
3 CONCLUSÕES	117
REFERÊNCIAS.....	119
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....	165
APÊNDICES.....	167
Apêndice A.....	169

RESUMO

***Phytophthora nicotianae*: ação de meios de cultura e da qualidade da luz no crescimento e esporulação e aspectos fisiológicos e bioquímicos da interação com porta-enxertos cítricos**

A citricultura brasileira apresenta números bastante significativos e expressivos, refletindo a grande importância social e econômica que essa atividade agrícola e industrial tem para a economia do país. O Brasil se destaca como o maior produtor de laranja do mundo. As plantas cítricas podem ser produzidas e multiplicadas de várias formas e a enxertia é a forma de propagação vegetativa mais utilizada comercialmente no Brasil. Dentre os porta-enxertos mais empregados, sobressaem-se o citrumeleiro Swingle e a tangerineira Sunki. Apesar das vantagens presentes nesses dois genótipos, a produção deles está sendo limitada por doenças causadas por fungos e estraminipilas. Em citros, as diversas espécies de *Phytophthora* são responsáveis pelas doenças gomose e podridões, principalmente de radículas. *P. nicotianae* é a espécie que mais afeta as plantas cítricas no Brasil. Não obstante a grande importância de *P. nicotianae* para os porta-enxertos, alguns mecanismos de resistência ou susceptibilidade ainda requerem mais investigações científicas. O presente trabalho visa a elucidação de alguns mecanismos de resistência dos citros a *P. nicotianae*, por meio de estudos fisiológicos e bioquímicos dos porta-enxertos, além da ação de meios de cultura e da qualidade da luz no estudo da fisiologia desse estraminipila. Para isso realizou-se a detecção de alguns equivalentes de compostos fenólicos através da técnica HPLC e o comportamento do genótipo resistente frente à possível inibição da síntese de compostos fenólicos através do tratamento das raízes do porta-enxerto Swingle com Pro-Ca; avaliou-se a atração de zoósporos de *P. nicotianae* por exsudatos radiculares provenientes dos dois porta-enxertos com o uso de uma armadilha adaptada; verificou-se o comportamento do zoósporo, a motilidade e a zoosporogênese frente à ação de vários compostos fenólicos e testou-se a ação de diferentes meios de culturas e da qualidade da luz no crescimento micelial e na esporulação de *P. nicotianae*. Os resultados revelaram que a tangerineira Sunki possui maiores quantidades de equivalentes em apigenina que o citrumeleiro Swingle nos dois períodos de avaliação, para o HPLC. O porta-enxerto resistente apresentou mais equivalentes de ácido clorogênico que o genótipo susceptível. Quanto ao Pro-Ca, os equivalentes de compostos fenólicos em raízes de plântulas do citrumeleiro Swingle não diferiram daquelas plantas tratadas com água. O Pro-Ca não inibiu e não desativou a síntese de compostos fenólicos. O uso do anticorpo contra a elicítina “ α -plurivorina” teve resultados intermediários no consumo de água por plântulas de tangerineira Sunki e a atividade zoosporocida dos compostos fenólicos apresentou resultados variáveis no comportamento da motilidade de zoósporos. Os compostos fenólicos escopoletina e tricetinpentametoxi conseguiram paralisar a motilidade e proporcionaram as menores porcentagens de zoosporogênese. O meio de cultura AA permitiu a maior TCMD, seguido de CA e V8-CaCO₃-Ágar. Os maiores valores de esporulação foram encontrados nesses dois últimos meios, respectivamente. Todas as faixas de luzes (e a ausência de luz) estudadas no presente trabalho podem ser avaliadas para o crescimento micelial, porém o tratamento claro foi aquele que mais induziu a esporulação de zoósporos de *P. nicotianae*.

Palavras-chave: CLAE; Caracterização fisiológica; Qualidade da luz; TCMD; Armadilha; Exsudatos radiculares; Zoósporos; Atividade zoosporicida

ABSTRACT

***Phytophthora nicotianae*: action of culture media and light quality on growth and sporulation and physiological and biochemical aspects of the interaction with citrus rootstocks**

The Brazilian citrus industry has very significant and expressive numbers, reflecting the great social and economic importance of this industrial and agricultural activity has for the economy. Brazil stands out as the world's largest orange producer. Citrus plants can be produced and multiplied in various ways and the bud is the form of vegetative propagation more commercially used in Brazil. Among the most commonly used rootstocks, stand up the Swingle citrumelo and Sunki mandarin. Despite the advantages these two genotypes present, their production is being limited by diseases caused by fungi and estraminipilas. In citrus, all species of *Phytophthora* are responsible for diseases gummosis and fibrous root rot, especially. *P. nicotianae* is the kind that affects citrus plants in Brazil. Regardless of the great importance of *P. nicotianae* for rootstocks, some mechanisms of resistance or susceptibility still require further scientific investigation. This study aims to elucidate some mechanisms of resistance of citrus to *P. nicotianae*, through physiological and biochemical studies of rootstocks, beyond of action culture media and quality of light in the physiological study of this estraminipila. To this was carried out to detect certain equivalent of phenolic compounds by HPLC and genotype resistant behavior against the possible inhibition of the synthesis of phenolic compounds by treatment of the roots of Swingle rootstock with Pro-Ca; evaluated the zoospores attraction *P. nicotianae* by exudates from the two rootstocks using an adapted trap; it was the zoospore behavior, motility and zoosporogenesis to the action of various phenolic compounds and tested the action of different culture media and quality of light on mycelial growth and sporulation of *P. nicotianae*. The results for HPLC revealed that Sunki mandarin has larger amounts of apigenin equivalents Swingle citrumelo in that the two periods. The sturdy rootstock had more chlorogenic acid equivalents of the susceptible genotype. As for the Pro-Ca equivalent of phenolic compounds in Swingle seedling roots not differ from those plants treated with water. The Pro-Ca not inhibited and not disabled the synthesis of phenolic compounds. The use of the antibody against elicitor "α-plurivirin" had intermediate results in water consumption by Sunki mandarin seedlings and zoosporicide activity of phenolic compounds showed variable results in the behavior of zoospore motility. The scopoletin and tricetinpentametoxi phenolic compounds managed to paralyze the motility and provided the smallest percentages of zoosporogenesis. The culture medium AA allowed greater DMGR, followed by CA and V8–CaCO₃–Agar. The highest sporulation values were found in the last two media, respectively. All lights tracks (and the absence of light) studied in this work can be evaluated for mycelial growth, but the treatment light was that more induced sporulation of zoospores of *P. nicotianae*.

Keywords: HPLC; Physiological characterization; Quality of light; DMGR; Trap; Root exudates; Zoospores; Zoosporicide activity

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Disposição dos discos de CA (Cenoura–Ágar) contendo estruturas do patógeno *Phytophthora nicotianae* nas placas de Petri plásticas. A: Antes da adição do meio líquido de Cenoura diluído na proporção de 2:8 [2 mL de meio líquido de Cenoura: 8 mL de ADE (Água Destilada Esterilizada)]; e, B: Com 36 horas após a adição do meio líquido de Cenoura diluído, denominado de “meio pobre”80
- Figura 2 – Tratamentos de plântulas de citrumeleiro Swingle mantidas em água destilada esterilizada e solução de Pro-Ca (10%) a 250 ppm, respectivamente, para a inibição de compostos fenólicos86
- Figura 3 – Tratamentos de exsudatos radiculares de citrumeleiro Swingle, tangerineira Sunki e água destilada para a validação de um protótipo de armadilha em vista da atração de zoósporos de *Phytophthora nicotianae* (vista lateral).....88
- Figura 4 – Tratamentos de exsudatos radiculares de citrumeleiro Swingle, tangerineira Sunki e água destilada para a validação de um protótipo de armadilha em vista da atração de zoósporos de *Phytophthora nicotianae* (vista superior).....89
- Figura 5 – Suporte de plásticos (tipo rack) com as plântulas de tangerineira Sunki tratadas com o anticorpo primário produzido contra a elicítina “ α -plurivorina”. A: Tratamento controle; B: Plântulas inoculadas com *Phytophthora nicotianae* + anticorpo contra α -plurivorina diluído 200 vezes; C: Plântulas inoculadas com *P. nicotianae* + anticorpo contra α -plurivorina diluído 500 vezes; e, D: Plântulas inoculadas com *P. nicotianae*. Fotos tiradas no dia da instalação do experimento94

Figura 6 – Cromatogramas gerados pelo HPLC do extrato metanólico de raízes não inoculadas de plântulas de (A) citrumeleiro Swingle e de (B) tangerineira Sunki. Nos picos estão a presença de apigenina e ácido clorogênico 103

Figura 7 – Microfotografia mostrando a adesão, encistamento, germinação e tubo germinativo dos zoósporos de *Phytophthora nicotianae* em membrana de celulose (diálise). Setas indicam o zoósporo germinado. A: Água; B: Swingle; e, C: Sunki..... 105

Figura 8 – Visão geral da média do consumo de água de plântulas de tangerineira Sunki, submetidas aos diversos tratamentos com o anticorpo primário contra a elicítina “ α -plurivorina”, ao longo de 12 dias após a inoculação. As barras indicam o desvio padrão da média (n = 10)..... 108

Figura 9 – Ajuste das retas de consumo de água e coeficientes de determinação de plântulas de tangerineira Sunki, submetidas aos diversos tratamentos com o anticorpo primário contra a elicítina “ α -plurivorina” ao longo de 12 dias. A: Tratamento controle; B: Plântulas inoculadas com *Phytophthora nicotianae* + anticorpo contra α -plurivorina diluído 200 vezes; C: Plântulas inoculadas com *P. nicotianae* + anticorpo contra α -plurivorina diluído 500 vezes; e, D: Plântulas inoculadas com *P. nicotianae* 109

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Composição quantitativa de compostos fenólicos de raízes (mg/g matéria seca) calculados como equivalentes em apigenina e ácido clorogênico dos genótipos cítricos citrumeleiro Swingle e tangerineira Sunki, não inoculados (tratamento controle) e inoculados com *Phytophthora nicotianae*, aos 2 e 4 dias de coleta após a inoculação..... 101
- Tabela 2 – Composição quantitativa de compostos fenólicos de raízes (mg/g matéria seca) calculados como equivalentes em apigenina e ácido clorogênico do genótipo cítrico citrumeleiro Swingle tratado com água e Pro-Ca 104
- Tabela 3 – Zoósporos encistados de *Phytophthora nicotianae* submetidos à atração de exsudatos radiculares de genótipos cítricos por meio da técnica de diálise de membrana de celulose pelo período de 1 h 30 min..... 105
- Tabela 4 – Comportamento natatório, porcentagem da inibição da motilidade e atividade zoosporicida de compostos químicos (flavonoides/polimetoxiflavonas) contra o patógeno *Phytophthora nicotianae* 111
- Tabela 5 – Crescimento micelial e esporulação de *Phytophthora nicotianae* em meios de cultura agarizados a 25 ± 1 °C 113
- Tabela 6 – Crescimento micelial e esporulação de *Phytophthora nicotianae* sob diferentes regimes de luminosidade a 25 ± 1 °C 115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Aveia–Ágar
ADE	Água Destilada Esterilizada
Anava	Análise de variância
APTA	Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
BASF	<i>Badische Anilin und Soda-Fabrik</i>
BDA	Batata–Dextrose–Ágar
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CA	Cenoura–Ágar
Capes	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEV	<i>Citrus exocortis viroid</i>
cf.	Confronte, confira, confirme
Cinb	Código Internacional de Nomenclatura Botânica
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CRN	<i>Crinkling- (or Crinkler-) and Necrosis-inducing Proteins</i>
CTV	<i>Citrus tristeza virus</i>
cv.	Cultivar
CVd-II	<i>Citrus viroid II</i>
D.P.	Desvio padrão
DAD	<i>Diode Array Detector</i>
DAF	Detector de Arranjo de Fotodiodo
DMGR	Daily Mycelial Growth Rate
DNA	<i>DeoxyriboNucleic Acid</i>
dNTPs	<i>DeoxyNucleotide TriPhosphates</i>
Dr.	Doutor
e. g.	<i>Exempli gratia</i>
EAO's	Espécies Ativas de Oxigênio
EDTA	EthyleneDiamineTetraAcetic Acid (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético)
Esalq	Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”
FAO	Food and Agriculture Organization
FAS	Foreign Agricultural Service

Fundecitrus	Fundo de Defesa da Citricultura
GA	<i>Gibberellic Acid</i>
hPIV-3	<i>Human parainfluenza virus type 3</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
hRSV	<i>Human respiratory syncytial virus</i>
HSV-1	<i>Herpes simplex virus type 1</i>
HSVd	<i>Hop stunt viroid</i>
<i>i. e</i>	<i>Isto é</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICBN	International Code of Botanical Nomenclature
ICN	International Code of Nomenclature for Algae, Fungi, and Plants
<i>inf1</i>	<i>infestans 1</i>
LRS	Laboratório Regional de Sorocaba
M. Sc.	<i>Magister Scientiae</i> (Mestre em Ciências)
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MSC	Morte Súbita dos Citros
NLPs	<i>Nep1 (Necrosis and Ethylene-inducing Peptide 1)–like proteins</i>
NPP1	<i>Necrosis-inducing Phytophthora Protein 1</i>
PAE	Programa de Aperfeiçoamento de Ensino
pb	Pares de base
PcF	<i>Phytophthora cactorum factor</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PET	<i>PolyEthylene Terephthalate</i>
Ph. D.	<i>Philosophiae Doctor</i> (Doutor em Filosofia)
PiGPA1	<i>Phytophthora infestans G-protein α subunit</i>
PIGs	Proteínas Inibidoras da Glucanase
PMFs	PoliMetoxiFlavonas
Pro-Ca	Prohexadione-Calcium
Prof.	Professor
PR-proteínas	Proteínas Relacionas à Patogênese
PR-proteins	<i>Pathogenesis-related Proteins</i>
PsoGPA1	<i>Phytophthora sojae G-protein α subunit</i>
qPCR	<i>Real time PCR</i>
RCP	Regulador de Crescimento de Plantas

ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RSA	Resistência Sistêmica Adquirida
RT-qPCR	<i>Reverse-transcription quantitative PCR</i>
SAA	Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
SD	Statistics Division
TAE	Tris Base–Ácido Acético Glacial–Solução de EDTA dissódico
TCMD	Taxa de Crescimento Micelial Diária
Ufra	Universidade Federal Rural da Amazônia
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
UN	United Nations
UPDS	Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Sorocaba
UR	Umidade Relativa
USDA	United States Department of Agriculture
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta (radiação)
var.	Variedade

LISTA DE SÍMBOLOS

\bar{x}	média aritmética simples
–	meia-risca ou vírgula inglesa (sinal para separar intervalos numéricos)
% (v/v)	concentração em porcentagem de volume/volume ou porcentagem volumétrica
%	por cento ou porcentagem
<	menor
=	igual
±	mais ou menos
×	sinal de multiplicação (vezes), <i>versus</i>
≈	aproximadamente
≤	menor ou igual a
®	marca registrada ou marca registrada comercial
°	grau
°C	grau Celsius
μA	microampère
μg/mL	micrograma por mililitro (10^{-6} g/ 10^{-3} L) (<i>cf.</i> , ppm)
μm	micrômetro
μM	micromolar
μm/s	micrômetro por segundo
Å	ångström
A	área
<i>b</i>	coeficiente angular
cm ²	centímetro quadrado
<i>D</i>	distribuição dos dados (estatística)
<i>d</i>	teste de Durbin e Watson (estatística)
fg/μL	fentograma por microlitro (10^{-15} g/ 10^{-6} L)
g	grama
g/L	grama por litro
h	hora
ha	hectare
Hz	hertz

kDa	quilodalton
kg	quilo
kg/ha	quilo por hectare
L	litro
M	molar
mg	miligrama (10^{-3} g)
mg/g	miligrama por grama (10^{-3} g/g)
min	minuto
mL	mililitro
mL/dia	mililitro por dia
mL/min	mililitro por minuto
mm	milímetro
mM	milimolar
mm/dia	milímetro por dia
mm ²	milímetro quadrado
mmHg	milímetros de mercúrio
mV/cm	milivolts por centímetro
N	Norte
ng/ μ L	nanograma por microlitro (10^{-9} g/ 10^{-6} L)
nm	nanômetro (10^{-9} m)
nM	nanomolar
\emptyset	diâmetro
°	indicador ordinal masculino
<i>P</i>	Probabilidade
pg/ μ L	picograma por microlitro (10^{-12} g/ 10^{-6} L)
pH	potencial hidrogeniônico (ou potencial de hidrogênio)
ppm	partes por milhão (mg/kg, μ g/mL = mg/L)
Q	homoscedasticidade (estatística)
R\$	real (moeda brasileira)
R^2	coeficiente de determinação
rpm	rotações por minuto
s	segundo
S	Sul
t	tonelada

™	<i>trademark</i>
U/μL	unidades por microlitro
V/cm	Volts por centímetro
W	distribuição dos resíduos (estatística)
W	watt
α, β, ε, θ	letras gregas alfa, beta, épsilon, teta, respectivamente
ι, ν, ο	letras gregas iota, nu (ni), ômicron, respectivamente
μL	microlitro
π, ρ, τ	letras gregas pi, rô, tau, respectivamente
υ, φ, ω	letras gregas úpsilon, fi, ômega, respectivamente

1 INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira, de maneira geral, apresenta números bastante significativos e expressivos, refletindo a grande importância socioeconômica que esta atividade agrícola e industrial tem para a economia do país. Dentre todas as frutíferas de destaque para a economia do Brasil, a citricultura, como setor específico econômico, se comporta com bastante relevância, pois essa cultura é produzida em vários estados da federação e o Estado de São Paulo se sobressai como um dos grandes produtores dessa importante *commodity* agrícola de caráter internacional.

Para o ano de 2013, a Divisão de Estatística [Statistics Division (SD)] da Organização para Alimentação e Agricultura [Food and Agriculture Organization (FAO)] das Nações Unidas [United Nations (UN)] relata que a área colhida de espécies comestíveis de citros (incluindo toranjas, pomelos, limões, limas, laranjas e tangerinas) foi de 39.504.427 ha, com uma produção estimada em torno de 566.662.861 toneladas (FAO, 2015). De acordo com os dados do Foreign Agricultural Service (FAS) do United States Department of Agriculture (USDA), para o ano agrícola 2014/2015, o Brasil se destaca como o maior produtor mundial de laranja, seguido da China, Estados Unidos da América, México e Egito, respectivamente (USDA, 2015).

As safras da laranja produzidas no Estado de São Paulo são encaminhadas, em sua maior parte, para o processo de esmagamento, com a finalidade de produzir suco concentrado, que é imediatamente congelado. Um detalhe interessante é que grande parte dessa produção é destinada à exportação para importantes mercados consumidores, como os Estados Unidos da América e países da Zona do Euro (TAVARES, 2006; IBGE, 2013).

No ano agrícola de 2013, de acordo com os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o valor da produção total de laranjas (R\$4.765.624.000) correspondeu a 20,5% de participação no total do valor da produção das frutas (em reais) de todas as espécies frutíferas de interesse agrônomo plantadas no país (IBGE, 2013). A safra nacional estimada para o ano de 2015 foi de, aproximadamente, 13.809.684 toneladas (338.473 de caixas de 40,8 kg), apresentando uma variação negativa de 6,9%, em relação à safra colhida no

ano de 2014. Ainda para o ano de 2015, a área estimada foi em torno de 614.467 ha, com produtividade média de 22.474 kg/ha (IBGE, 2015).

O Estado de São Paulo, com 66,7% de participação na produção nacional, é o maior produtor do país e produzirá, em 2015, 9.208.186 toneladas (225.691 caixas). Os outros principais estados da federação produtores de laranja, em ordem decrescente serão Minas Gerais (998.422 t), Bahia (985.650 t), Paraná (980.000 t), Sergipe (590.520 t) e Rio Grande do Sul (364.234 t), respectivamente. Esses seis estados serão responsáveis por 95,0% da produção de laranja do país (IBGE, 2015).

Há outras frutas correlatas, como o limão e a tangerina, que renderam no ano de 2013, os valores de R\$686.554.000 e R\$636.089.000, respectivamente. Valores esses, muito aquém, quando comparado ao valor financeiro da produção da laranja, porém é muito significativo, quando inserido dentro desse grupo de frutas (IBGE, 2013).

De acordo com Amaro e Baptistela (2010), no ano de 2009, 61% dos porta-enxertos utilizados no Estado de São Paulo eram de limoeiro Cravo, seguido do citrumeleiro Swingle que correspondeu a 23%, enquanto que 10% dos “cavalinhos”, como também são conhecidos os porta-enxertos, eram de tangerineira Sunki, mostrando que houve aumento gradual no uso dessas duas últimas espécies de citros. Ademais, para todas as espécies cítricas adotadas como porta-enxertos no Brasil, atualmente, constata-se uma manutenção na tendência quanto à diversificação dos genótipos utilizados para tal fim (OLIVEIRA et al., 2008a).

Apesar das vantagens presentes nesses dois genótipos de citros acima citados e que servem de base para o presente estudo de doutorado (Swingle e Sunki), a produção deles como porta-enxertos para a formação final das mudas cítricas está sendo limitada principalmente pela presença problemas de ordem fitossanitária. E dentre estes, se destacam as doenças causadas por fungos e estraminipilas.

As doenças que estão atuando como fatores limitantes para alguns dos porta-enxertos utilizados na citricultura paulista, predominam aquelas causadas por diversas espécies do gênero *Phytophthora* de Bary. Apesar da grande importância do complexo de doenças que as espécies de *Phytophthora* causam aos genótipos de citros no Brasil, alguns mecanismos de resistência ou susceptibilidade dos porta-enxertos a espécies desse gênero ainda não são bem claros, são desconhecidos ou estão poucos elucidados, o que requerem mais investigações científicas (GRAHAM,

1990, 1995; WIDMER; GRAHAM; MITCHELL, 1998). A compreensão das várias características do ataque de *P. nicotianae* Breda de Haan em citros, a exemplo, das fisiológicas, pode levar ao desenvolvimento de técnicas de controle mais eficientes e também ao fornecimento de informações para esclarecer o papel do patógeno durante a interação com esses hospedeiros cítricos (ROSA et al., 2007).

Para a parte bioquímica da interação entre porta-enxertos cítricos e *Phytophthora* spp., há vários estudos, visando a interação dos compostos bioquímicos, como as fitoalexinas, atuando na linha de defesa das plantas, entretanto, ainda são pouco estudadas e conhecidas as relações dessas substâncias com genótipos específicos de citros, assim como, a ação de outros compostos produzidos e exportados durante essa interação (MEDINA FILHO et al., 2004, SIVIERO, 2001).

Em vista dos fatos relatados e da grande importância da cultura para a economia brasileira e do patógeno para a citricultura, faz-se necessário mais estudos para estudar os eventos fisiológicos e bioquímicos da interação entre os porta-enxertos cítricos resistente e susceptível a prodridão radicular, assim como, verificar com mais detalhes a fisiologia desse estraminiplia frente à ação de meios de cultura e da qualidade da luz.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 Origem, classificação botânica da família Rutaceae, condições edafoclimáticas de cultivo e variedades utilizadas em plantios comerciais

As plantas cítricas, como as do gênero *Citrus* L., os kunquats (pertencentes ao gênero *Fortunella* Swingle), o trifoliata (*Poncirus* Raf.), entre outros gêneros correlatos à subfamília Aurantioideae (= Citroideae), família Rutaceae, são originárias das regiões tropicais e subtropicais do sudeste do continente asiático, com vários ramos filogenéticos espalhados pelo mundo (em direção a outros continentes), que se estendem da região central da China ao Japão, assim como do Leste da Índia, em direção ao arquipélago malaio até Nova Guiné, passando pela Austrália e África Tropical (CHAPOT, 1975; MABBERLEY, 1997; SCORA, 1975; SOOST; CAMERON, 1975; SWINGLE; REECE, 1967; WEBBER, 1967). Outros centros de origem das espécies cítricas também são citados na literatura, como o norte e o nordeste da região Indo-Burma (Índia e Birmânia, atual Myanmar) e a região de Yunnan (sul da China), que é apontada como ponto inicial de um grande número das espécies selvagens descritas para essa subfamília botânica (GLIDDEN, 1937; GMITTER JUNIOR; HU, 1990; SPIEGEL-ROY; GOLDSCHMIDT, 1996; WEBBER, 1967).

A mais recente classificação para a família Rutaceae é a do sistema de Thorne (2000), que reconheceu três subfamílias: Rutoideae (120 gêneros), Aurantioideae (30 gêneros), e Spathelioideae (5 gêneros), com cerca de 1.650 espécies. Essa família, de maneira geral, está amplamente distribuída nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas da Terra, sendo mais abundante na América tropical, Sul da África e Austrália (PIRANI, 1982). No Brasil, Rutaceae, é representada por aproximadamente 29 gêneros botânicos, além de 182 espécies descritas, com algumas de importância medicinal, ecológica e principalmente econômica (BARROSO et al., 1984; CAMPELO et al., 2013).

A taxonomia dos citros é complicada devido à ocorrência da hibridação e apomixia das espécies dessa família, sendo que para muitos híbridos estáveis é concedido o status de espécies, de modo que o número destas espécies

comestíveis reconhecidas para o gênero *Citrus* varia de 1 a 162 (MABBERLEY, 1997). Swingle e Reece (1967) divulgaram um dos melhores trabalhos, até hoje publicado, sobre a biologia de *Citrus* e dos gêneros correlatos. Esses autores caracterizaram, pela morfologia, todos os níveis hierárquicos da subfamília Aurantioideae (tribos, subtribos, grupos, gêneros, subgêneros, seções, espécies, variedades e híbridos), reconhecendo dez espécies de *Citrus*, com frutos comestíveis e estames conatos na base (*Citrus* subgênero *Citrus*, anteriormente *Eucitrus*), a saber: *C. aurantifolia* Christm., *C. aurantium* L., *C. indica* Tanaka, *C. maxima* Merrill, anteriormente *C. grandis* Osbeck, *C. limon* (L.) Burm., *C. medica* L., *C. paradisi* Macfad., *C. reticulata* Blanco, *C. sinensis* Osbeck e *C. tachibana* (Mak.) Tanaka (MOORE, 2001) e seis espécies, com frutos acres, não comestíveis e estames livres (*Citrus* subgênero *Papeda*), que são esses: *C. ichangensis* Swingle, *C. latipes* (Swingle) Tanaka, *C. micrantha* Wester, *C. celebica* Koord., *C. macroptera* Montr. e *C. hystrix* ("*Citrus hystrix*") DC.

A citricultura, do ponto de vista convencional, é praticada em diferentes regiões do mundo e em consequência desse cultivo, a cultura passou por uma adaptação às distintas condições climáticas, desde o clima tropical, subtropical até o equatorial, com plantios localizados nas regiões úmidas e áridas (SENTELHAS, 2005).

As plantas cítricas, embora, possuam determinadas exigências edáficas, elas adaptam-se bem aos vários tipos de solos, desde que tenham boa porosidade, permeabilidade, além de não exercer limitações físicas ao desenvolvimento do sistema radicular das plantas. Citros têm bom desempenho em solos do tipo arenoargilosos, mas também são cultivados em solos muito arenosos e argilosos, porém o que ajuda bastante nessa adaptação, aos diferentes tipos de solos, é o uso de diferentes porta-enxertos (AZEVEDO, 2003; OLIVEIRA, 1991).

Na atualidade, o cultivo de citros é realizado em uma ampla faixa ao redor do mundo, compreendida entre os paralelos 40° N e 40° S (AGUSTÍ, 2003), todavia, as principais áreas produtoras de citros concentram-se nas regiões subtropicais, em latitudes que são superiores a 20° N ou 20° S (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005), sendo que nessas áreas, a temperatura de cultivo oscila entre 25 a 30 °C, consideradas ótimas para a atividade fotossintética da planta (AGUSTÍ, 2003).

Os citros mais utilizados em plantios comerciais estão distribuídos em seis grupos básicos: laranjas, tangerinas, limões, limas ácidas, pomelos e outro de menor importância, como a lima comum. O grupo das laranjas doces (*C. sinensis*) apresenta maior expressividade e predominam na maioria dos países citrícolas, com aproximadamente dois terços dos plantios, e, no Brasil, em particular, no Estado de São Paulo, esse grupo de variedade copa encontra boas condições de solo e de clima para o cultivo comercial (PIO et al., 2005).

2.1.2 Propagação de plantas cítricas e porta-enxertos

As plantas cítricas, voltadas para o interesse agrônomo e econômico, podem ser produzidas e multiplicadas de várias formas. No geral, isso se dá por semente¹, estaquia, alporquia, cultivo de tecidos e enxertia de borbulhas² em porta-enxertos produzidas por meio de sementes. Essa última forma de propagação vegetativa é a mais utilizada comercialmente no Brasil (MACHADO FILHO et al., 2003; POMPEU JÚNIOR, 2005; SOOST; CAMERON, 1975).

A enxertia, como método, consiste em unir duas ou mais partes de tecidos, mais precisamente, dois materiais vegetais geneticamente distintos, com a finalidade de que a união destas partes possa constituir uma nova planta, levando esta, a compartilhar uma série de fatores essenciais à sobrevivência de ambas as partes (SCHÄFER; BASTIANEL; DORNELLES, 2001). Uma planta enxertada compõe-se de duas partes principais: o cavaleiro ou garfo, também chamado de enxerto; e, o cavalo, “cavalinho” ou patrão, ou seja, o porta-enxerto, propriamente dito. O cavaleiro, geralmente, é um fragmento ou parte da planta que se pretende multiplicar por enxertia. Ao passo que o cavalo é representado por uma planta jovem, bastante rústica e resistente às condições adversas de fitossanidade (CÉSAR, 1996).

Essa técnica tem papel determinante no desempenho, no porte e na longevidade das plantas, pelas inúmeras vantagens que apresenta. Dentre essas

¹Existem duas formas de propagação de citros por sementes: a primeira é a via sexual, gâmica, seminípara, também conhecida pelo nome de reprodução ou propagação sexuada por autopolinização (autógama) e polinização cruzada (alógama) e a segunda forma é a via assexual ou agâmica, através da produção de sementes por agamospermia, por apomixia nucelar adventícia (quando o óvulo não é fecundado, com as sementes geneticamente iguais às da planta-mãe) (ACQUAAH, 2007).

²Esse último tipo de multiplicação de plantas, também é denominado de via assexual ou agâmica, além de ser conhecido como multiplicação ou propagação vegetativa por órgãos especializados (ACQUAAH, 2007).

vantagens agronômicas, pode-se citar a obtenção de plantas com uniformidade genética e idênticas à planta-mãe; a precocidade no início da produção e na qualidade da fruta produzida (maturação, peso dos frutos, coloração da casca e do suco, teor de açúcares, de ácidos e de outros componentes do suco). Ademais, com a seleção do porta-enxerto correto, favorece-se o aumento da produtividade e maior resistência ou tolerância a condições desfavoráveis de clima, solo, insetos-praga e doenças, entre outros fatores relevantes (POMPEU JÚNIOR, 2005; SOOST; CAMERON, 1975; STAMATO JÚNIOR, 2007).

Para Oliveira et al. (2008b), no Brasil, praticamente 100% dos porta-enxertos cítricos, de uso comercial, são obtidos a partir de sementes. A utilização das técnicas de micropropagação e da estaquia, somente ocorre em casos excepcionais, de modo mais preciso, em experimentos voltados para a pesquisa.

O uso de plantas cítricas enxertadas, nos campos de produção, deu-se no início do século XX, quando a citricultura brasileira alcançou enorme expressão de cunho comercial. Antes disso, a propagação era realizada utilizando os famosos pés-francos, que tem a desvantagem de demorar bastante tempo para entrar na fase plena de produção (OLIVEIRA et al., 2008b).

A utilização de porta-enxertos, do ponto de vista racional, foi impulsionada em decorrência de vários fatores, como os problemas fitossanitários decorrentes dos danos causados por *Phytophthora* sp., que determinaram o uso de porta-enxertos tolerantes a estes “fungos”; a juvenilidade das plantas enxertadas, definida como o período que antecede a entrada desta na fase de florescimento ao longo da vida; e, a variabilidade genética dos porta-enxertos, pelo fenômeno da poliembrião nucelar, que proporciona melhor manejo das plantas, além de um pomar mais uniforme (CARLOS; STUCHI; DONADIO, 1997a, b). Tudo isso, deu-se, também em consonância com o conhecimento acumulado, ao longo do tempo, das vantagens do processo de enxertia (POMPEU JÚNIOR, 1991). Para esse mesmo autor, a potencialidade produtiva do gênero *Citrus* é determinada principalmente pela combinação compatível entre copa e porta-enxerto.

Grande variedade de espécies dos grupos cítricos é utilizada como porta-enxerto no Estado de São Paulo, como laranjeiras doces e azedas (*C. aurantium* L.), limeira da Pérsia (*C. limettioides* Tanaka), limoeiro Cravo (*C. limonia* Osbeck), Volkameriano (*C. volkameriana* V. Ten. & Pasq.) e Rugoso (*C. jambhiri* Lush.), tangerineiras Cleópatra (*C. reshni* hort. ex Tanaka), Sunki (*C. sunki* (Hayata) hort. ex

Tanaka), Oneco (*C. reticulata* Blanco) e Sun Chu Sha (*C. reticulata* Blanco), tangeleiro Orlando (*C. tangerina* hort. ex Tanaka × *C. paradisi* Macfad.), trifoliatas [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.], citrangeiros Troyer e Carrizo [*P. trifoliata* (L.) Raf.] × [*C. xsinensis* (L.) Osbeck] cvs. Washington Navel e Kuharske, C-32 e C-35 [*P. trifoliata* (L.) Raf.] × [*C. xsinensis* (L.) Osbeck] cv. Ruby, Benton [*P. trifoliata* (L.) Raf.] × [*C. xsinensis* (L.) Osbeck] cv. Ruby Blood, citrumeleiros Swingle [*C. paradisi* Macfad. cv. Duncan × *P. trifoliata* (L.) Raf.], citrandarinzeiro X-639 [*C. reshni* hort. ex Tanaka × *P. trifoliata* (L.) Raf.], alemowzeiro (*C. macrophylla* Wester), pomeleiros (*C. xparadisi* Macfad.), toranjeiras [*Citrus xparadisi* Macfad. (*C. maxima* × *C. xsinensis*)] e assemelhados. Além desses, outros porta-enxertos são utilizados, como a tangerineira Vermelha Hongju (*C. tangerina* hort. ex Tanaka), o Yuzu (*C. junos* Siebold ex Tanaka), a Shekwasha [*C. depressa* Hayata; *C. pectinifera* (Hayata) Tanaka], a Gajanimma (*C. pennivesiculata* Lush.), os kunquats e a Calamondin (*C. madurensis* Lour.) (POMPEU JÚNIOR, 2005).

2.1.3 Os porta-enxertos citrumeleiro Swingle e tangerineira Sunki

Em decorrência das observações e pesquisas realizadas por citricultores, viveiristas e pesquisadores, respectivamente, existem, nos dias atuais, várias seleções de porta-enxertos cítricos, os quais possuem características hortícolas bem distintas e significativas, cabendo aos agricultores fazer as escolhas mais adequadas para suas condições de uso e cultivo. (OLIVEIRA et al., 2008c). Outros ensaios foram ou vêm sendo conduzidos, com o objetivo de testar as diferentes combinações de cultivares, que servem como copa e porta-enxertos às diferentes condições edafoclimáticas, fitossanitárias e de outras naturezas correlatas existentes (SCHÄFER; BASTIANEL; DORNELLES, 2001).

No ano de 2001, foi relatado pela primeira vez o surgimento de uma nova doença — a morte súbita dos citros (MSC) (CENTRO DE CITRICULTURA SYLVIO MOREIRA, 2001; FERNANDES; BASSANEZI, 2001; MÜLLER et al., 2002a, b). Em decorrência desse fato, houve a perda significativa de milhões de plantas cítricas enxertadas sobre limoeiro Cravo, até então, o porta-enxerto mais utilizado na citricultura do Estado de São Paulo (este representava aproximadamente 85% das 200 milhões de árvores existentes naquele ano) e, dessa forma, houve um novo impulso para a diversificação do uso de porta-enxertos tolerantes e resistentes para

essa doença e outras, como o declínio, a tristeza e a gomose, além do ataque de nematoides. Em vista disso, aumentou consideravelmente a utilização nos plantios cítricos, dos porta-enxertos citrumeleiro Swingle e da tangerineira Sunki (BASSANEZI; FERNANDES; YAMAMOTO, 2003a, b; YAMAMOTO; BASSANEZI, 2006,2007).

O citrumeleiro Swingle é um híbrido obtido em Eustis, Estado da Flórida (Estados Unidos da América), no ano de 1907, pelo cientista Walter Tennyson Swingle, que polinizou flores de pomeleiro “Duncan” com pólen de flores de trifoliata. O híbrido resultante foi denominado de CPB 4475. Em 1º de abril de 1974, o Agricultural Research Service (ARS) do United States Department of Agriculture, lançou para viveiristas e produtores de citros, o porta-enxerto comercial citrumeleiro Swingle, que foi descrito como um “porta-enxerto ultraresistente” (HUTCHISON, 1974; HUTCHISON; WUTSCHER; CARPENTER, 1974).

Na citricultura paulista, o citrumeleiro Swingle é o segundo porta-enxerto mais utilizado, atualmente, e tem como características marcantes sua tolerância a MSC (neste caso, ele é usado como subenxerto), resistência ao nematoide dos citros (*Tylenchulus semipenetrans* Cobb, 1913) e ao nematoide das lesões radiculares dos citros (*Pratylenchus jaehni* Inserra, Duncan, Troccoli, Dunn, dos Santos, Kaplan & Vovlas, 2001) e, principalmente aos fungos do gênero *Phytophthora*, agente causal da doença conhecida como gomose, entre outras, uma vez que a sua resistência, observada nos plantios comerciais e em condições experimentais, é igual ou superior à dos porta-enxertos cítricos que são substituídos, como os de trifoliata e os citrangeiros Troyer e Carrizo (AMARO; BAPTISTELA, 2010; CALZAVARA; SANTOS; FAVORETO, 2007; CASTLE et al., 1988; KAPLAN; O'BANNON, 1981; SALIBE; JAEHN, 1996; THOMIDIS; EXADAKTYLOU; SOTIROPOULOS, 2005; TIMMER; MENGE, 1988).

Outras características desse genótipo residem no fato de o mesmo ter de baixa a média resistência à seca e moderada resistência às geadas; boa resistência ao frio; indução de média precocidade de produção; alta qualidade e produção de fruto; alto rendimento de suco; formação de plantas de tamanho pequeno a médio, com alta longevidade; tolerância ao vírus da tristeza (*Citrus tristeza virus*, CTV) e ao viroide da xiloporose [*Citrus viroid II* (CVd-II), variante de *Hop stunt viroid* (HSVd)]; intolerância à exocorte (*Citrus exocortis viroid*, CEV) e ao declínio dos citros, além da maturação fisiológica das sementes ocorrer entre os meses de maio a julho. O

citrameleiro Swingle também é indicado para solos arenosos e argilosos (CASTLE et al., 1988; FIGUEIREDO et al., 2002; POMPEU JÚNIOR, 2005; SCHÄFER; BASTIANEL; DORNELLES, 2001; SOUZA; SCHWARZ; OLIVEIRA, 2010).

A tangerineira Sunki (sinônimos: *C. reticulata* Blanco var. *austera* Swingle, *C. nobilis* Lour. var. *sunki* Hayata, *C. aurantium* L. var. *sunki* Makino & Nemoto) (HANELT; BÜTTNER; MANSFELD, 2001), também conhecida como “Suen Kat” e “Sun Kat”, foi reclassificada, em 1927, pelo botânico e micologista japonês Chōzaburō Tanaka (latinizado para Tyōzaburō Tanaka) (TANAKA, 1927). A espécie é originária do sul da China e amplamente empregada como porta-enxerto naquele país e em Taiwan (HODGSON, 1967; TANAKA, 1954). O grande problema da utilização de Sunki, como porta-enxerto, é a sua alta susceptibilidade à gomose ou podridão das raízes e do tronco (AGUILAR-VILDOSO; POMPEU JÚNIOR, 1997; CARVALHO et al., 1997; FEICHTENBERGER, 2001). Portanto, trata-se de um porta-enxerto tão ou mais susceptível a essas doenças que as laranjeiras doces.

Outras características pertinentes à tangerineira Sunki é que este genótipo possui diversas características desejáveis, como comportamento semelhante à tangerina “Cleópatra” no tocante a formação de copa; é bastante sensível à seca; tem alta resistência ao frio; é tolerante a solos salinos; induz tardiamente a entrada em produção; apresenta média produção; tem elevado vigor, alta qualidade e boa produtividade de frutos, quando em combinações com copas de laranjeiras, mas especificamente para a variedade Pêra, para tangerineiras e pomeleiros (POMPEU JÚNIOR, 1980); forma plantas de tamanho médio, com média longevidade; possui baixa resistência ao declínio; possui tolerância à tristeza, exocorte, xiloporose, ao declínio e à morte súbita dos citros; resistente ao nematoide dos citros. As sementes da tangerineira Sunki amadurecem de abril a maio, com reduzido número de sementes viáveis por fruto, geralmente, com quatro sementes, em média, o que se torna uma restrição para o seu cultivo. Esse porta-enxerto é indicado para solos argilosos (AGUILAR-VILDOSO; POMPEU JÚNIOR, 1997; CARVALHO et al., 1997; CASTLE et al., 1993; FIGUEIREDO et al., 1997; MEDINA FILHO et al., 1992; POMPEU JÚNIOR, 1980; 1991; POMPEU JÚNIOR, 2005; SOARES FILHO et al., 2000; SOUZA; SCHWARZ; OLIVEIRA, 2010; WEILER et al., 2009).

Apesar de algumas vantagens presentes nesses dois genótipos de citros acima citados e de outros, a produção deles como porta-enxertos para a formação final de mudas cítricas, destinadas a pomares comerciais, está sendo limitada, no

Brasil e em diversos países citrícolas do mundo, principalmente pela presença de diversas doenças de origem biótica e abiótica.

Dentre as doenças de procedência biótica, onde os fitopatógenos são mais especificamente de ambiente edáfico e, que estão atuando como fatores limitantes para alguns dos porta-enxertos utilizados na citricultura, atingindo, sobremaneira, diretamente a produtividade final dos frutos, destacam-se aquelas causadas por diversas espécies do gênero *Phytophthora*.

2.1.4 Doenças incitadas por *Phytophthora* e sua interação com o hospedeiro cítrico

P. nicotianae, assim como muitas outras espécies do gênero *Phytophthora*, o qual foi descrito originalmente por de Bary (1876a, b), quando este determinou, definitivamente, o agente etiológico da requeima da batateira [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary em *Solanum tuberosum* L.], é um fitopatógeno destruidor de plantas, atuando como necrotrófico facultativo [a etimologia do nome do gênero *Phytophthora* vem do grego: φυτόν (phytón = planta) e φθείρω (phthorá = destruidor)].

Esse agente causal é polífago e cosmopolita, possui uma ampla gama de hospedeiros, causando danos em cultivos agrícolas ou em ecossistemas naturais no Brasil e no mundo, tem natureza de caráter policíclico ao ocasionar uma epidemia, sobrevive por muito tempo no solo, por meio das estruturas de resistências, como clamidósporos e oósporos (esporos sexuais), além de atuar, como um importante fitopatógeno da parte aérea das plantas (infectando caule, ramos, folhas, flores, frutos e vagens, quando o inóculo atinge esses órgãos), e, principalmente, como fitopatógeno habitante do solo, atacando as raízes e a região do coleto das plantas de inúmeras culturas, o que faz dessa espécie, uma das mais importantes nas regiões de climas tropicais, subtropicais e temperados de todo o mundo, em termo de distribuição geográfica (HALL, 1994; LUDOWICI et al., 2013; MICHEREFF; PERUCH; ANDRADE, 2005; SANTOS, 2010).

Dentre as espécies de *Phytophthora*, *P. nicotianae* é a que tem o maior círculo de hospedeiros, com o registro em mais de 255 gêneros botânicos, em 90 famílias diferentes, principalmente *Solanum lycopersicum* L., *Nicotiana tabacum* L., *Capsicum annuum* L. e *Citrus* sp. Um grande número de outras culturas agrícolas e

ornamentais também é afetado, incluindo abacateiro (*Persea americana* Mill.), abacaxizeiro [*Ananas comosus* (L.) Merr.], algodoeiro (*Gossypium* L. sp.), berinjela (*S. melongena* L.), cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), durianzeiro (*Durio zibethinus* L.), goiabeira (*Psidium guajava* L.), macieira (*Malus domestica* Borkh.), mamoeiro (*Carica papaya* L.), morangueiro (*Fragaria* L. sp.), pistacheiro (*Pistacia vera* L.), entre outras culturas (HALL, 1994; LUDOWICI et al., 2013).

Nesses diversos hospedeiros, o “fungo” causa vários sintomas, como murcha, tombamento (*damping off*), podridão do coleto, necrose das raízes e radículas, queima, mancha e podridão foliar e podridão-marrom dos frutos (CLINE; FARR; ROSSMAN, 2008; FARR; ROSSMAN, 2014; OLIVEIRA, 2008). A lista de hospedeiros dessa espécie tende a ser ampliada constantemente com novos registros de associações entre plantas e o fitopatógeno, em todo o mundo.

As espécies do gênero *Phytophthora* deixaram de ser consideradas fungos verdadeiros há um certo tempo, depois passaram a fazer parte do reino Chromista e atualmente estão classificadas no reino Straminipila, subreino Chromophyta, filo Heterokonta, subfilo Peronosporomycotina, classe Peronosporomycetes, subclasse Peronosporomycetidae, ordem Pythiales, família Pythiaceae, de acordo com a classificação proposta por Dick (2001). Por outro lado, a classificação proposta pelo site *Index Fungorum* (acesso em: 06 nov. 2014) é diferente. As espécies, do gênero em questão, fazem parte do reino Chromista, filo Oomycota, subfilo *Incertae sedis*, classe Peronosporae, subclasse Peronosporidae, ordem Peronosporales, família Peronosporaceae.

Em citros, as diversas espécies de *Phytophthora* são responsáveis pelo tombamento, mela ou “*damping off*”, de ocorrência, nas sementeiras dos porta-enxertos; por lesões em folhas, brotações e hastes em plantas presentes nos viveiros; pela podridão-parda das frutas e por outros danos que podem ocorrer na planta cítrica. As mais sérias manifestações fitopatológicas causadas pelo “fungo” nos pomares, genericamente são denominadas de gomose e, são conhecidas como podridões do colo, do tronco, das raízes e radículas (FEICHTENBERGER, 2001; FEICHTENBERGER et al., 2005; NAQVI, 2004; POMPEU JÚNIOR, 2005; SAVITA; NAGPAL, 2012).

Essa doença afeta todas as variedades cítricas e está presente em todas as regiões citrícolas do mundo. Os primeiros sintomas da doença se manifestam com o escurecimento e a morte de pequenas regiões da casca do caule com exsudação de

goma no colo, principalmente em porta-enxertos susceptíveis (MEDINA FILHO et al., 2003). As lesões (rachaduras e fendilamentos longitudinais) causadas por *Phytophthora* em plantas de citros podem causar o anelamento das raízes, pois o “fungo” invade os tecidos mais tenros das pontas das raízes (na região lisa ou de crescimento, onde ocorre o alongamento celular das células multiplicadas na ponta protegida pela coifa) (ESCANFERLA, 2011), com a infecção avançando até os tecidos externos do córtex, sem que haja o comprometimento da parte central lenhosa das raízes, indo em direção ao tronco, circundando-os, nas infecções severas. Isso faz com que a planta fique incapaz de se desenvolver normalmente, uma vez que ocorre a deterioração do sistema radicular fibroso. Dessa forma, há impedimento do fluxo da seiva elaborada das folhas para as raízes, assim como ocorre a insuficiência na substituição de raízes pela planta, levando esta, ao rápido declínio. Todo esse ciclo pode se repetir, desde que as condições sejam favoráveis, com tecido vegetal susceptível e disponível para novas colonizações, fazendo com que a planta inicie, até então, um processo de crescimento atrofiado. Em consequência desse impedimento e dessa falta de substituição radicular, as raízes morrem e na parte aérea ocorrem os sintomas foliares típicos da doença, com os sintomas reflexos de deficiências nutricionais, como a descoloração das nervuras e o amarelecimento das folhas, que murcham e secam, provocando, definitivamente, a morte da planta. Em outras situações ocorre a desfolha e a seca dos ramos (ALENCAR, 1941; FEICHTENBERGER, 2001; FEICHTENBERGER et al., 2005; NAQVI, 2004; POMPEU JÚNIOR, 2005; ROSSETTI, 1947–1948; SAVITA; NAGPAL, 2012; TIMMER; GARNSEY; BROADBENT, 2003; TIMMER; MENGE, 1988).

O “fungo” causa na planta, florescimentos e frutificações frequentes, além de extemporâneos; também ocasiona a produção de frutos pequenos, de casca fina e de maturação precoce. Em frutas, as podridões são secas, de coloração marrom-parda e com cheiro típico de ranço (acre). Em condições de alta umidade, micélio de coloração branca se forma sobre a casca do fruto infectado (FEICHTENBERGER et al., 2005; POMPEU JÚNIOR, 2005).

As frutas localizadas nas partes inferiores da copa da planta (conhecida como baixeiro) podem ser infectadas por estruturas do patógeno produzidos na superfície do solo e que são envolvidas por partículas deste. Com a ação dos respingos de água, provenientes da irrigação ou das chuvas, os propágulos são carregados até a superfície dos frutos, iniciando o processo infectivo e causando as chamadas

podridões secas. As frutas infectadas geralmente caem, embora algumas permanecem mumificadas na planta por longos períodos. A podridão parda pode ocorrer em frutas de todas as cultivares cítricas; contudo, os limões verdadeiros sejam os mais afetados por esta doença (FEICHTENBERGER et al., 1992, 2005; POMPEU JÚNIOR, 2005).

A podridão de raízes e de radículas pode ocorrer tanto em viveiros quanto em pomares, em plantas de todas as idades, todavia, as plantas mais jovens são as mais sensíveis, devido à tenacidade dos tecidos (FEICHTENBERGER et al., 2005; LARANJEIRA et al., 2005; POMPEU JÚNIOR, 2005). A utilização de mudas produzidas em viveiros que estão contaminados é um dos principais fatores responsáveis pela elevada incidência das doenças incitadas por *Phytophthora* spp. em cultivos comerciais, pois nos viveiros, onde a irrigação é intensa, aliada a altas densidades de plantio, são condições favoráveis e ideais para a proliferação do patógeno e incidência da doença. As espécies desse gênero são encontradas com bastante frequência nas inspeções realizadas nos viveiros de mudas cítricas do Estado de São Paulo (FEICHTENBERGER, 2001; FEICHTENBERGER et al., 2005; TIMMER et al., 1991; TIMMER; GARNSEY; BROADBENT, 2003).

A gomose de *Phytophthora* se constitui em uma das mais antigas doenças dos citros já registradas no mundo, pois os primeiros relatos de doenças em plantas de citros com os sintomas semelhantes aos causados por *Phytophthora* datam do ano de 1646 (FAWCETT, 1923) e, no Brasil, o primeiro relato de gomose causando doença em citros foi realizado por Avena-Saccá (1912; 1917), cujo agente causal foi descrito como sendo a bactéria *Bacterium gummi* Comes 1884 (ALENCAR, 1941; FAWCETT, 1923; SIVIERO; FURTADO; MACHADO, 2002).

Em conformidade com o que foi relatado anteriormente, entre as espécies de *Phytophthora* que mais afetam as plantas cítricas no Brasil, causando as podridões de raízes e radículas em diversos genótipos de citros, são *P. citrophthora* (R.E. Sm. & E.H. Sm.) Leonian e *P. nicotianae* (epíteto mais antigo)³, que, por sua vez, tem

³Jacob van Breda de Haan, um renomado cientista holandês, descreveu essa espécie pela primeira vez, no ano de 1896, causando doença em folhas de tabaqueira na Indonésia. Ao agente causal, ele chamou de *P. nicotianae* (van BREDA DE HAAN, 1896).

O cientista de origem indiana, Jehangir Fardunji Dastur, em 1913, descreveu um micro-organismo fitopatogênico bem similar a *P. nicotianae*, causando doenças em plantas de mamoneira (*Ricinus communis* L.) na Índia, o qual nomeou como *P. parasitica* (DASTUR, 1913). Esse autor designou o agente causal, como uma nova espécie, porque observou o anterídio em uma posição diferente da qual foi descrita e observada por van Breda de Haan. A principal característica distintiva entre essas duas “espécies”, quando foram descritas pela primeira vez, é que em *P. parasitica*, o

vários sinônimos, como *Blepharospora terrestris* (Sherb.) Peyronel, *P. allii* Sawada, *P. formosana* Sawada, *P. imperfecta* Sarej. var. *nicotianae* Breda de Haan, *P. jatrophae* Rosenbaum, *P. lycopersici* Sawada, *P. manoana* Sideris, *P. melongenae* Sawada, *P. melongenae* Sawada var. *melongenae* Sawada, *P. nicotianae* × *P. cactorum* Man in 't Veld, Veenb.-Rijks, Ilieva, De Cock, Bonants & R. Pieters, *P. nicotianae* Breda de Haan var. *nicotianae* Breda de Haan, *P. nicotianae* Breda de Haan var. *parasitica* (Dastur) G.M. Waterhouse, *P. parasitica* Dastur, *P. parasitica* Dastur var. *capsici* (Leonian) Sarej., *P. parasitica* Dastur var. *colocasiae* (Racib.) Sarej., *P. parasitica* Dastur var. *nicotianae* (Breda de Haan) Tucker, *P. parasitica* Dastur var. *parasitica* Dastur, *P. parasitica* Dastur var. *piperina* Dastur, *P. parasitica* Dastur var. *rhei* G.H. Godfrey, *P. parasitica* Dastur var. *sesami* Prasad, *P. ricini* Sawada, *P. tabaci* Sawada, *P. terrestris* Sherb. (publicada como *terrestria*) e *Phloeophthora nicotianae* (Breda de Haan) G.W. Wilson (ERWIN; RIBEIRO, 1996; HALL, 1993; INDEX FUNGORUM, 2014; PHYTOPHTHORA DATABASE, 2014; SPECIES FUNGORUM, 2014).

Essas duas espécies são os principais agentes causais desse complexo de doença (AMORIM, 1997; BASSAN et al., 2010; FEICHTENBERGER, 2001; FEICHTENBERGER et al., 2005; POMPEU JÚNIOR, 2005). De acordo com Erwin e Ribeiro (1996), *P. nicotianae* ataca mais de 400 hospedeiros e *P. citrophthora*, mais

anterídio é anfígeno, enquanto que na descrição de *P. nicotianae*, em 1896, o anterídio é parágino (provavelmente, no momento de fazer a ilustração, o espécime descrito para esse tipo de anterídio era de alguma espécie de *Pythium* Nees). Um erro na ilustração de van Breda de Haan (HOLDCROFT, 2013; SULLIVAN, 2004).

Waterhouse (1963) substituiu o nome *P. parasitica* para *P. nicotianae* porque esse último tinha prioridade, não obstante, os erros encontrados na descrição original. Essa mesma autora ainda classificou a espécie *P. nicotianae* em duas variedades: *P. nicotianae* var. *nicotianae* e *P. nicotianae* var. *parasitica* comb. nov., com base nas diferenças morfológicas.

É geralmente aceito que *P. parasitica* seja o nome mais apropriado (esse é o sinônimo mais usado pela comunidade científica) (ERWIN; RIBEIRO, 1996; GALLUP; SULLIVAN; SHEW, 2006), porém o International Code of Nomenclature for Algae, Fungi, and Plants (ICN) [antigo International Code of Botanical Nomenclature (ICBN), em português: Código Internacional de Nomenclatura Botânica (Cinb)] restringe seu uso, pelo princípio de prioridade (artigo 11.4) e da data de publicação efetiva (artigo 31.1) (vide regras em: <<http://www.iapt-taxon.org/nomen/main.php>>).

Dessa forma, o nome definido na descrição original tem prioridade e validade, apesar de pequenos erros encontrados no trabalho de van Breda de Haan, como a falta de conservação do holótipo (espécime-tipo), a omissão de fazer a diagnose latina da doença e da espécie (como era vigente na época) e da contaminação da cultura original, pois van Breda de Haan ilustrou o trabalho com oósporos (e anterídios) pertencentes a outro organismo (possivelmente de uma espécie do gênero *Pythium*, porém com os desenhos de esporângios, pertencentes a *P. nicotianae*) (ASHBY, 1928; HALL, 1993; 1994; HO; JONG, 1989; HOLDCROFT, 2013). Hall (1993) neotipificou *P. nicotianae* e fez a redescrição para distingui-lo de outras espécies semelhantes e relacionadas morfológicamente.

Em consonância com as regras vigentes do ICN, o nome *P. nicotianae* será utilizado nesta tese.

de 80. No Estado de São Paulo, a espécie *P. nicotianae* é a que mais predomina nas principais áreas citrícolas do estado (AMORIM, 1997; FEICHTENBERGER, 2001). Além disso, essa espécie está associada às perdas mais significativas provocadas por esse patógeno, tanto nas mudas que estão, em formação, nos viveiros, assim como, nos pomares comercialmente estabelecidos, ocorrendo em mais de 90% dos casos, nos dois ambientes, onde o porta-enxerto é cultivado (AMORIM, 1997; SIVIERO; FURTADO; MACHADO, 2002).

Chiacchio e Galli (1978) relatam que os danos causados por *P. nicotianae* são mais prejudiciais às plantas que as de *P. citrophthora* por causarem lesões mais extensas e atingirem maior número de elementos dos vasos, ocasionando o anelamento do tronco e, posterior, morte da planta.

Para Blumer e Pompeu Júnior (2005), o uso de porta-enxertos resistentes, como o citrumeleiro Swingle e os híbridos de trifoliatas para o controle da doença em questão, é o método mais adequado de convivência com a doença, tanto em campo, como nos viveiros. A utilização desse material resistente é o motivo pelo qual a determinação do grau de resistência de novos porta-enxertos em estudo seja um dos constituintes como critério de seleção em um programa de melhoramento de citros.

P. palmivora (E.J. Butler) E.J. Butler também já foi assinalada atacando citros, no Brasil, infectando plantas tanto em viveiros, como em cultivos comerciais (FEICHTENBERGER et al., 2005; POMPEU JÚNIOR, 2005). Outras espécies de *Phytophthora* causando problemas fitossanitários, em termos mundiais, também já foram relatadas como capazes de induzir doenças em plantas cítricas, a saber: *P. syringae* (Kleb.) Kleb., *P. hibernalis* Carne, *P. cactorum* (Lebert & Cohn) J. Schröt., *P. cinnamomi* Rands, *P. citricola* Sawada, *P. drechsleri* Tucker, *P. megasperma* Drechsler e *P. boehmeriae* Sawada (FEICHTENBERGER et al., 2005).

As espécies *P. citrophthora* e, principalmente *P. nicotianae* produzem esporângios com a presença de uma papila proeminente, dentro dos quais forma-se um número representativo (de 10 a 30) de zoósporos unicelulares biflagelados [um anterior, denominado de tinsel, que é táctil e sensitivo, pois possui em cada lado, uma fileira de pelos rígidos (mastigonemas) e outro posterior, chamado de chicote, que tem a função de motilidade]. Os esporângios podem germinar diretamente (germinação direta), formando um tubo germinativo (pró-micélio), em temperaturas próximas de 22 °C ou indiretamente (germinação indireta), pela extrusão de

zoósporos, com a temperatura ideal em torno de 12 °C. Os zoósporos quando estão “maduros”, depois do processo da zoosporogênese (diferenciação da hifa até a liberação dos zoósporos por clivagem citoplasmática), estes são em formato de rim, com o corpo afinando-se para frente. O tamanho do zoósporo varia de 7 a 11 µm de comprimento (CARLILE, 1983; 1986; HOLDCROFT, 2013; LUCAS, 1958; TYLER, 2002, 2007; WANG et al., 2010).

Os zoósporos, dentre todos os propágulos de disseminação do fitopatógeno, são a via mais importante de infecção das raízes (os chamados propágulos infecciosos), principalmente quando o solo se encontra sob o efeito de alta umidade (por exemplo, nas condições de irrigação) e são liberados através de uma abertura da papila, chamada de opérculo. Isso ocorre quando o esporângio encontra-se em estágio de maturação fisiológica e com as condições ambientais propícias (TYLER, 2002). A alta umidade presente no solo faz com que o hospedeiro libere exsudatos radiculares que são carregados pela lâmina d'água até o local onde se encontram os propágulos infecciosos (zoósporos, esporângios, talo micelial, clamidósporos, etc.).

Dentre estes, os zoósporos são os primeiros a reconhecer os exsudatos, direcionando-se, em seguida, até a rizosfera e depois para o rizoplano, principalmente para uma área da raiz conhecida como região de alongamento, que fica um pouco acima da extremidade da raiz (acima do meristema apical e da coifa), onde a exsudação está mais ativa. Essa região específica da raiz está em constante crescimento e, em atrito com o solo, acarretam microferimentos, fazendo com que esse local se torne um ambiente favorável para o início das infecções. Em condições experimentais, os zoósporos também são atraídos para esse local (ZENTMYER, 1961b).

Em outras regiões das raízes, mas com ferimentos, provocados por larvas de insetos e nematoides, os propágulos infecciosos de *P. nicotianae* são também atraídos, uma vez que nesses locais, também há a maior concentração de exsudatos (BEDENDO; AMORIM, 2011), ficando as mudas dos porta-enxertos cítricos mais predispostas a uma maior infecção por *P. nicotianae*, em consequência do aumento da população do patógeno naquele local (EL-BORAI-KORA, 2001; GALLUP, 2009; GALLUP; SULLIVAN; SHEW, 2006; GRAHAM; McCOY; ROGERS, 1997; ROGERS; GRAHAM; McCOY, 1996).

Os zoósporos são essencialmente aquáticos, exibindo padrão α -helicoidal de natação e necessitam de um filme de água livre para efetuar o deslocamento na

superfície do solo ou dentro deste. A velocidade média atingida por um zoósporo varia de 100 a 200 $\mu\text{m/s}$ (DONALDSON; DEACON, 1993; van WEST, 2002). Ao atingir a superfície das raízes, acabam por encistar-se e, a partir, dos cistos aderidos às raízes, são formadas hifas, que começam a penetrar diretamente nestas por meio da emissão do tubo germinativo. Esses cistos também podem gerar novos zoósporos, denominados de secundários (TYLER, 2002, 2007; WANG et al., 2010). Zoósporos de *P. nicotianae* são muito sensíveis às condições ambientais; no entanto, sob condições favoráveis, alguns permanecem móveis por sete horas ou mais (GOODING; LUCAS, 1959).

Os esporângios de *P. nicotianae* são piriformes, com espessamento apical hemisférico. Os mesmos são geralmente esféricos a ovoide, com bases redondas, medindo de (14–) $43 \pm 8,8$ (–74) \times (12–) $36 \pm 7,0$ (–60) μm (largura e comprimento, respectivamente) [$\bar{x} = 47 \pm 5 \times 35 \pm 4$ μm , relação comprimento/largura (1,12:1–) $1,20:1 \pm 0,050$ (–1,33:1), $\bar{x} = 1,4 \pm 0,1$] (ERWIN; RIBEIRO, 1996; HALL, 1994; HO; JONG, 1989; LARANJEIRA et al., 2005).

P. nicotianae produz bastantes clamidósporos (estrutura arredondada de resistência), com o diâmetro médio de (22–) $33 \pm 5,5$ (–52) μm . Estes são ovais a esféricos, terminais ou intercalares, com a presença de paredes grossas, que tem de 3–4 μm , com inclusões subcelulares irregular, delimitado a partir de micélio somático por um septo. (ERWIN; RIBEIRO, 1996; HALL, 1994; HO; JONG, 1989). Essa espécie apresenta oogônias esféricas, de (16–) $26 \pm 3,2$ (–36) μm de diâmetro, com paredes grossas de 1–2 μm , de conteúdos homogêneos, delimitadas a partir de hifas somáticas por um septo. Os anterídios são sempre anfígenos, cilíndricos e unicelulares, de 10–12 \times 9–10 μm (HALL, 1994).

Além dessas estruturas, a espécie produz oósporos abundantemente, enquanto que os isolados de *P. citrophthora*, na sua maioria, não o fazem (LARANJEIRA et al., 2005). Os oósporos de *P. nicotianae* são de formato esférico, de coloração amarelo pálido, quando maduro, com (12–) $24 \pm 3,2$ (–34) μm de diâmetro. A parede dos oósporos tem 2 μm de espessura, contendo, de forma irregular, inclusões subcelulares (ERWIN; RIBEIRO, 1996; HALL, 1994). O fitopatógeno sobrevive no solo, durante muito tempo, por meio de duas estruturas de resistência: clamidósporos e oósporos (NAQVI, 2004).

2.1.5 Considerações sobre o reconhecimento de hospedeiros por estraminipilas do gênero *Phytophthora* e vice-versa e os mecanismos de interação de ambos

O reconhecimento, de maneira geral, entre planta e micro-organismo é o primeiro passo em qualquer interação direta em si e, que de maneira mais simples, pode ser explicada pela resposta de um organismo a uma substância molecular produzida por outro organismo (TYLER, 2002). A essa substância molecular, dá-se o nome de sinal, também chamada de elicitor (AGRIOS, 2005a; BELL, 1981; CAMPOS, 2009; TYLER, 2002).

Esse reconhecimento ocorre devido à influência mútua de uma molécula elicitora, que pode ser lançada pelo patógeno ou emitida pela própria planta (liberada mediante a ação do patógeno) e de um receptor proteico, que está presente na membrana plasmática da parede celular da célula da planta (BELL, 1981; CERVONE et al., 1989; HAHN, 1996; MÉTRAUX, 2001; SILVA et al., 2008a; TYLER, 2002; UMEMOTO et al., 1997). Posteriormente ao reconhecimento, no âmbito molecular, incide a transdução do sinal gerado pelo receptor de dentro e de fora da célula receptora, ocorre também à ativação de mensageiros secundários e a expressão de genes mais específicos (LEITE et al., 1997; TYLER, 2002).

Hahn (1996) relata que o termo “elicitor” foi originalmente usado para se referir a moléculas e outros estímulos que induzem, nas células vegetais, a síntese e o acúmulo de compostos antimicrobianos nos sítios de infecção (fitoalexinas) (KEEN, 1975; KNOGGE, 1997), porém, atualmente, é usado para as todas as moléculas sinalizadoras que estimulam uma ampla variedade de reações e mecanismos de defesa da planta (DIXON, 1986; DIXON; LAMB, 1990; EBEL, 1986; ELAD, 2000; GRANT; YUN; LOAKE, 2000; HAHLBROCK; SCHEEL, 1987).

De acordo com Tyler (2002), as investigações atuais sobre o reconhecimento entre as espécies de *Phytophthora* e seus hospedeiros são separadas em: reconhecimento do hospedeiro pelo patógeno e reconhecimento do patógeno pelos mecanismos de defesa do hospedeiro.

Esse mesmo autor enfatiza que o reconhecimento do hospedeiro pelo patógeno inclui a detecção pelo micro-organismo das diversas propriedades inerentes ao hospedeiro, tais como as propriedades químicas, elétricas e físicas dos tecidos vegetais, incluindo, neste caso, principalmente, as substâncias químicas, que

se difundem a partir da superfície dos tecidos da planta. Para exemplificar essa situação, pode-se citar que a atração dos zoósporos das espécies de *Phytophthora*, o acúmulo nas raízes, o “aprisionamento”, o rápido encistamento, a germinação do cisto, a origem morfogênica de zoósporos e, por fim, o tropismo da hifa (crescimento direcionado dos tubos germinativos) em direção ao tecido do hospedeiro são comportamentos, na maioria das vezes, desencadeados por sinais provenientes da planta hospedeira, como a exsudação de compostos químicos provenientes das raízes (HICKMAN; HO, 1966). Em suma, isso faz com que as pesquisas, dos padrões de reconhecimento do hospedeiro pelo patógeno, *i. e.*, as comunicações de sinalização entre zoósporos fitopatogênicos e a planta hospedeira, se dediquem, fundamentalmente, nas respostas de motilidade, taxia e tropia dos zoósporos essencialmente móveis (CARLILE, 1983; GOW et al., 1999; TYLER, 2002).

Como foi mencionada anteriormente, a infecção primária nos hospedeiros ocorre por meio de zoósporos de *Phytophthora* spp. O reconhecimento de uma planta hospedeira por espécies de *Phytophthora*, habitantes do solo, é essencial para que dê início e ocorra, com sucesso, a infecção de raiz (TYLER, 2002).

Badri e Vivanco (2009) relatam que uma gama de compostos químicos é secretada e liberada pelas raízes das plantas em forma de exsudatos e estes são conhecidos por fazer a mediação de muitas interações na rizosfera. Islam e Tahara (2001a) relatam que os compostos químicos exsudados pelas raízes podem responder das seguintes maneiras aos zoósporos: atividade de atração; atividade repelente; atividade estimulante; atividade de inibição da motilidade e natação ao acaso; e, atividade zoosporicida.

Zoósporos da maioria das espécies de *Phytophthora* são atraídos (quimiotaxia positiva) por ácidos orgânicos, por uma variedade de açúcares (sacarose, dextrose, frutose, ramnose e maltose) (DUKES; APPLE, 1961) e aminoácidos, particularmente, aspartato, glutamato, arginina, metionina, asparagina e glutamina (CAHILL; HARDHAM 1994; CARLILE, 1983; DEACON; DONALDSON, 1993). Os zoósporos também são atraídos por etanol, que por sua vez, é produzido e liberado, principalmente, por raízes de plantas de ambientes encharcados, podendo promover a infecção radicular dessas plantas, em destaque, para *P. cinnamomi*. Essas plantas liberam o etanol, nas concentrações que variam de 0,2 a

20 mM (ALLEN; NEWHOOK, 1973; CAMERON; CARLILE, 1978; CARLILE, 1983; MORRIS; WARD, 1992).

Ao contrário dessas substâncias e elementos químicos atrativos, os zoósporos não são atraídos por cátions monovalentes de baixa massa molecular, como Mg^+ , Li^+ , Na^+ , K^+ , Cs^+ , entre outros, como H^+ , que é o cátion monovalente mais eficiente, repelindo os zoósporos a 150 μM (pH 3,8). Concentrações elevadas de Mg^{2+} , Ca^{2+} , La^{3+} , também são repelentes, apesar do Ca^{+2} regular o comportamento natatório e, subseqüentemente, a adesão, o encistamento e a germinação dos zoósporos das espécies de estraminipilas (DONALDSON; DEACON, 1992, 1993).

Outras substâncias que causam quimiotaxia negativa aos zoósporos são galactose, lactose, ácido clorídrico, cloreto de potássio, cloreto de amônio, cloreto de sódio e água de torneira (ALLEN; HARVEY, 1974; CAMERON; CARLILE, 1980; DUKES; APPLE, 1961). Em raras exceções, zoósporos de *P. palmivora* foram repelidos por soluções de pH elevado e atraídos por soluções de pH baixo (MORRIS; REID; GOW, 1995).

A redução da disponibilidade de Ca^{2+} e Mg^{2+} por meio da adição de agentes quelantes de cálcio e de magnésio podem eliminar o comportamento de natação helicoidal dos zoósporos, já que esses dois elementos químicos são necessários para a motilidade. A adição de Ca^{2+} e de outros cátions bivalentes, ou bloqueadores dos canais de cálcio também altera o comportamento de natação, como é o caso de La^{3+} , que é conhecido por bloquear o transporte de Ca^{2+} em diversos sistemas (DONALDSON; DEACON, 1993; YOUNG; NELSON, 1974).

Os zoósporos de *P. sojae* Kaufm. & Gerd. são atraídos por nutrientes liberados pelo sistema radicular da soja [*Glycine max* (L.) Merr.] e essa atração, se dá, especialmente, em relação às concentrações nanomolares de isoflavonas (principalmente de daidzeína e genisteína a 10 nM) (MORRIS; WARD, 1992; TYLER et al., 1996). Essas duas isoflavonas são as mais investigadas para a especificidade na atração de zoósporos e são encontradas em concentrações elevadas nas sementes. Quando do processo de germinação do hospedeiro, a liberação dessas duas isoflavonas ocorre pelas raízes, na região da rizosfera (OßWALD et al., 2014; ZHU et al., 2005). Para Oßwald et al. (2014), as vias de transdução do sinal envolvidas nas respostas de *P. sojae* para daidzeína e genisteína ainda são desconhecidas.

Chang-Ho e Hichman (1970), Cameron e Carlile (1978) e Oswald et al. (2014) enfatizam que as combinações de vários aminoácidos para a atratividade de zoósporos por exsudatos radiculares são muitas vezes mais atraentes do que os compostos químicos individuais, mostrando, dessa forma, que vários aminoácidos em conjunto, tem efeito sinérgico.

Tyler (2002) ressalta que a atração para estes compostos lançados no meio ambiente por exsudatos radiculares de várias espécies de plantas pode ser responsável por uma atração inespecífica de zoósporos de diversas espécies de *Phytophthora* e *Pythium*. No entanto, algumas espécies desses dois gêneros, especialmente aqueles com intervalo de hospedeiros mais restritos, exibem muito mais especificidade a respeito de sua atração para os exsudatos radiculares, como é o caso de *Py. graminicola* Subram. e *Py. arrhenomanes* Drechsler, que se caracterizam por infectar espécies de gramíneas. Os zoósporos dessas duas espécies de *Pythium* se acumulam preferencialmente na parte mais abaixo da região das pontas de raízes das gramíneas, quando comparado com as raízes de plantas dicotiledôneas. Por sua vez, os zoósporos de *Py. aphanidermatum* (Edson) Fitzp. e *Py. ultimum* Trow, que possuem uma ampla gama de hospedeiros, não mostraram preferência específica para as raízes das gramíneas (MITCHELL; DEACON, 1986).

A mesma situação foi observada para os zoósporos de *Py. dissotocum* Drechsler que responderam positivamente à quimiotaxia específica para as células da coifa de duas espécies de algodoeiro (*G. barbadense* L. e *G. hirsutum* L.). Quando as raízes de plântulas de algodoeiro foram colocadas numa suspensão de zoósporos de *Py. dissotocum*, houve atração e acumulação imediata e o encistamento se deu exclusivamente na região da coifa. Em contraste, zoósporos de *Py. catenulatum* V.D. Matthews que exibiram uma resposta quimiotática para *Agrostis palustris* Huds. (uma espécie de gramínea), não foram atraídos e nem infectaram mudas de algodão ou células isoladas da coifa dessa planta dicotiledônea (GOLDBERG; HAWES; STANGHELLINI, 1989).

Morris e Ward (1992) observaram que os zoósporos de outras espécies de *Phytophthora* não são atraídos pelas isoflavonas liberadas pelas plântulas da cultura da soja, sugerindo que a quimiotaxia seletiva pode desempenhar um papel importante na determinação da gama de hospedeiros.

Tyler et al. (1996) identificaram diferenças na capacidade de atração de zoósporos de *P. sojae* em detectar os vários compostos com semelhança estrutural

das isoflavonas. Os autores fizeram uma comparação da resposta quimiotáctica, indicando que os vários compostos portadores dos grupos fenólicos 4'- e 7-hidroxila das moléculas de isoflavonas foram os mais ativos na atração de zoósporos. Por outro lado, as flavonas metiladas mostraram-se como bons repelentes. Hua et al. (2008) relataram que um gene presente em *P. sojae* (PsGPA1 — *Phytophthora sojae* G-protein α subunit), codificador da proteína G subunidade α estava envolvido na quimiotaxia de isoflavonas de soja. Os mutantes PsGPA1 silenciados de *P. sojae* foram afetadas, na quimiotaxia, para as isoflavonas e não foram capazes de sentirem atraídos por elas.

A ação da corrente elétrica na motilidade de zoósporos também é outro tipo de taxia estudado, pois muitos zoósporos são atraídos eletrostaticamente para as diversas superfícies de potenciais plantas hospedeiras (TYLER, 2002). Os gradientes elétricos gerados pelas raízes das plantas na rizosfera são condições que influenciam na direção dos zoósporos, ora levando-os para perto ou para longe da superfície das raízes (MORRIS; REID; GOW, 1992).

Troutman e Wills (1964) foram os primeiros a relatar o fenômeno da eletrotaxia em *P. parasitica* var. *nicotianae*. A atração de zoósporos foi direcionada para o polo negativo, com a passagem de uma corrente elétrica fraca. Outros relatos também indicam a diferença significativa entre essas respostas eletrotáticas na reação dos zoósporos para a raiz (ZENTMYER, 1970). Em intensidades de baixas correntes elétricas, geralmente as que estão abaixo de 0,5 μ A, os zoósporos nadam em direção ao ânodo e, finalmente, encistam em torno do eletrodo. Nas intensidades mais elevadas (acima de 0,5 μ A), os zoósporos nadam em direção ao ânodo, mas quando chegam próximo, são repelidos pelo polo negativo (CARLILE, 1983). Quanto à tensão da corrente elétrica, a faixa para algumas culturas (de saída) é de 7 a 13 mV/cm, para azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) e trigo (*Triticum aestivum* L), respectivamente, e, na região de entrada, como a zona pilosa e as feridas (catódicas), o valor pode chegar a 24 mV/cm, como foi o caso para azevém (van WEST et al., 2002).

Em água deionizada, os zoósporos exibem três tipos básicos de resposta eletrostática às correntes de 0–5 μ A. O tipo A (atração) foi observada no ânodo em correntes geralmente menores que 0,5 μ A (<1,2 V/cm). Nesse caso, os zoósporos exibem uma atração ativa, com orientação voltada para o ânodo, seguido, de encistamento e germinação. A resposta do tipo B (repulsão) foi observada em

direção ao ânodo, em correntes maiores que 0,5 μ A. A atração dos zoósporos foi no limite do eletrodo, porém ativa e orientada como no caso do tipo A. A do tipo C (imobilização) ocorreu no cátodo, em correntes maiores que 0,5 μ A. As respostas de zoósporos variaram, como, a diminuição da velocidade de natação, da rotação, da paralisação dos movimentos e da ruptura da célula zoospórica (KHEW; ZENTMYER, 1974).

Apesar de ser bastante evidente que as moléculas quimiotáticas podem estar envolvida nas respostas de atração de zoósporos às raízes das plantas, a mais recente evidência sugere que as correntes elétricas e, não os exsudados radiculares (como os aminoácidos), estão envolvidas nesta resposta quimiotática (van WEST et al., 2002). As raízes das plantas geram campos elétricos fracos na rizosfera que pode estimular a motilidade eletrostática de zoósporos. A coifa e a zona de alongamento (meristema apical) têm a característica de atuar como ânodos, enquanto que a zona pilosa (pelos radiculares) e as feridas são caracteristicamente catódicas (van WEST et al., 2002).

Morris e Gow (1993) propõem que a eletrotaxia é o resultado de dois processos: a orientação de zoósporos no campo de acordo com o dipolo elétrico (eletrotopotaxia) e a tensão de estimulação dependente da frequência de rotação (eletroclinoquinese). O dipolo elétrico pode ser resultado da carga relativa de proteínas ou glicoproteínas dos flagelos anterior e posterior. Os autores observaram que os flagelos anterior e posterior, em campos elétricos, agem como se fossem zoósporo ânodotático e cátodotático, respectivamente, tendo as cargas de dipolo orientadas em direções opostas. A carga do dipolo do flagelo posterior foi carregada positivamente em relação ao flagelo anterior de zoósporos de *P. palmivora* que nadaram em direção ao polo positivo. A situação contrária foi observada para *Py. aphanidermatum*.

Entre outros tipos de taxia, a gravitaxia (geotaxia) também já foi proposta para explicar o comportamento de natação de zoósporos de espécies de *Phytophthora*, como em *P. citricola* (OCHIAI; DRAGIILA; PARKE, 2011) e *P. palmivora*, que têm o comportamento de gravitaxia negativa, ao contrário de *P. cactorum* (Lebert & Cohn) J. Schröt. e *P. nicotianae*, que se dirigiram para o fundo do tubo de capilaridade, consoante à ação da gravidade (CAMERON; CARLILE, 1977). A ausência de geotaxia negativa foi observada em isolados mutantes Pigpa1-silenciados de

zoósporos de *P. infestans*, ao contrário, do observado em isolados selvagens (LATIJNHOUWERS et al., 2004).

A reotaxia é a propriedade que certos organismos apresentam ao se moverem em sentido contrário ou a favor das correntes de água ou de outra substância. Como os zoósporos têm o formato elipsoide, eles acabam por exibir a reotaxia, além da girotaxia, fazendo um percurso helicoidal e nadando, preferencialmente, em direção ao fluxo (reotaxia positiva) (OCHIAI; DRAGIILA; PARKE, 2011). O fluxo direcionado de exsudatos radiculares contribui para esse deslocamento.

Katsura e Miyata (1971) observaram que zoósporos de *P. capsici* Leonian mostraram reotaxia positiva, nadando contra a corrente d'água. Os zoósporos nadaram para a abertura do tubo capilar, a partir do qual uma corrente de água com exsudatos era lançada. A velocidade desta foi de 130–140 $\mu\text{m/s}$, justamente porque os zoósporos de *P. capsici* nadam por volta dessa velocidade. Os zoósporos conseguiram vencer o fluxo e chegaram até a abertura do tubo capilar.

Para os zoósporos, a geotaxia e o reotaxia são situações bastante vantajosas porque a população destes micro-organismos consegue permanecer nas camadas mais superficiais (aeróbicas) do solo (CAMERON; CARLILE, 1977; CARLILE, 1980; KATSURA; MIYATA, 1971).

Os zoósporos de *Phytophthora*, muitas vezes, tornam evidente o fenômeno de autoagregação (formam um grupo de cistósporos). É um processo pelo qual, os zoósporos de algumas espécies de *Phytophthora* nadam juntos, espontaneamente, em grupos de centenas ou milhares (van WEST; VLEESHOUWERS, 2004) sobre placas de Petri de vidro, quando não há a presença de materiais de acolhimento, quando da ausência de um hospedeiro ou a falta de estímulos para que ocorra o encistamento (ISLAM; TAHARA, 2001a). Ko e Chase (1973) descreveram pela primeira vez este processo para zoósporos de *P. palmivora*.

Para baixas concentrações de zoósporos, os padrões de autoagregação não são observados. No entanto, uma suspensão de zoósporos suficientemente concentrada (entre 10^5 – 10^6 zoósporos/mL), os padrões são tipicamente observados, formando focos com a mais alta concentração de zoósporos no centro, com restrição de crescimento lateral de tubos germinativos, e uma baixa densidade de células zoospóricas na região circundante, mas com rápida extensão dos tubos germinativos nessa região periférica e em direção ao centro do foco (PORTER; SHAW, 1978;

SAVORY et al., 2014). Nas raízes, o fenômeno de autoagregação contribui para que a infecção causada por estraminipilas fitopatogênicos seja bem-sucedida, justamente pelo aumento da pressão do inóculo (van WEST; VLEESHOUWERS, 2004).

Em zoósporos mutantes PiGPA1 (*Phytophthora infestans* G-protein α subunit) silenciados de *P. infestans*, a autoagregação também foi afetada (LATIJNHOUWERS et al., 2004). Provavelmente, o que ocorre, nesses zoósporos mutantes é um defeito na detecção de um atrativo ou a incapacidade de dominar a direção do movimento natatório. Para os autores a proteína G α desempenhar um papel importante nesse processo (LATIJNHOUWERS et al., 2004).

O zoósporo, após as situações em que ocorre o contato, os padrões de reconhecimento, o encistamento da célula zoospórica e, em seguida, a germinação do cisto, poderá passar por dois tipos de tropismos, mas precisamente, o tubo germinativo. No primeiro tipo, chamado de quimiotropismo, o zoósporo encistado germina a uma distância, na superfície da raiz e, direciona o tubo germinativo para o sítio de onde provém a substância que o atrai (TYLER, 2002). O segundo tipo, denominado de tigmotropismo, o cisto germinado cresce, orientando-se, sobre as propriedades físicas e topográficas (depressões e elevações) presentes na superfície da raiz (substrato) até o local de onde irá penetrá-la (BRAND; GOW, 2012; TYLER, 2002).

Zentmyer (1961a, b) observou que os tubos germinativos de *P. cinnamomi* evidenciam quimiotropismo positivo para a região de alongação da raiz destacada e para os exsudados radiculares e aminoácidos liberados pelas raízes, que estavam a cerca de 2 a 3 mm de distância de onde o zoósporo germinou. Os tubos germinativos cresceram unidirecionalmente em direção àquela região. O quimiotropismo contribui ainda para a maior eficiência no processo de invasão dos tecidos radiculares do hospedeiro pelos zoósporos, desempenhando um papel importante na penetração e na infecção da raiz (ALLEN; NEWHOOK, 1973; GOUVEIA, 1993; ZENTMYER, 1961a, b; 1970).

Hifas de *P. palmivora* também são influenciadas pelos exsudatos liberados pelo cacauero (*Theobroma cacao* L.) e crescem por quimiotropia (CAMERON; CARLILE, 1978; CARLILE, 1983). Da mesma forma, os tubos germinativos de *P. sojae* respondem quimiotropicamente às isoflavonas de soja (MORRIS; BONE; TYLER, 1998; TYLER et al., 1996).

As hifas de *P. sojae* preferencialmente penetram a superfície da raiz na base da uma depressão que corresponde à junção entre as paredes anticlinais das células epidérmicas (ENKERLI; HAHN; MIMS, 1997; HARDHAM, 2001). Uma possibilidade é que este local é o preferido por causa de uma maior concentração de atrativos químicos presentes. No entanto para Morris, Bone e Tyler (1998), o sinal primário parece ser o de tigmotropismo. As hifas de *P. sojae* emergiram de cistos na superfície de uma membrana porosa de PET e cresceram fortemente aderidas à membrana, mesmo como a presença de uma solução de isoflavonas. Quando as hifas encontraram um poro, elas cresceram através dele. No entanto, mesmo indo de encontro ao gradiente de isoflavonas e com a passagem da hifa por dentro do poro, o crescimento foi para fora da superfície e direcionado para o meio, do outro lado da membrana. Isso indica que ocorreu uma interrupção no desenvolvimento, resultante da passagem do tubo germinativo, através do poro, além da ação do tigmotropismo, ao vencer as barreiras físicas presentes na membrana (MORRIS; BONE; TYLER, 1998; TYLER, 2002).

O quimiotropismo e o tigmotropismo influenciam na orientação dos tubos germinativos e na formação dos apressórios (JUDELSON; BLANCO, 2005).

Por outro lado, o reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro tem-se concentrado, principalmente na identificação e isolamento das substâncias produzidas pelos patógenos e que provocam diretamente uma resposta de defesa do hospedeiro, ou seja, da produção dos elicitores, e também na identificação dos genes dos patógenos que são responsáveis pela produção de tais substâncias, mas especificamente, dos genes de avirulência (TYLER, 2002; 2007; TYLER et al., 2006).

Os agentes fitopatogênicos atacam as plantas justamente porque durante o seu desenvolvimento evolutivo conseguiram assimilar as substâncias produzidas pelo hospedeiro, mas para que ocorra tal feito, ele tem que vencer diversas barreiras opostas impostas pelo hospedeiro. Os conhecidos mecanismos de defesa pré e pós-formados das plantas, ou seja, a presença de barreiras (estruturas) exteriores e internas e a produção de substâncias químicas, devem ser vencidos para que ocorra o sucesso da infecção e posterior, colonização, principalmente pela capacidade do patógeno em penetrar, assimilar o conteúdo do protoplasto das células das plantas e neutralizar as reações de defesa do hospedeiro (AGRIOS, 2005b; PASCHOLATI, 2011a).

O patógeno, nesse processo, faz uso de forças mecânicas e/ou de compostos químicos (como enzimas, fitotoxinas, hormônios, polissacarídeos extracelulares, além de outros fatores envolvidos na patogenicidade) (AGRIOS, 2005b; PASCHOLATI et al., 2008; PASCHOLATI, 2011a). Após os eventos intermediários do ciclo das relações patógeno–hospedeiro (como penetração, infecção e colonização), as diferentes respostas celulares dependem da resistência ou da susceptibilidade do hospedeiro ao agente fitopatogênico (ESCANFERLA, 2011).

A interação entre planta x microrganismo, no que diz respeito aos eventos de defesa e de ataque, foi se desenvolvendo ao longo de um processo de coevolução. De maneira geral, as plantas são constantemente atacadas por diversos inimigos em potenciais (e. g., fitopatógenos e insetos-praga), porém, as mesmas apresentam diferentes meios e mecanismos para se defenderem desses agentes opositores, resistindo ao ataque da maioria desses organismos, através da ativação de reações de defesa provocada, direta ou indiretamente por moléculas produzidas pelo agente invasor (HARDHAM; SHAN, 2009).

Para isso, passam a ser defender desses organismos de forma ativa e passiva (ESCANFERLA, 2011; PASCHOLATI, 2011b). Resumidamente, os mecanismos de resistência das plantas são subdivididos em pré-formados (os ditos passivos, constitutivos) e pós-formados (atuam de forma ativa, induzíveis) (AGRIOS, 2005c; PASCHOLATI, 2011b; SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008).

As barreiras estruturais ou fatores de resistência pré-formados se constituem na primeira linha de defesa contra os fitopatógenos. As plantas dispõem de ceras, cutícula, tricomas, estômatos, fibras/vasos condutores e paredes celulares espessas para a defesa imediata. Os fatores de resistência pré-formados de caráter bioquímico, que são substâncias químicas presentes nas células do hospedeiro, tais como alcaloides, lactonas insaturadas, compostos fenólicos, entre outras, são encontrados em altas concentrações na planta antes da chegada do patógeno, e também atuam como mecanismos de defesa do hospedeiro frente ao ataque do patógeno (BELL, 1981). Assim como pré-formados, aqueles que são induzidos, após a chegada do patógeno também contribuem para a defesa. Nesse caso, pode-se citar, os estruturais, como a papila, halos, tilose e, os bioquímicos [e. g., as espécies ativas de oxigênio — EAO's (*Reactive Oxygen Species* — ROS), as fitoalexinas e as proteínas relacionadas à patogênese — as famosas PR-proteínas (do inglês:

Pathogenesis-related proteins — PR-proteins) (BELL, 1981; PASCHOLATI, 2011b; RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003; SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008; STANGARLIN et al., 2011; STINTZI et al., 1993).

Assim como os fungos fitopatogênicos, as espécies de *Phytophthora* também usam enzimas que degradam a parede celular para penetrar e colonizar a planta. Outras espécies do gênero usam os meios mecânicos da hifa e do apressório (BENHAMOU; CÔTÉ, 1992; HARDHAM; SHAN, 2009). Hifas de *Phytophthora* secretam uma gama de enzimas que quebram os polímeros encontrados na parede celular de plantas e vários genes relacionados às enzimas já foram sequenciados e codificados. Em três espécies de *Phytophthora* (*P. ramorum* Werres, de Cock & Man in 't Veld, *P. sojae* e *P. infestans*), os genes que codificam glucanases, poligalacturonases, pectina esterases, pectina liases e xilanases já foram identificados (HARDHAM; SHAN, 2009).

As paredes celulares são degradadas por moléculas de enzimas secretadas pelo “fungo”, à medida que as hifas de *Phytophthora* crescem, sendo que essas moléculas são expelidas, a partir do ápice das hifas, em pequenas vesículas apicais (GAULIN et al., 2002; ROSE et al., 2002; SHAPIRO; MULLINS 2002; TIAN; BENEDETTI; KAMOUN, 2005). A degradação da celulose e pectina da parede celular de plantas já foi demonstrada por estudos histológicos. Benhamou e Côté (1992) observaram nas raízes de tabaco cv. Xanthi-nc inoculadas com *P. parasitica* var. *nicotianae*, a colonização dos tecidos radiculares por este patógeno causando alterações nas paredes das células primárias e na repartição das matrizes da lamela média. O padrão de distribuição de pectina indicou que o fungo produziu enzimas pécticas que se difundiram extracelularmente e que a liberação de fragmentos pécticos e o acúmulo de moléculas de pectina, em locais específicos, como nos espaços intercelulares, foram frequentemente detectados. Os autores observaram também que a celulose decresceu nos tecidos radiculares das plantas de tabaco inoculadas, indicando a degradação deste polímero de cadeia longa da parede celular do hospedeiro, durante a patogenicidade. Judelson e Blanco (2005) relacionaram várias enzimas secretadas por espécies de *Phytophthora* que degradam a parede celular do hospedeiro, como: cutinases, poligalacturonases, pectato liases, celulasas (β -1,4-glucanases), hemicelulasas (xilanases e outras), proteínas inibidoras da glucanase (PIGs) e as inibidoras de protease.

Durante o processo de infecção, *Phytophthora* spp. causam uma variedade de alterações histológicas nos hospedeiros. As alterações observadas dependem das espécies dos agentes fitopatogênicos, o tipo de tecido colonizado e a liberação de toxinas capazes de causar alterações localizadas e distantes das células do hospedeiro (DAVISON, 2011). As toxinas produzidas por *Phytophthora* atuam de forma secundária nas plantas (ESCANFERLA, 2011), agindo diretamente no protoplasto e interferindo na permeabilidade de membranas (PASCHOLATI, 2001a).

Yang, Xiao e Hu (2011), trabalhando com o patossistema *P. infestans* × batateira verificaram que os três isolados do “fungo” foram tóxicos para as três variedades estudadas e que estas podem ser infectadas por baixas concentrações de toxina (diluição da toxina bruta em até 200x). Os resultados mostraram que as variedades reagiram diferencialmente para as distintas concentrações da toxina e que as toxinas produzidas por diferentes isolados de *P. infestans* sugeriram a presença destas, mediada pela especificidade entre as variedades de batateira e *P. infestans*.

Tyler et al. (2006) relata que vários genes correspondentes das denominadas NLPs [Nep1 (*Necrosis and ethylene-inducing peptide1*)–like proteins], que são toxinas citolíticas destruidoras da integridade da membrana citoplasmática (que promovem a lise celular), foram identificados no genoma de duas espécies de *Phytophthora*. Em *P. sojae*, as famílias das toxinas PcF (*P. cactorum factor*) e CRN [*crinkling- (or crinkler-) and necrosis-inducing proteins*] são mais expandidas, ao passo que em *P. ramorum*, a família NPP1 (*necrosis-inducing Phytophthora protein 1*), além de ser mais expandida e também diversificada.

Alguns fitopatógenos produzem hormônios vegetais “*in vitro*”. Estes hormônios secretados pelo agente causal, todavia, em associação com a planta estimula o aumento da síntese hormonal pelo hospedeiro, uma vez que é induzido por aquele (SILVA et al., 2008b).

No gênero *Phytophthora*, em intensa revisão de literatura, a produção de hormônios parece estar mais envolvida com a reprodução sexual que com a síntese destes em causar doenças em plantas. As espécies do gênero são heterotáticas e a indução hormonal cruzada com os *mating types* $\alpha 1$ e $\alpha 2$, regulam a reprodução sexual e desencadeia a formação de oósporos para essas espécies (CHERN; TANG; KO, 1999; HARUTYUNYAN et al., 2008; JUDELSON; BLANCO, 2005; KO, 1980; 1983; 1988; 1998; KO; KUNIMOTO, 1981; OJIKI et al., 2011).

De acordo com Oßwald et al. (2014), várias reações fisiológicas e bioquímicas ocorrem em plantas lenhosas infectadas por *Phytophthora*, como uma redução gradual no consumo de água, o fechamento rápido dos estômatos e, *a posteriori*, uma redução na fotossíntese. Oßwald et al. (2014) ainda consideram que os desequilíbrios hormonais que ocorrem na planta podem estar envolvidos nestas alterações dos processos ecofisiológicos.

Quanto aos mecanismos de resistências de plantas às espécies de *Phytophthora*, esses são diversos e pode-se destacar que os estruturais contribuem grandemente para evitar a invasão do patógeno nos tecidos dos hospedeiros. Biles et al. (1993) relatam que a espessura da cutícula, camada que reveste a epiderme dos frutos, é maior em pimentão (*Capsicum annuum* L.) maduro. A região cuticular do pimentão se mostra como responsável pela resistência deste à inoculação com *P. capsici* Leonian. Nesse trabalho, os autores verificaram que a cutícula é uma barreira mais consolidada para evitar a infecção.

Os tricomas podem agir como uma barreira física para a penetração de fungos, funcionando como um mecanismo de resistência contra o ataque de fitopatógenos fúngicos (LAI et al., 2000). A espécie selvagem de batateira (*S. berthaultii* Hawkes) possui dois tipos de tricomas glandulares em seu tecido foliar, denominados de tipo A e tipo B (GIBSON, 1976). A espessura do tipo B é maior (600–950 µm) em relação ao tipo A (120–210 µm) (LAI et al., 2000). Em decorrência dessa maior espessura, aliado a substância exsudada do tricoma do tipo B (éster de sacarose), este foi capaz de reduzir a taxa de esporulação de *P. infestans* (HOLLEY; KING; SINGH, 1987), assim como, uma diminuição dos sintomas (LAI et al., 2000). Isso indica a grande influência do tricoma do tipo B para retardar a infecção por *P. infestans* (SILVA; BISOGNIN, 2004), ao contrário do tricoma do tipo A, que favorece o desenvolvimento das hifas e da infecção, pois a morfologia deste tricoma favorece a ruptura da membrana (LAI et al., 2000).

De vários flavonoides presentes no gênero *Citrus*, as flavanonas glicosídicas são acumuladas em maior quantidade, embora a concentração destes compostos seja dependente da idade da planta (del RÍO et al., 1998). Em estudo com as flavonas provenientes dos óleos essenciais de laranja azeda, clementina e laranja doce, del Río et al. (1998) observaram a inibição de 100, 72, e, apenas 14% do crescimento micelial de *P. citrophthora*, respectivamente.

Albrecht e Bowman (2007) verificaram a atividade de proteínas relacionadas com a defesa (β -1,3-glucanases, quitinases e peroxidases) entre *P. palmivora* e sete genótipos de porta-enxertos cítricos. A infecção aumentou as concentrações de proteínas totais, fenóis totais e a atividade de β -1,3-glucanases em raízes de todos os genótipos, enquanto que os níveis de quitinase e peroxidase em todos os porta-enxertos foram ligeiramente reduzidos ou inalterados após infecção. Embora, os autores tenham observado diferenças na expressão das proteínas entre os genótipos susceptíveis e tolerantes, os efeitos foram associados com a progressão da doença, e não com resistência ao fitopatógeno. Albrecht e Bowman (2007) ainda sugerem que o aumento da atividade das proteínas e dos compostos fenólicos não está diretamente implicado na defesa primária contra *P. palmivora*, mas que esse aumento pode colaborar para inibir o fitopatógeno durante a infecção em genótipos tolerantes.

Em outros patossistemas, também há relatos do acúmulo de β -1,3-glucanase, como em cultivares de pimentão infectadas com *P. capsici* (EGEA et al., 1999); em *Lycopersicon esculentum* Mill. var. *cerasiforme* Alef. (sinônimo: *S. lycopersicum*) depois da infecção por *P. infestans* (SALAS; ZAMORA, 2009); em batateira cv. Huinkul por *P. infestans* (TONÓN et al., 2002); em clones de seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A.Juss.) Müll.Arg.], respondendo à infecção por *P. meadii* McRae (THANSEEM; JOSEPH; THULASEEDHARAN, 2005); e, em cacaueteiro por *P. megakarya* Brasier & M.J. Griffin (OMOKOLO et al., 2003).

2.1.6 Detecção de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência em plantas de citros inoculadas por *Phytophthora nicotianae*

Embora as técnicas colorimétricas sejam importantes ferramentas de detecção “*in vitro*” da presença de compostos fenólicos, é de suma importância fazer a cromatografia concomitante às técnicas colorimétricas, visando a separação e a quantificação dos compostos fenólicos individualmente, pois utiliza gradiente da fase móvel para separação de diferentes classes de compostos.

Nesse sentido, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) [*High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)], anteriormente denominada de cromatografia líquida de alta pressão é a técnica mais utilizada, podendo o aparelho estar acoplado a um detector. Este deve ser capaz de reconhecer quando uma

determinada substância é eluída, a partir da coluna. Portanto, tem que monitorizar a alteração na composição da fase móvel, e de alguma forma, converter essa alteração, em um sinal elétrico para, em seguida, transmiti-lo a um visor, onde é mostrado como um desvio da “*baseline*” (MEYER, 2005).

Há vários tipos de detectores, entre eles, o de arranjo de fotodiodo (DAF, em inglês: *Diode Array Detector* — DAD), a um detector de fluorescência ou de espectrometria de massas [*Mass Spectrometry* (MS)]. Esses tipos de conjuntos (aparelho + detector) fornecem uma ferramenta importante e bastante econômica para a verificação de polifenóis em extratos provenientes de plantas (ANDRADE et al., 2001; HÄKKINEN et al. 1999; HO, HOGG; SILVA, 1999; KALLITHRAKA et al., 2001; RAMPAZZO; TAKIKAWA; HAMINIUK, 2012).

O HPLC utilizando a detecção por radiação ultravioleta (UV) foi estabelecido como o método mais conveniente para fornecer informações valiosas sobre a distribuição de compostos fenólicos em plantas, que tem como característica a capacidade de absorver a luz UV. Por acoplamento de HPLC com detecção de diodos e reação química, vários compostos fenólicos a partir de misturas complexas podem ser separados, identificados e quantificados numa única operação (REGOS; TREUTTER, 2010).

Escanferla (2011), ao trabalhar com raízes de plântulas de tangerineira Sunki e de citrumeleiro Swingle, observou a presença de compostos fenólicos nas amostras, tanto das plântulas inoculadas e controle e que não houve diferença na composição quantitativa de compostos fenólicos para ambos os genótipos. Beltrame (2010) também não localizou alterações significativas na concentração de fenóis totais no porta-enxerto citrumeleiro Swingle, para os dois tratamentos. Escanferla (2011), porém observou diferenças qualitativas na composição dos compostos fenólicos entre os dois porta-enxertos. O HPLC detectou os seguintes equivalentes de polifenóis: apigenina, ácido clorogênico e rutina.

Danièle, Dommès e Hausman (2003) verificaram a presença de vários carboidratos nas hastes e nas folhas de dois híbridos de batateira (*Solanum phureja* Juz. & Bukasov × *S. tuberosum*) com diferentes níveis de resistência horizontal à requeima. A concentração de carboidratos de plantas infectadas e não infectadas foi determinada por HPLC. Os autores observaram que alguns carboidratos acumularam mais nas hastes do híbrido resistente e infectado (PD88) por *P. infestans*. Por outro lado, os teores desses carboidratos permaneceram inalterados

no híbrido susceptível (PD60). Nas folhas, o acúmulo deu-se apenas no híbrido susceptível infectado.

2.1.7 Prohexadione-Calcium (Pro-Ca)

Prohexadione-Calcium, pertence à classe de inibidores da biossíntese do hormônio vegetal giberilina, as acilciclohexanodiona, ou seja, a Pro-Ca atua na planta, controlando, reduzindo ou inibindo o crescimento vegetativo excessivo do comprimento dos ramos (BASAK; RADEMACHER, 2000; BYERS; YUDER, 1999; RADEMACHER et al., 1992; SANTOS et al., 2014), através da inibição da planta no processo de sintetização das giberilinas biologicamente ativas (GA_1) (*gibberellic acid*), pelo aumento nos níveis de giberelinas inativas (GA_{20}), pois este fitorregulador atua no bloqueio da conversão da GA_{20} para GA_1 (RADEMACHER, 2000).

As giberilinas estão intimamente ligadas no estímulo da divisão e do alongamento celular, o que acarreta, principalmente, no aumento do crescimento longitudinal do ramo. O uso deste inibidor da biossíntese da giberilina (Pro-Ca) diminui o intervalo de comprimento dos entrenós (BYERS; YUDER, 1999). Pro-Ca tem baixa toxicidade e persistência na planta (MANDEMAKER et al., 2005), tendo o seguinte nome químico: cálcio 3-óxido-4-propionil-5-oxo-3-ciclohexeno carboxilato.

Pro-Ca foi testado pela primeira vez pela empresa agroquímica alemã BASF (*Badische Anilin und Soda-Fabrik*) em árvores frutíferas, no início da década de 90. A partir do ano 2000, disponibilizou para o mercado de plantas da família Rosaceae Juss., dois produtos comerciais: Apogee® e Regalis® (RADEMACHER et al., 2004). Durante a fase de testes para o desenvolvimento de protocolos para a correta aplicação de Pro-Ca em pomares de maçã (*Malus xdomestica* Borkh.), observou-se que as plantas tratadas foram significativamente menos infectadas pela doença chamada de fogo bacteriano [agente causal: *Erwinia amylovora* (Burrill 1882) Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers & Smith 1920] e sarna-damacieira [*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter], reduzindo, dessa forma, a incidência e a severidade destas enfermidades, embora os produtos não tenham qualquer atividade bactericida (COSTA et al., 2001; FERNANDO; JONES, 1999; RADEMACHER; STAMMLER; CREEMERS, 1999; WINKLER, 1997; YODER; MILLER; BYERS, 1999).

As dioxigenases dependentes do ácido 2-oxoglutárico, em destaque, a flavanona 3-hidroxilase, que estão envolvidos na biossíntese dos flavonoides e das antocianinas é inibida pela presença do Pro-Ca. Os diversos tipos de flavonoides atuam como fitoalexinas, ativando as propriedades antimicrobianas desses compostos químicos nas plantas, imediatamente após a infecção pelo micro-organismo. A redução da incidência do fogo bacteriano, da sarna-da-macieira e, de outras doenças, em plantas tratadas com Pro-Ca pode ser explicada pela modificação no metabolismo dos flavonoides (RADEMACHER; KOBER, 2003; ROEMMELT et al., 2003; SPINELLI et al., 2010).

Solar et al. (2012) testaram Pro-Ca em plantas adultas de noqueira (*Juglans regia* L.) cv. Franquette com a finalidade de verificar o comportamento das plantas frente à infecção causada por *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (Pierce 1901) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings 1995, no que diz respeito, a severidade, além da concentração de compostos fenólicos em nozes (frutos). Houve uma redução significativa na severidade e os tecidos da casca dos frutos sintomáticos e tratados com Pro-Ca, nas análises fenólicas, em HPLC, mostraram valores 14 vezes maior de compostos fenólicos que os controles. Os frutos tratados apresentaram maior teor de fenóis totais, mais ácidos hidroxicinâmicos e flavanóis; enquanto, que o conteúdo de flavonoides e de ácido gálico foi baixo, em plantas tratadas com Pro-Ca.

2.1.8 Armadilhas para atração de zoósporos de *Phytophthora nicotianae*

Para Manoharachary e Mukerji (2006), a rizosfera pode ser definida como a parte do solo que é adjacente ao sistema radicular de uma planta, sendo que a rizosfera é bastante influenciada pelos exsudatos lançados por essas raízes. A área da rizosfera, em si, depende do tipo de solo, da planta hospedeira e das condições ambientais presentes no solo e as raízes, no “efeito rizosfera” sempre exerce uma influência nos vários tipos de micro-organismos presentes naquela região radicular. A natureza química e física da região radicular tem comportamento diferenciado do solo fora dessa região (MANOHARACHARY; MUKERJI, 2006).

A biologia da interação raiz–hospedeiro tem sido estudada extensivamente. Manoharachary e Mukerji (2006) relatam que muitos desses estudos visam elucidar a presença/acúmulo de microrganismos ao redor da zona radicular. Observa-se que vários compostos, como fenóis, bases nitrogenadas de ácidos nucleicos,

nucleotídeos, aminoácidos, ácidos orgânicos, vitaminas, carboidratos, como açúcares, taninos, enzimas, reguladores de crescimento (auxinas), etc. (KHEW; ZENTMYER, 1973; ZENTMYER, 1970), são exsudados pelas raízes e esses compostos têm ação seletiva sobre os micro-organismos alocados na zona de raiz. Os exsudatos radiculares são substâncias liberadas pelas raízes e que podem afetar o crescimento e a atividade biológica dos micro-organismos do solo, tanto na rizosfera, como no rizoplano (MANOHARACHARY; MUKERJI, 2006; SCHÖTTELNDREIER; FALKENGREN-GRERUP, 1999).

De acordo com Dalio (2013), a exsudação radicular varia em quantidade e qualidade dependendo da espécie, estágio de desenvolvimento da planta e das condições ambientais. Os compostos dos exsudatos radiculares são de natureza química e podem ser sinalizadores repelentes ou atraentes aos micro-organismos.

Dentro do processo de interação patógeno–hospedeiro, em particular, aos micro-organismos veiculados e habitantes do solo, há uma variedade muito grande de fitopatógenos que reconhecem o seu potencial hospedeiro, justamente pela liberação dos exsudatos radiculares por estes, ao meio ambiente. O exsudato produzido pela raiz e disseminado na rizosfera ativa imediatamente o micro-organismo em direção à região radicular através da motilidade. Levando em consideração esse contexto, os zoósporos, como os das espécies de *Phytophthora* se destacam na atração por exsudatos radiculares (DALIO, 2013; TYLER, 2002, 2006).

A motilidade de zoósporos de algumas espécies de *Phytophthora* se dá em direção aos sinais liberados pelos tecidos radiculares do hospedeiro, como isoflavonas (MORRIS; WARD, 1992) e o deslocamento natatório de zoósporos é um dos meios mais importantes para o início do processo infectivo por espécies desse gênero (CARLILE, 1983).

É bem conhecido que os zoósporos de importantes patógenos são atraídos por exsudatos liberados pelo hospedeiro, todavia, os mecanismos fundamentais dessas interações são pouco compreendidos. Os métodos de bioensaios são processos apropriados para estudar a fisiologia e o comportamento de zoósporos móveis, onde o pesquisador deve sempre procurar a praticidade e a comodidade na obtenção de resultados satisfatórios (ISLAM; TAHARA, 2001a).

Dalio (2013) faz referência que a maioria dos sistemas de ensaios utilizados pelos pesquisadores para investigar a atração quimiotóxica são principalmente

qualitativos, como a técnica das pontas de raízes excisadas (DUKES; APPLE, 1961; ZENTMYER, 1960; 1961a, b), do método da capilaridade (ALLEN; NEWHOOK, 1973; CAHILL; HARDHAM, 1995; DUKES; APPLE, 1961; HALSALL, 1976; HARDHAM; CAHILL, 1998, 2002; KHEW; ZENTMYER, 1973; MORRIS; WARD, 1992; ROYLE; HICKMAN, 1964; THOMAS; PETERSON, 1990), da membrana de acetato de celulose (MEHROTRA, 1970), da membrana de diálise (BOTHÁ; KOTZÉ, 1989; BOTHÁ; WEHNER; KOTZÉ, 1990a, b), do método das gotículas em poços de placas de Petri de poliestireno (MÜLLER, 1976; TAKAYAMA; MIZUTANI; TAHARA, 1998) e do método da partícula (HORIO et al., 1992; ISLAM; TAHARA, 2001b). O mais recente método desenvolvido e utilizado para a quimiotaxia de *Phytophthora* por exsudado é o da armadilha de zoósporos (DALIO, 2013; MASSOLA JÚNIOR et al., 2012).

Zentmyer (1961b) demonstrou uma resposta quimiotáxica de atração de zoósporos de *P. cinnamomi* a um gradiente de difusão de substâncias a partir de raízes de plântulas de abacateiro, onde os zoósporos dessa espécie de *Phytophthora* foram menos atraídos por raízes de cultivares tolerantes ao fitopatógeno do que às raízes de cultivares susceptíveis. Botha e Kotzé (1989), Botha, Wehner e Kotzé (1990a, b), também confirmam esse tipo de comportamento em porta-enxertos tolerante, moderadamente tolerantes e susceptível de abacateiro. Além dos autores citados anteriormente, Dalio (2013) e Massola Júnior et al. (2012) observaram o mesmo comportamento para com os zoósporos de *P. nicotianae* quando confrontados com os exsudatos radiculares de genótipos resistente e susceptível de porta-enxertos cítricos.

2.1.9 Elicitinas em espécies de *Phytophthora*, α -plurivorina e anticorpo

As elicinas são um conjunto de pequenas proteínas extracelulares (possuem baixo peso molecular, cerca de 10 kDa e, na maioria dos casos, com 98 aminoácidos) secretadas por todas as espécies estudadas do gênero *Phytophthora* e por poucas espécies do gênero *Pythium* (KAMOUN; HUITEMA; VLEESHOUWERS, 1999; PONCHET et al., 1999; TYLER, 2002; YU, 1995). Elas estão reunidas numa única família altamente conservada (HORTA, 2006). Essas proteínas purificadas possuem um papel duplo na interação planta-patógeno, podendo atuar como indutores de respostas de defesa da planta, ou seja,

provocando uma resposta de hipersensibilidade, incluindo a morte celular localizada, assim como, outras mudanças bioquímicas associadas a essa resposta, ou podem agir como fatores de patogenicidade, induzindo uma resistência sistêmica adquirida (RSA), e. g., no tabaco (QUTOB et al., 2006; TYLER, 2002; YU, 1995).

O papel das elicinas na biologia de *Phytophthora* ainda não está bem claro, mas elas podem funcionar como hidrofobinas fúngicas (formam um revestimento hidrofóbico na superfície de contato) e assim podem também operar, como fatores de patogenicidade outras interações planta–patógeno (YU, 1995).

As proteínas elicinas de várias espécies de *Phytophthora* já foram sequenciadas, assim como os genes de elicinas já foram clonados (BECKER; NAGEL; TENHAKEN, 2000; CAPASSO et al., 1999; DUCLOS et al., 2000; KAMOUN et al., 1993, 1999; KAMOUN; LINDQVIST; GOVERS, 1997; MAO; TYLER, 1996; PONCHET et al., 1999; QUTOB et al., 2000).

Isolados de *P. infestans* deficientes na proteína elicina *INF1* (*infestans 1*) induzem lesões necróticas em *N. benthamiana* Domin., sugerindo que as funções de *INF1*, como um fator de avirulência, condiciona resistência nesta espécie (KAMOUN et al., 1998). Ao contrário, isolados deficientes de *INF1* permanecem incapaz de infectar outras espécies de *Nicotiana*, incluindo a espécie comercial de tabaco, que pode reagir contra outros elicitores, membro da família de elicinas *INF* secretadas especificamente por *P. infestans* (KAMOUN; LINDQVIST; GOVERS, 1997), como o *INF2B*, que é um desses outros potenciais fatores de avirulência (HUITEMA et al., 2005).

Kamoun (2006) catalogou e classificou as moléculas efetoras secretadas pelas diversas espécies de eustraminipilas, incluindo as proteínas elicinas, com destaque para as espécies fitopatogênicas pertencentes ao gênero *Phytophthora*.

Dalio, Fleischmann e Oßwald (2011) mostraram através da microscopia de luz e de confocal de varredura a laser de fluorescência que a elicina citricolina ácida (FLEISCHMANN et al., 2005), renomeada recentemente como α -plurivorina (DALIO et al., 2012), proveniente de *P. plurivora* T. Jung & T.I. Burgess (sin.: *P. citricola*) foi essencial para que ocorresse a infecção das raízes de faia-européia (*Fagus sylvatica* L.) pelo fitopatógeno, atuando como um supressor de defesa durante a infecção (DALIO; FLEISCHMANN; OßWALD, 2012). Um anticorpo específico para a α -citricolina foi sintetizado contra a ação desta elicina, convertendo as plântulas

tratadas e que eram altamente susceptíveis ao patógeno em resistentes (OßWALD et al., 2014).

Dalio, Fleischmann e Oßwald (2011) comprovaram que, devido à interação específica entre a elicítina e o seu anticorpo, a molécula efetora foi aderida à superfície da raiz. Esta não foi localizada nos espaços apoplásticos dos tecidos da raiz, onde habitualmente se encontram as elicítinas. Em consequência disso, o fitopatógeno não era mais capaz de colonizar as raízes, devido ao bloqueio da α -plurivorina. Somado a isso, na presença do anticorpo α -plurivorina, os genes relacionados com a defesa das plantas, como as PR-proteínas e WRKY, foram regulados e aumentaram a concentração, em relação às plantas inoculadas e sem a presença do anticorpo (DALIO et al., 2012; DALIO; FLEISCHMANN; OßWALD, 2012; OßWALD et al., 2014).

Dalio (2013) testou a ação do anticorpo específico de α -plurivorina, em um ensaio de bloqueio, para o consumo de água, em plântulas inoculadas ou não com *P. plurivora*. Todas as plantas pré-incubadas com o anticorpo de α -plurivorina sobreviveram à infecção de *P. plurivora*, permanecendo saudáveis e externando pequenas alterações na absorção de água durante a condução do experimento. Ao contrário do tratamento das plântulas inoculadas, onde a maioria morreu, demonstrando a agressividade desse fitopatógeno em faia. Ao observar, por microscopia confocal, as raízes inoculadas nos tratamentos que continham o anticorpo, Dalio (2013) verificou que este impediu quase que completamente a entrada e a difusão da elicítina na região interna, com a detecção desta somente nas áreas superficiais das raízes.

2.1.10 Atividade zoosporicida de compostos fenólicos (polimetoxiflavonas e flavonoides)

Os compostos fenólicos envolvem um grupo bastante expressivo de substâncias que tem como característica essencial a presença de um anel aromático (benzeno) ligado diretamente a uma ou mais hidroxilas (VERMERRIS; NICHOLSON, 2006a). Fenóis simples e glicosilados, ácidos fenol-carboxílicos, fenilacéticos, os derivados dos ácidos benzóicos e cinâmicos, α -pironas (cumarinas e isocumarinas), β -cianinas, biflavonoides, xantonas, ligninas, flavonoides (chalconas, flavononas,

antocianinas e catequinas), taninos e quinonas são incluídas como compostos fenólicos (STANGARLIN et al., 2011; VERMERRIS; NICHOLSON, 2006a).

De acordo com Schwan-Estrada et al. (2008) possuem a tendência de serem solúveis em água e estão localizados, geralmente, nos vacúolos celulares, na forma de glicosídeos. Praticamente todas as vias metabólicas envolvidas na síntese de compostos fenólicos já estão elucidadas. As vias do ácido shiquímico e cinâmico, que são fenilpropanoides, constituem-se na sequência básica que determina os diferentes grupos de polifenóis e de lignina.

Para Lo e Nicholson (2008), os compostos fenólicos atuam inibindo a germinação de esporos, o crescimento micelial e a produção/atividade de enzimas microbianas, em especial, aquelas secretadas por espécies fúngicas e bacterianas, mas isso varia entre os diferentes grupos de polifenóis. Como operam nesses parâmetros fisiológicos e bioquímicos dos micro-organismos, os compostos fenólicos estão intimamente ligados aos mecanismos estruturais e bioquímicos de resistência de plantas dentro do contexto da interação patógeno–hospedeiro (NICHOLSON, 1995; NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992; VERMERRIS; NICHOLSON, 2006b).

As plantas cítricas são fontes ricas e contêm uma grande variedade de constituintes flavonoides. Polimetoxiflavonas (PMFs) são encontradas quase que exclusivamente no gênero *Citrus*, principalmente na casca de tangerinas, das laranjas doces e mandarinas (*C. reticulata* Blanco). As polimetoxiflavonas tem amplo espectro de atividade biológica, incluindo ação anti-inflamatória, anticarcinogênica, antiaterogênica e neurotrópica, além de propriedades que aumentam a memória em seres humanos (AL RAHIM et al., 2009; LI; LO; HO, 2006; MANTHEY; GROHMANN; GUTHRIE, 2001). Em plantas cítricas, as PMFs estão envolvidas nos mecanismos de defesa e de resistência naturais de plantas, atuando como agentes antifúngicos. As polimetoxiflavonas heptametoxiflavona, nobiletina, sinensetina e tangeretina são as encontradas no flavedo (epicarpo) e no albedo (mesocarpo) das frutas cítricas e quando as frutas estão infectadas, as concentrações dessas PMFs aumentam (ARCAS et al., 2000; del RÍO et al., 2004; NOGATA et al., 2003).

De todo os flavonoides até agora relatados no gênero *Citrus*, os glicosídeos flavanonas são acumuladas em grande quantidade, em folhas e frutas, embora a concentração desses compostos dependa fundamentalmente da idade da planta (BERHOW, 1998; FRYDMAN et al., 2004; KOCA et al., 2009).

As flavonas em *Citrus* são encontradas nas formas glicosiladas e agliconas. As flavonas agliconas apresentam uma grande variedade de compostos, com a estrutura frequentemente multissubstituída por grupos hidroxil e/ou metoxil. Entre elas, destacam-se as escutelareína (5,6,7,4'-tetrametoxiflavona), sinensetina (5,6,7,3',4'-pentametoxiflavona), tangeretina (5,6,7,8,4'-pentametoxiflavona), quercetogetina (3,5,6,7,3',4'-hexametoxiflavona), nobiletina (5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona), 3,5,6,7,8,3',4'-heptametoxiflavona, 7-hidroxi-3,5,6,3',4'-pentametoxiflavona e 7-hidroxi-3,5,6,8,3',4'-hexametoxiflavona (del RÍO et al., 1998; 2004; HUANG; HO, 2013; MARTÍNEZ-NICOLÁS et al., 2013).

As polimetoxiflavonas, assim como outros flavonoides, desempenham um papel importante em plantas (del RÍO et al., 1998). Podem agir como agentes antioxidantes e inibidores de numerosas enzimas, como as fenolases (CHALLICE; WILLIAMS, 1970) e as pectinametiltransferases (de SWARDT; MAXIE; SINGLETON, 1967).

O potencial antifúngico, antiviral e antibacteriano de alguns compostos fenólicos já foi estudado. Johann et al. (2007) estudaram a atividade antimicrobiana de várias polimetoxiflavonas contra fungos e bactérias patogênicas aos humanos, além de fungos fitopatogênicos. No ensaio, as bactérias oportunistas foram mais sensíveis a tangeritina, nobiletina e escoparina, obtidas de citros, do que os fungos fitopatogênicos.

A flavona nobiletina, isolada da casca de tangerina, apresentou atividade fungistática para o crescimento micelial do fungo *Deuterophoma tracheiphila* Petri, agente causal do “*mal secco*” (BEN-AZIZ, 1967). Huet (1982) fez uma revisão sobre o efeito dos citroflavonoides na farmacodinâmica, relatando as atividades antifúngica e antiviral desses compostos. Kaul, Middleton Junior e Ogra (1985) enumeraram a ação da quercetina, hesperitina e catequina na inibição da infecciosidade e da replicação intracelular de vários vírus que causam infecções em seres humanos, como *Herpes simplex virus type 1* (HSV-1), *Poliovirus type 1*, *Human parainfluenza virus type 3* (hPIV-3) e *Human respiratory syncytial virus* (hRSV). A naringenina, encontrada na casca de bergamota (*C. bergamia* Risso) apresenta atividade antibacteriana, principalmente contra as bactérias gram-negativas (MANDALARI et al., 2007).

Para a inibição da motilidade e, subsequente, lise de zoósporos do estraminipila *Aphanomyces cochlioides* Drechsler, agente causal da podridão

radicular da beterraba (*Beta vulgaris* L.), da podridão negra de raízes de espinafre (*Spinacia oleracea* L.), do “damping-off” em plântulas de acelga [*Beta vulgaris* subsp. *cicla* (L.) W.D.J. Koch], entre outras espécies olerícolas, Islam et al. (2002) testaram vários produtos naturais, como os taninos poliflavonoides, um extraído da casca de *Lannea coromandelica* (Houtt.) Merr. e dois taninos comerciais. Nesse trabalho, os autores observaram que os poliflavonoides inibiram a motilidade e posteriormente o rompimento dos zoósporos, em todas as relações de dose-resposta, nos intervalos de concentração de 0,1–50 µg/mL. A maior atividade (inibição e lise) foi observada no tempo de 60 minutos. Begum et al. (2002) estudaram a atividade biológica “*in vitro*” dos derivados do ácido anacárdico (proveniente de frutos verdes de *Ginkgo biloba* L.), no potencial zoosporicida contra *A. cochlioides*. Um dos compostos (22:1- ω^7 -ácido anacárdico) foi o inibidor de motilidade mais potente (98% em 30 min) com 55% de lise dos zoósporos encistados, em uma concentração de 1×10^{-7} M.

2.1.11 Meios de cultura e qualidade da luz no crescimento micelial e na esporulação de *Phytophthora nicotianae*

Os esporângios (estruturas reprodutivas assexuais) e zoósporos (esporos assexuais móveis formados no interior dos esporângios) das espécies de estraminipilas são as mais importantes estruturas “fúngicas” a serem responsáveis pela disseminação, infecção e desenvolvimento das doenças causadas por espécies de *Phytophthora* em culturas agrônômicas e florestais (LUZ; MATSUOKA, 2001). Silva e Doihara (2003) relatam que nem sempre a obtenção dessas estruturas reprodutivas infectantes é alcançada através da utilização dos meios de cultura convencionais/tradicionais.

Para Mitchell e Kannwischer-Mitchell (1992), a produção de esporângios e de zoósporos de *Phytophthora* é realizada mediante a aplicação de estresse nutricional. O patógeno, depois de crescido e desenvolvido em meio de cultura é transferido para água destilada estéril, estimulando, assim, a formação de estruturas de reprodução, principalmente, a de esporângios (MITCHELL; KANNWISCHER-MITCHELL, 1992).

A composição qualitativa e quantitativa de substâncias do meio de cultura age influenciando tanto no crescimento, na morfologia da colônia, quanto na esporulação dos fungos e estraminipilas fitopatógenos, que por sua vez, apresentam

necessidades nutricionais bastantes específicas. Quando o fungo é cultivado em laboratório, é necessário que os meios de cultura sejam destinados a fazer a simulação ou até mesmo melhorar as condições naturais dos substratos para que os micro-organismos cresçam e se desenvolvam satisfatoriamente, ainda que alguns meios sejam quimicamente indefinidos (PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 2010). Em vista disso, diversos meios de cultura quanto à sua natureza de classificação, como os meios sintéticos (definidos), semissintéticos (mistos) e naturais (complexos, empíricos) foram e continuam sendo desenvolvidos com a finalidade de fornecer os nutrientes necessários para que ocorra o crescimento e o desenvolvimento das diferentes espécies de micro-organismos, principalmente de fungos, estraminipilas e bactérias fitopatogênicas, cultivados fora do seu meio natural (SUMBALI; MEHROTRA, 2009).

Historicamente, as espécies de *Phytophthora* crescem e esporulam bem em meios de culturas convencionais que contém decotos de feijão-de-lima (*Phaseolus lunatus* L.), farinha de milho (*Zea mays* L.), alfava (*Medicago sativa* L.), cenoura (*Daucus carota* L.), batata e suco de vegetais industrializado V8® {tomate, beterraba, cenoura, espinafre, aipo (*Apium graveolens* L.), alface (*Lactuca sativa* L.), salsa [*Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss] e agrião (*Nasturtium officinale* W.T.Aiton)} (Campbell Soup Co.). Nesses decotos podem ser adicionados um agente gelificante (o ágar-ágar, também conhecido simplesmente como ágar ou agarose) e o meio de cultura passa a ser solidificado. Em meios agarizados, algumas espécies de *Phytophthora* apresentam ótimo crescimento e esporulação. Por outro lado, outras espécies desse fitopatógeno, apresentam melhor crescimento e esporulação quando crescidas em meios líquidos (RIBEIRO, 1983; ZENTMYER; ERWIN, 1970).

Além do meio de cultura, outros fatores são essenciais para a estimulação do crescimento micelial e para a esporulação dos fitopatógenos, como a luminosidade (DHINGRA; SINCLAIR, 1995a).

Esse agente físico exerce vários efeitos diretos sobre a célula fúngica, induzindo ou inibindo o desenvolvimento vegetativo, a formação de estruturas reprodutivas e a germinação de conídios, ainda que algumas espécies fúngicas sejam indiferentes (efeito neutro) à quantidade e/ou qualidade da luz (COCHRANE, 1958; HAWKER, 1957; KUMAGAI, 1984; MINUSSI et al., 1977). A luz tem ações estimulantes sobre a reprodução sexuada e assexuada para a maioria dos fungos (MARSH; TAYLOR; BASSLER, 1959). Essa estimulação ocorre, principalmente,

através da formação de anéis concêntricos alternados em meios de cultura solidificados (os zoneamentos circulares de esporulação assexual *in vitro*, por exemplo), correspondentes às alternâncias diárias entre a presença e ausência de luz. Isso delimita os estádios de crescimento e repouso vegetativo, conforme o fotoperíodo empregado (HAWKER, 1965; MAHESHWARI, 2012; TEIXEIRA et al., 2001). Em colônias fúngicas submetidas ao escuro, esses zoneamentos geralmente não são observados (MAHESHWARI, 2012; MINUSSI et al., 1977).

De acordo com Cooperman e Jenkins (1986) e Dhingra e Sinclair (1995a), a maioria dos fungos que são sensíveis à luz esporula e cresce melhor quando são expostos à luz ininterrupta ou ao escuro contínuo; entretanto, alguns fungos, como os chamados de esporuladores diurnos necessitam de alternância de luminosidade (um período no claro e outro no escuro) para iniciar a esporulação. Esses fungos estão bem adaptados ao regime diário de alternância luminosa (claro/escuro), já que esta é a situação típica da natureza onde os fungos fitopatogênicos se encontram (TEIXEIRA et al., 2001).

Dhingra e Sinclair (1995a) relatam que alguns fungos precisam obrigatoriamente de luz para iniciar a formação de conidióforo e para a esporogênese (processo de formação dos esporos), porém, a esporulação é inibida pela presença de luz. Melo e Reis (2010) e Pulz e Massola Jr. (2009) relatam que alguns fungos têm a sua esporulação e o crescimento inibidos ou reduzidos pela ausência de luz.

No gênero *Phytophthora*, as investigações sobre os efeitos da luz visível e invisível na esporulação indicaram que a resposta à luz difere com a espécie (ARAGAKI; HINE, 1963; COHEN; EYAL; SADON, 1975; RIBEIRO; ZENTMYER; ERWIN, 1975; ZENTMYER; RIBEIRO, 1977).

2.2 Objetivo geral

O presente trabalho visa contribuir para análise e elucidação de alguns mecanismos de resistência dos citros a *P. nicotianae*, por meio de estudos fisiológicos e bioquímicos dos porta-enxertos citrumeleiro Swingle e tangerineira Sunki, respectivamente, resistente e susceptível ao patógeno, além da ação de meios de cultura e da qualidade da luz no estudo da fisiologia desse estraminipila.

2.3 Objetivos específicos

Os objetivos específicos desse trabalho foram:

- ✓ Fazer a detecção de alguns compostos fenólicos através da técnica HPLC (*High Performance/Pressure Liquid Chromatography*) em plantas inoculadas e não-inoculadas dos dois genótipos cítricos;
- ✓ Verificar o comportamento do genótipo resistente frente à possível inibição e desativação da síntese de compostos fenólicos através do tratamento das raízes do porta-enxerto Swingle com o regulador de crescimento de plantas (RCP) Prohexadione-Ca (Pro-Ca), que pode vim a atuar também como inibidor da síntese de compostos fenólicos nas plantas;
- ✓ Avaliar a atração de zoósporos de *P. nicotianae* por exsudatos radiculares provenientes dos dois porta-enxertos com a utilização de uma armadilha adaptada, com a finalidade de validá-la como uma nova metodologia para a quantificação de zoósporos atraídos por exsudatos de plantas;
- ✓ Verificar o comportamento do zoósporo, a motilidade e a zoosporogênese frente à ação de vários compostos fenólicos sintetizados; e,
- ✓ Testar a ação de diferentes meios de culturas e da qualidade da luz no crescimento micelial e na produção “*in vitro*” de zoósporos.

2.4 Material e métodos

2.4.1 Locais de condução dos experimentos e amostragem

Os experimentos foram montados e conduzidos no Campo Experimental e no Laboratório de Fungos Fitopatogênicos. Ambos os espaços são pertencentes ao Departamento de Fitopatologia e Nematologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/Universidade de São Paulo Esalq/USP), que está localizada na Cidade de Piracicaba, Estado de São Paulo, Brasil.

2.4.2 Cessão, cultivo, indução para a esporulação, calibração e preservação do isolado de *Phytophthora nicotianae*

O isolado LRS (Laboratório Regional de Sorocaba) 01/2006 de *P. nicotianae* foi cedido pelo Pesquisador Científico M. Sc. Eduardo Feichtenberger, lotado na UPDS (Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Sorocaba) do Instituto Biológico [órgão vinculado a APTA (Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios) da SAA (Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo)]. O isolado foi aquele que se mostrou o mais agressivo dentre os sete cedidos por esse pesquisador e, dessa forma, levando em consideração esta importante característica fitopatológica inerente ao isolado, o mesmo foi selecionado para a condução de todos os experimentos (BELTRAME, 2010; ESCANFERLA, 2011).

O isolado foi cultivado em meio Cenoura-Ágar (CA) modificado (Cenoura: 200 g; Ágar: 20 g; e Água destilada: 1000 mL) (LANGERON, 1945) e após a repicagem, as placas foram mantidas em câmara de crescimento do tipo BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) (AC71, Ação Científica, Piracicaba, São Paulo, Brasil), nas condições ambientais de 25 ± 1 °C, com fotoperíodo de 12 horas.

Para o preparo da produção de inóculo viável foi utilizada a metodologia I de Ribeiro e Baumer (1977) com modificações e alguns passos preconizados por Gooding e Lucas (1959). Das colônias de *P. nicotianae*, com dez dias de cultivo, foram retirados discos de micélio de 6 mm de diâmetro contendo estruturas do patógeno. Estes discos (15 por placa) foram transferidos para placas de Petri plásticas (90 mm de diâmetro x 15 mm de altura) com o auxílio de uma alça de platina flambada (Figura 1A).

Em seguida, houve a deposição de 15 mL, sobre os discos de CA, do meio líquido de Cenoura (200 g de Cenoura triturada/1000 mL de Água destilada, autoclavado a 121 °C por 20 minutos), o qual foi diluído na proporção de 2:8 [2 mL de meio líquido de Cenoura: 8 mL de ADE (Água Destilada Esterilizada)], passando a denominar-se de “meio pobre”. Nessa etapa, objetivou-se colocar os discos de CA (com as estruturas do patógeno) diretamente em contato com o meio líquido, cobrindo-os suavemente, tendo a finalidade de estimular a formação de material micélico do “fungo” e de clamidósporos, pelo período de 36 h (Figura 1B).

Após esse período, o meio líquido de Cenoura foi removido das placas, assepticamente, com uma pipeta plástica estéril, sendo substituído por 20 mL de

ADE. Posteriormente, as placas foram mantidas por mais 36 horas nas mesmas condições ambientais que serão listadas a seguir. O estresse nutricional, dessa segunda etapa, fez com que aqueles clamidósporos formados na etapa anterior, agora passassem para a produção de esporângios.

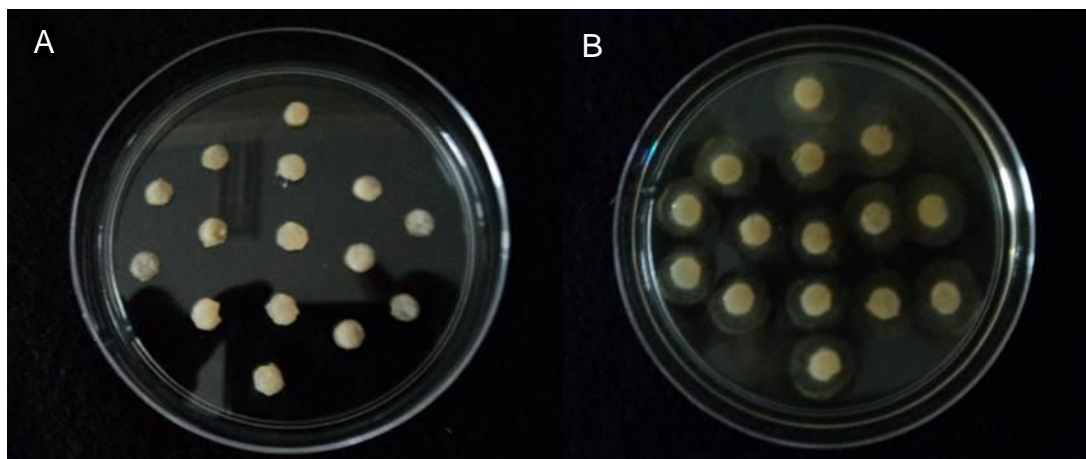


Figura 1 – Disposição dos discos de CA (Cenoura–Ágar) contendo estruturas do patógeno *Phytophthora nicotianae* nas placas de Petri plásticas. **A:** Antes da adição do meio líquido de Cenoura diluído na proporção de 2:8 [2 mL de meio líquido de Cenoura: 8 mL de ADE (Água Destilada Esterilizada)]; e, **B:** Com 36 horas após a adição do meio líquido de Cenoura diluído, denominado de “meio pobre”

As placas, nas duas etapas, permaneceram em câmara de crescimento do tipo BOD (AC71, Ação Científica, Piracicaba, São Paulo, Brasil) a 25 ± 1 °C, com fotoperíodo de 24 horas e depois foram transferidas para prateleiras de estante até o início dos experimentos. Para a indução e liberação dos zoósporos na água, as placas foram mantidas por 60 min a 6 °C (em prateleiras de geladeira) e, em seguida, foram colocadas por mais 60 min a temperatura ambiente (≈ 25 °C) em bancada de laboratório. Essa etapa (de choque térmico) é importante para promover a indução da clivagem citoplasmática do esporângio e, como efeito desse processo, ocorre a subsequente liberação dos zoósporos pela papila, após o retorno gradual do conjunto à temperatura ambiente (SIVIERO; FURTADO; MACHADO, 2002).

Os zoósporos liberados foram filtrados em gaze estéril. A calibragem da suspensão de *P. nicotianae* foi realizada em hemocitômetro. Como os zoósporos possuem flagelos que facilitam a natação, treinou-se a acuidade visual para contar o maior número de zoósporos presentes em cada área dos quatro cantos (quadrantes maiores) em ambas as zonas de contagem (total de oito quadrantes). A suspensão utilizada nas inoculações e ensaios foi ajustada para 10^5 zoósporos/mL.

O isolado, até a instalação dos experimentos, foi preservado por três métodos:

1º) em água destilada esterilizada pela técnica de Castellani (1939) e adaptada por Figueiredo (1967) para fungos fitopatogênicos. Os frascos de vidro do tipo penicilina injetável (20 mL) foram vedados e armazenados em câmara frigorífica (câmara fria com aproximadamente 4 °C);

2º) pela técnica de tiras de papel de filtro (BASSEL et al., 1977) adaptado, com armazenamento em ultrafreezer, a -80 °C (Sanyo MPF-U333V, Sanyo Electric Co., Ltd., Moriguchi, Osaka, Japão); e,

3º) por transferências/repicagens periódicas de discos de meio de cultura contendo estruturas miceliais e reprodutivas do fitopatógeno. Nesse método, teve-se o cuidado de manter o controle das sucessivas transferências, evitando dessa forma, a perda ou declínio da patogenicidade, da viabilidade, das mudanças na virulência, do decréscimo da capacidade de esporulação, do detrimento da estabilidade (característica) morfológica, fisiológica e genética do fungo, assim como, do acúmulo de metabólitos excretados no decorrer do crescimento e desenvolvimento do micro-organismo no meio de cultura (FENNEL, 1960; FIGUEIREDO; PIMENTEL, 1989; DHINGRA; SINCLAIR, 1995b; MEYER et al., 2006; SANTOS et al., 2010; PIRES; APARECIDO; FINATTI, 2012).

2.4.3 Obtenção e armazenagem das sementes, autoclavagem do substrato e cultivo das plântulas dos porta-enxerto cítricos

Os porta-enxertos utilizados no presente estudo são o citrumeleiro Swingle, considerado resistente à *P. nicotianae* e a tangerineira Sunki, susceptível ao patógeno. As sementes, de ambos os genótipos, foram cedidas pelo Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) (Araraquara–São Paulo), Centro APTA Citros “Sylvio Moreira” (Cordeirópolis–São Paulo) e produtor particular (Limeira–São Paulo). Estas sementes foram acondicionadas em embalagem de saco de polietileno transparente, fechadas e armazenadas em geladeira comum a $4,5 \pm 2$ °C e umidade relativa (UR) de $43 \pm 5\%$.

As sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio e água destilada esterilizada, na proporção de 1:3, por 5 minutos e, em seguida, foram lavadas três vezes em água destilada estéril. Após esse procedimento, as mesmas

foram semeadas em bandejas plásticas destinadas para a produção de mudas, contendo como substrato de solo, um composto de vermiculita expandida esterilizada em autoclave por 120 min, por dois dias consecutivos.

Cada processo de autoclavagem do solo foi realizado duas vezes, com o intervalo de sete dias entre uma autoclavagem e outra. Esse intervalo de tempo foi necessário para que o manganês, possivelmente presente na vermiculita, ficasse imobilizado, ou seja, indisponível para as plântulas (MENEZES; ASSIS, 2004), pois teores de manganês nos solos autoclavados são extremamente elevados (BOYD, 1971; LOPES; WOLLUM II, 1976; SONNEVELD, 1979; GOMES; CARNEIRO, 1997; MAHMOOD et al., 2014), afetando, em partes, a germinação das sementes e o desenvolvimento das plantas (WILLIAMS-LINERA; EWEL, 1984), assim como, causando fitotoxidez a estas (BOYD, 1971; SONNEVELD, 1979; TSUJI et al., 2006). Depois da última autoclavagem, esperaram-se mais sete dias e o solo foi finalmente utilizado para a semeadura. As bandejas foram mantidas em casa-de-vegetação e o substrato, primeiramente com as sementes e, posteriormente, com as plântulas, foi irrigado diariamente até a retirada destas para o processo de inoculação. As condições ambientais da casa-de-vegetação oscilaram entre 15 a 33 °C para a temperatura e 62 a 100% para a umidade relativa.

2.4.4 Detecção de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência

2.4.4.1 Instalação do ensaio, coleta, criodessecação e trituração das raízes

Para o ensaio de determinação dos compostos fenólicos por HPLC, plântulas de citrumeleiro Swingle e tangerineira Sunki, com três meses de idade, tiveram todo o sistema radicular inoculado com suspensão ajustada de 10^5 zoósporos/mL de *P. nicotianae*, em recipientes de vidro (do tipo Becker) com capacidade para 250 mL. Cada genótipo foi inoculado separadamente durante o período de seis horas.

Após o processo de inoculação, as plântulas foram mantidas em recipientes com ADE, a qual foi trocada diariamente. As raízes foram coletadas em dois tempos (2 e 4 dias após a interrupção do processo de inoculação). Como tratamento controle foi utilizado plântulas dos mesmos genótipos mantidas somente em ADE. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial $2 \times 2 \times 2$

(dois genótipos × dois tipos de inoculação × dois tempos de coleta), com quatro repetições por tratamento.

As raízes foram acondicionadas em sacos de papel, etiquetadas e criodessecadas em liofilizador (Alpha 2-4 LD Plus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Niedersachsen, Alemanha), acoplado a uma bomba de vácuo de pistão rotativo (Duo 10 M, Pfeiffer Vacuum Technology AG, Aßlar, Hessen, Alemanha), e que foi auxiliada por um filtro eliminador de névoa de óleo (ONF 25 L, Pfeiffer Vacuum Technology AG, Aßlar, Hessen, Alemanha).

Em seguida, as raízes criodessecadas, com o descarte da raiz pivotante, foram segmentadas, com auxílio de uma lâmina de carbono estéril, em fragmentos de cerca de 2 cm. Estes foram acondicionados em microtubos de 2 mL de fundo arredondado (Eppendorf Safe-Lock Tubes™, Eppendorf AG, Hamburg, Hamburg, Alemanha) e moídos em disruptor e homogeneizador de amostras biológicas para análise molecular TissueLyser II (Qiagen GmbH, Hilden, Niedersachsen, Alemanha), com a adição de duas esferas de carboneto de tungstênio de 3,0 mm de diâmetro, dentro dos microtubos plásticos, na programação de 30 Hz (1800 oscilações/minuto), com o tempo de execução de dois minutos.

Após essa etapa, as amostras foram processadas para a quantificação de compostos fenólicos.

2.4.4.2 Extração e detecção dos compostos fenólicos

Para a extração, determinação e identificação dos compostos fenólicos, seguiu-se a metodologia descrita por Fischer et al. (2006) e Roemmelt et al. (2003) com modificações. As amostras analisadas constituíram-se em frações com massa de 100 mg de raízes criodessecadas e trituradas, conforme os passos descritos no item 2.4.4.1. Estas foram acondicionadas em microtubos de 2 mL. Em cada amostra foi adicionado 500 µL de metanol PA (Pró-Análise), seguindo-se de extração em banho ultrassônico (**ultrassom**) por 30 minutos a 4 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm a 4 °C, por 10 min e os sobrenadantes transferidos para novos microtubos. As amostras foram colocadas novamente, por mais duas vezes, para extração e centrifugação do extrato metanólico. Nessas etapas, seguiu-se as mesmas quantidades de metanol, temperaturas, tempos e

rotação preconizadas nas etapas iniciais. Em novos microtubos, com cerca de 1 a 1,5 mL de sobrenadante, as amostras foram levadas para liofilizador, por cerca de 2,5 h (até o metanol desaparecer por completo). Os sedimentos foram dissolvidos novamente com 500 µL de metanol PA e colocados em banho ultrassônico por 10 min a 4 °C. Após essa etapa, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm a 4 °C, por 10 min e os sobrenadantes transferidos para novos microtubos. Isso foi necessário para estabelecer o ajuste da melhor diluição que favorecesse a detecção de compostos fenólicos.

A diluição estabelecida para detecção foi na razão de 1 (extrato metanólico de amostra) para 20 (metanol PA) conforme os mesmos valores obtidos por Escanferla (2011). Desse modo, pequenas quantidades (alíquotas em torno de 70 µL) do sobrenadante dessa última extração e centrifugação de cada amostra foram utilizadas para as análises.

As amostras foram injetadas para análise em aparelho HPLC e os compostos fenólicos foram separados em uma coluna Kinetex™ Tecnologia Core-Shell Pentafluorofenil (PFP) (Phenomenex, Inc., Torrance, California, Estados Unidos da América), com partículas de 2,6 µm, poros de 100 Å e dimensões de 150 × 4,6 mm de diâmetro interno. O HPLC foi realizado em gradiente de metanol (PA) e solução aquosa de 5% de ácido fórmico, de modo que o processo iniciou com mistura de 100% da solução de ácido fórmico:0% metanol e terminou com 10% de solução de ácido fórmico:90% metanol. O fluxo foi de 0,5 mL/min (TREUTTER et al., 1994) e o tempo de corrida para cada amostra foi de 60 minutos. Para tanto, o equipamento esteve acoplado a duas bombas 422 Master (Kontron®, Tradate, Varese, Itália) e a um detector de arranjo de diodos UV 78–279201 e de fluorescência RF–20A (ambos da Goebel Instrumentelle Analytik, Au in der Hallertau, Baviera, Alemanha) (BECK; van HOEK; ENGELHARDT, 1993). Os flavonoides equivalentes de apigenina e de ácido clorogênico foram seletivamente detectados a 280 nm e identificados pelos seus espectros de absorvância no ultravioleta. Este experimento foi realizado apenas uma vez.

2.4.4.3 Análise estatística dos dados

Antes da aplicação da análise de variância (Anava) foram realizadas análises exploratórias, para os dados em estudo, com a finalidade de verificar o correto

atendimento aos pressupostos do modelo matemático, tais como a normalidade de distribuição dos resíduos (W) e dos dados (D), respectivamente (SHAPIRO; WILK, 1965; LILLIEFORS, 1967), a homogeneidade de variâncias entre os tratamentos [homoscedasticidade (Q)] (BURR; FOSTER, 1972), a aditividade do modelo (TUKEY, 1949) e a análise da independência dos erros/resíduos aleatórios (FISHER, 1925; PARENTE, 1984). Todos os testes foram aplicados ao nível de $P \leq 0,5$.

Os valores de cada repetição de apigenina e de ácido clorogênico foram expressos em média para cada tratamento. As médias dos dados foram submetidas à Anava por meio do teste F (ZAR, 2010, SNEDECOR, 1934; FISHER; MACKENZIE, 1923) ($P = 0,01$), com aplicação do teste de comparações múltiplas de médias pelo método de Tukey (1953) ($P = 0,05$). Para este procedimento, utilizou-se o programa estatístico Assistat (versão 7.7, Centro de Tecnologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, Paraíba, Brasil) (SILVA; AZEVEDO, 2002).

2.4.5 Inibição da síntese de compostos fenólicos através do tratamento das raízes com Prohexadione-Ca (Pro-Ca) e detectados pela técnica HPLC

2.4.5.1 Instalação e condução do ensaio

Para este ensaio, o comportamento do genótipo resistente frente à possível inibição da síntese de compostos fenólicos através do tratamento das raízes com Prohexadione-Ca (Pro-Ca) foi realizado conforme a metodologia desenvolvida por Fisher et al. (2006) com adaptações. O sistema radicular de plântulas do porta-enxerto citrumeleiro Swingle (resistente) com seis meses de idade foram tratados com Regalis® (BAS 125 10 W, BASF Agricultural Center, Ludwigshafen am Rhein, Rheinland-Pfalz, Alemanha) que contém Pro-Ca 10%. A solução de Regalis® foi preparada na concentração de 250 ppm com base no ingrediente ativo. Para isso, o granulado dispersável em água foi preparada sob agitação contínua em agitador magnético (MA 085, Marconi, Piracicaba, São Paulo, Brasil). As plantas foram colocadas em Becker com capacidade para 500 mL, as quais foram mantidas em câmara de crescimento do tipo BOD (AC71, Ação Científica, Piracicaba, São Paulo, Brasil), com as seguintes condições ambientais médias de $25,5 \pm 1$ °C e UR de $65 \pm 5\%$ e fotoperíodo de 12 h.

O sistema radicular foi tratado por dez dias nessa solução (com a reposição periódica desta solução, em consequência do consumo de água pela planta, através da transpiração). Concomitantemente, o sistema radicular de algumas plantas (incluindo o tratamento controle absoluto) foi colocado em água destilada esterilizada (ADE) por igual período (Figura 2).

Os tratamentos controle de Pro-Ca e absoluto, para posterior verificação dos compostos fenólicos supostamente inibidos, pela técnica de HPLC, foram coletadas antes do início do processo inoculativo, com a finalidade de verificar como se comportou a síntese de compostos fenólicos imediatamente antes à inoculação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dois tratamentos (controle de Pro-Ca e absoluto), sendo que cada tratamento continha quatro repetições.



Figura 2 – Tratamentos de plântulas de citrumeleiro Swingle mantidas em água destilada esterilizada e solução de Pro-Ca (10%) a 250 ppm, respectivamente, para a inibição de compostos fenólicos

O acondicionamento, criodessecação e trituração das amostras seguiram os passos descritos no item 2.4.4.1 e a extração e detecção dos compostos fenólicos inibidos, as etapas do item 2.4.4.2.

2.4.5.2 Análise estatística dos dados

Antes da aplicação da análise de variância foram realizados os procedimentos exploratórios descritos no primeiro parágrafo do item 2.4.4.3.

Os valores de apigenina e de ácido clorogênico foram expressos em média para cada tratamento. As médias dos dados foram submetidas à análise de variância pelo uso do teste F (ZAR, 2010, SNEDECOR, 1934; FISHER; MACKENZIE, 1923) ($P = 0,01$) e para testar a probabilidade (P) de significância das diferenças entre as duas médias comparadas (as dos compostos fenólicos, provenientes dos dados numéricos paramétricos entre os dois tratamentos) foi utilizado o teste “t” de Student (1908) em amostras pareadas. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

2.4.6 Validação de um protótipo de armadilha para atração de zoósporos de *Phytophthora nicotianae* por exsudatos radiculares de porta-enxertos cítricos

2.4.6.1 Confeção das armadilhas

Os ensaios de quimiotaxia foram realizados com uma modificação do protótipo de armadilha desenvolvido por Dalio (2013) e Massola Júnior et al. (2012) que serve para a captura por adesão e posterior quantificação de zoósporos encistados de *P. nicotianae* com a utilização de exsudatos radiculares dos dois porta-enxertos cítricos adotados no presente estudo, bem como o uso de água destilada esterilizada, que serviu de constituição para o tratamento controle.

Tubos com fundo cônico do tipo Falcon (com capacidade de 50 mL) tiveram três furos laterais imediatamente antes da parte cônica (base), de onde foi encaixada a parte superior de ponteiros destinadas para uso em pipeta automática. Estas foram adaptadas e serradas (Figura 3 e 4). As ponteiros ficarão suavemente inclinadas para baixo e a distância na horizontal de uma ponteira para outra foi de 120°. Na extremidade de saída das três ponteiros também foram encaixados três tubos com fundo cônico do tipo Falcon. Nestes, por sua vez, tiveram na abertura realizada para o encaixe, a alocação da parte inferior da ponteira, justamente para facilitar o encaixe da membrana de celulose por uma leve pressão quando da montagem do conjunto.

Esse modelo de um tubo central e de três ao redor deste visa à otimização do sistema, pois a disposição dos três tubos secundários, além de servir como base de

apoio, contribuindo para a fixação da armadilha numa superfície plana, facilita o trabalho com mais amostras e tratamentos, já que neste protótipo pode-se trabalhar com vários genótipos, além do tratamento controle (água), utilizado a mesma suspensão de zoósporos.

Como o material é de plástico e resistente ao calor úmido, o mesmo foi esterilizado, em autoclave (com os procedimentos padrões de autoclavagem: 121 °C a 1 atm por 20 minutos), separadamente, e envolto em papel alumínio. Após o resfriamento do conjunto, os mesmos foram montados em câmara de fluxo laminar e levados para bancada de laboratório.

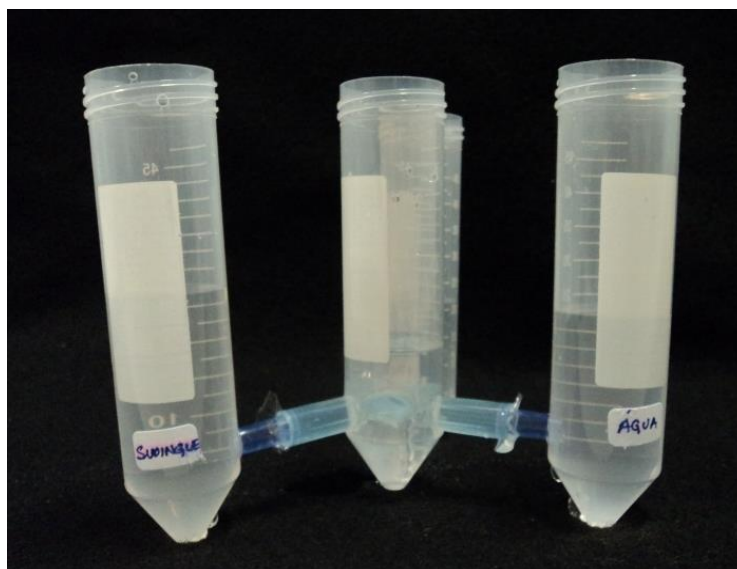


Figura 3 – Tratamentos de exsudatos radiculares de citrumeleiro Swingle, tangerineira Sunki e água destilada para a validação de um protótipo de armadilha em vista da atração de zoósporos de *Phytophthora nicotianae* (vista lateral)



Figura 4 – Tratamentos de exsudatos radiculares de citrumeleiro Swingle, tangerineira Sunki e água destilada para a validação de um protótipo de armadilha em vista da atração de zoósporos de *Phytophthora nicotianae* (vista superior)

2.4.6.2 Obtenção dos exsudatos radiculares

Para a obtenção dos exsudatos radiculares, plântulas dos dois genótipos, com seis meses de idade, foram colocadas em Erlenmeyer de 1000 mL de capacidade. Para cada cinco plantas foram utilizados 200 mL de água destilada. Os Erlenmeyer com as plantas permaneceram durante dois dias na janela do laboratório para a realização das trocas gasosas (fotossíntese, respiração celular, condutância estomática e transpiração) com a finalidade das raízes liberarem os exsudatos (DALIO, 2013). A esterilização do exsudato foi conduzida em filtro de membrana GS em éster de celulose Millipore® (0,22 μm , 47 mm de diâmetro) (GSWPO4700, EMD Millipore™, Billerica, Massachusetts, Estados Unidos da América), utilizando uma bomba de alto vácuo de pistão isento de óleo (Biomec P-730, Biomec, Araucária, Paraná, Brasil), a qual gera um vácuo máximo de 730 mmHg.

Os exsudatos foram mantidos em ultrafreezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Sanyo MPF-U333V, Sanyo Electric Co., Ltd., Moriguchi, Osaka, Japão) e antes da realização dos experimentos, os mesmos eram descongelados para a temperatura ambiente de laboratório. Em seguida, as raízes foram seccionadas do coleto, cortadas e fotografadas com câmara digital Mavica (MVC CD500, Sony Corporation, Tōkyō, Kantō, Japão) para mensuração da área radicular. Esta mensuração foi realizada

pelo processamento das imagens digitalizadas no programa Safira (Sistema de Análise de Fibras e Raízes) (versão 1.1, Laboratório de Imagem, Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, São Paulo, Brasil). Foram realizadas três leituras sucessivas para cada foto e considerou a média das observações para o cálculo da área radicular de cada genótipo.

2.4.6.3 Calibração dos exsudatos radiculares

Os resultados referentes à área radicular das plantas que foram necessárias para a extração dos exsudatos radiculares mostraram que o citrumeleiro Swingle teve maior área (72,372 cm²), enquanto que para a tangerineira Sunki, a área radicular foi de 21,659 cm². Dessa forma, para o citrumeleiro Swingle houve a necessidade de fazer o ajuste (diluição) do exsudato radicular deste genótipo, com a finalidade de fazer a correspondência à área radicular total da tangerineira Sunki para obter igual volume de exsudato. Para isso, o ajuste foi realizado pelo fator de diluição (3,34) e ambos os exsudatos radiculares ficaram na mesma concentração (DALIO, 2013).

2.4.6.4 Montagem e validação das armadilhas

Quando da realização dos ensaios, nas extremidades das ponteiros cortadas que serviram de canais de interligação entre o tubo Falcon central e os secundários foram colocados pedaços previamente cortados de tubo de diálise de membrana de celulose (D9277–100 FT, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim an der Murr, Baden-Württemberg, Alemanha), com a retenção de 12 kDa. A membrana de celulose foi escolhida com a finalidade de facilitar o fluxo de deslocamento dos exsudatos radiculares por difusão, levando em consideração a microcapilaridade do sistema.

Para isso, a fita de membrana de celulose foi cortada com cerca de 1 cm de comprimento, depois colocada em água aquecida para descolar a membrana achatada e novamente cortada ao meio para a acomodação desta no conjunto, dando uma leve pressão para o encaixe final. Para a condução do processo de transferência e de corte, utilizou-se tesoura e pinça estéreis na movimentação dos pedaços da membrana de celulose.

O protótipo foi mantido, durante todo o ensaio, em bancada de laboratório ($25,5 \pm 1$ °C e UR de $65 \pm 3\%$) pelo período de 1 h e 30 min. Nos primeiros trinta minutos foram colocados nos seus respectivos tubos, a quantidade aproximada de 25 mL de água destilada esterilizada e dos exsudatos diluído (Swingle) ou não (Sunki) e no tubo do meio foram adicionados cerca de 20 mL de água destilada estéril visando o equilíbrio da difusão. Após esse período, colocou uma alíquota da suspensão concentrada de *P. nicotianae* para que a concentração final, dentro do tubo Falcon central, ficasse em torno de 10^5 zoósporos/mL. Essa segunda etapa teve o intervalo de tempo de 1 h. Para a retirada de bolhas de ar retidas nos canais das ponteiros, quando da colocação dos líquidos, foi utilizada uma pipeta de Pasteur de plástico graduada de 3 mL (CralPlast, CRAL Artigos para Laboratório Ltda, Cotia, São Paulo, Brasil) para cada tratamento. Estas foram aquecidas e dobradas para facilitar a sucção e expulsão das bolhas de ar presentes nos canais.

Posteriormente, os tubos em que estavam alocados a parte inferior da ponteira foram desencaixados das pontas das ponteiros que estão presentes no tubo central. As membranas ficaram “grudadas” na parte inferior daqueles tubos. Depois, moldou-se na membrana de celulose, com uma lâmina de bisturi de aço carbono estéril, um círculo com cerca de 6 mm de diâmetro que, em seguida, foi retirado com muito cuidado da ponta do encaixe, com o auxílio de uma pinça flambada e resfriada ao ar. Esse círculo foi posto em cima de uma lâmina de vidro virgem e sobre ele, colocada uma lamínula. O conjunto foi vedado com esmalte incolor para a confecção da preparação microscópica permanente com a finalidade de fazer a leitura da zoosporogênese. A quantidade de zoósporos germinados presentes na membrana de celulose foi contada em microscópio de luz (Olympus CX21FS1, Olympus Optical Co., Ltd, Shenzhen, Guangdong, China), em lente de aumento de 10x.

Antes do experimento definitivo, foram realizados ensaios preliminares com o intuito de obter o tempo certo de retirada da membrana. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e para cada tratamento, utilizaram-se quatro repetições.

2.4.6.5 Análise estatística dos dados

Inicialmente, na análise estatística dos dados de atração de zoósporos foram realizadas análises exploratórias, conforme os procedimentos descritos no primeiro parágrafo do item 2.4.4.3, com a finalidade de verificar o correto atendimento aos pressupostos do modelo matemático.

Conforme as recomendações de Bartlett (1947) e Yamamura (1999) houve a necessidade de transformar os dados para $\sqrt{x+0,5}$, com a finalidade de confirmar a adequabilidade dos dados no que se refere o posterior processamento estatístico. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância (Anava) por meio do teste F (ZAR, 2010, SNEDECOR, 1934; FISHER; MACKENZIE, 1923) ($P = 0,01$), com aplicação do teste de comparações múltiplas de médias pelo método de Tukey (1953) ($P = 0,05$). Para este procedimento, utilizou-se o programa estatístico Assisat (versão 7.7) (SILVA; AZEVEDO, 2002).

2.4.7 Uso do anticorpo contra a elicítina “ α -plurivorina” no estudo do consumo de água por raízes de plântulas de tangerineira Sunki e inoculadas com *Phytophthora nicotianae*

Na condução deste experimento foi utilizado o anticorpo primário produzido contra a elicítina “ α -plurivorina” (antiga “citricolina”), proveniente de *P. plurivora* T. Jung & T.I. Burgess (antigamente essa espécie era denominada de *P. citricola* Sawada), isolada de faia-européia (*Fagus sylvatica* L.). Este anticorpo foi fornecido de forma purificada pelo grupo do pesquisador e professor Dr. Wolfgang Oßwald do Departamento de Patologia de Árvores Florestais (Fachgebiet Pathologie der Waldbäume)/Faculdade de Estudos de Ciências Florestais e Gestão de Recursos (Studienfakultät Forstwissenschaft und Ressourcenmanagement)/Centro de Ciências para Nutrição, Uso da Terra e Meio Ambiente de Weihenstephan (Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt), da Universidade Técnica de Munique (Technische Universität München), localizada em Freising-Weihenstephan, Bavária, Alemanha. O anticorpo foi testado por Fleischmann et al. (2005) e Dalio (2013), no estudo do patossistema *F. sylvatica* × *P. plurivora*.

Para isso, foram utilizadas plântulas do genótipo susceptível (tangerineira Sunki) ao ataque de *P. nicotianae*, com três meses de idade. As plântulas foram

colocadas dentro de microtubos do tipo Eppendorf (capacidade para 2 mL). Em cada Eppendorf colocou-se 1,8 mL de ADE, suspensão de zoósporos ou suspensão + anticorpo, que fizeram parte dos seguintes tratamentos: controle (ADE), plântulas inoculadas com *P. nicotianae* e *P. nicotianae* + anticorpo diluído (200 e 500 vezes), respectivamente (Figura 5). Cada tratamento constou-se de dez plântulas e cada plântula foi considerada como uma repetição. A suspensão de *P. nicotianae* foi ajustada para 10^5 zoósporos/mL. Após o processo de montagem do experimento, os microtubos, na parte superior, foram vedados com tiras de Parafilm® (PM996, Pechiney Plastic Packaging, Inc., Chicago, Illinois, Estados Unidos da América) e encaixados em suporte de plástico (tipo rack para 80 microtubos) de várias cores (Figura 5). Os suportes foram mantidos em câmara de crescimento do tipo BOD (AC71, Ação Científica, Piracicaba, São Paulo, Brasil), com as seguintes condições ambientais médias de $25,5 \pm 1$ °C e UR de 65%.

As plântulas, após a instalação experimental e a cada 24 h, foram pesadas em balança analítica e de precisão (AY220, Shimadzu do Brasil, Curitiba, Paraná, Brasil) de quatro casas decimais (0,0000 g) para a quantificação do consumo (transpiração + evaporação) de água, que foi determinado pela diferença diária das massas dos conjuntos (microtubos + tiras de Parafilm® + água + plântulas) (FLEISCHMANN et al., 2005; BELTRAME, 2010). O ensaio foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e dez repetições.

Como havia o consumo de água, esta era repostada de dois em dois dias até atingir a marcação, em alto relevo, de 2 mL no microtubo, com o auxílio de uma seringa descartável para cada tratamento. O experimento foi conduzido até o 12º dia após a instalação deste. No último dia de leitura, a reposição de água não foi realizada.

Os dados foram plotados em planilhas do programa Microsoft Excel® (versão 11.0, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, Estados Unidos da América) para a confecção dos gráficos e para a visualização dos desvios padrões (D.P.). Os procedimentos para a análise estatística deste experimento seguiram igualmente aos descritos nos dois parágrafos do item 2.4.4.3 e estão presentes na parte de Apêndices da tese.

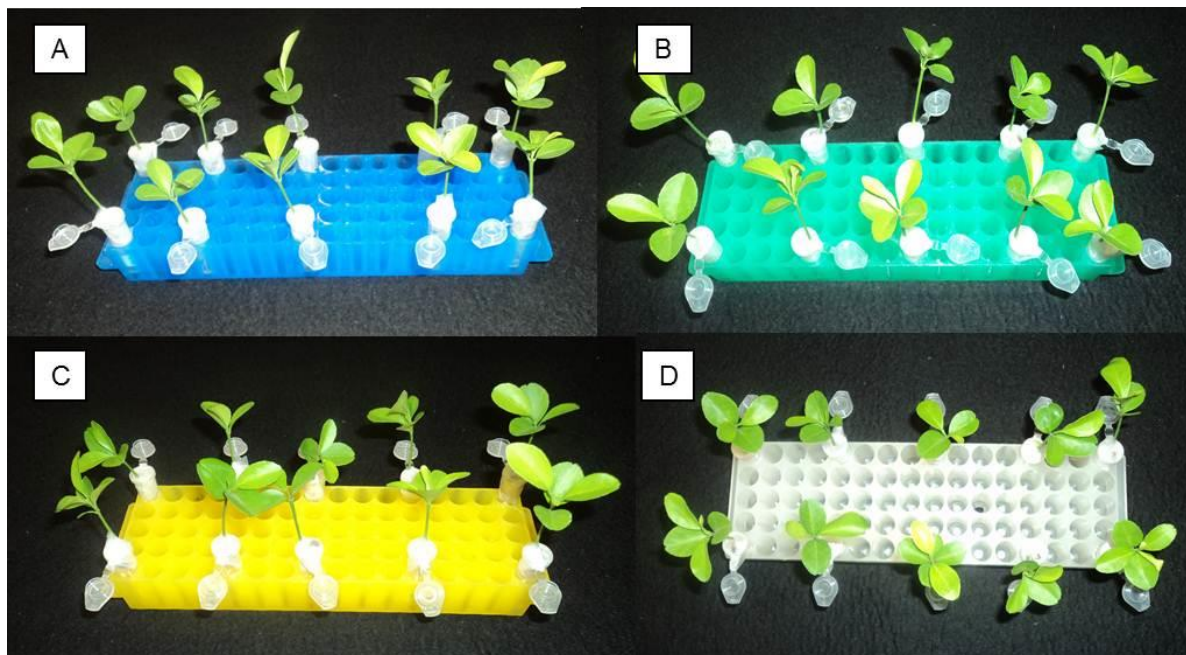


Figura 5 – Suporte de plásticos (tipo rack) com as plântulas de tangerineira Sunki tratadas com o anticorpo primário produzido contra a elicitorina “α-plurivorina”. **A:** Tratamento controle; **B:** Plântulas inoculadas com *Phytophthora nicotianae* + anticorpo contra α-plurivorina diluído 200 vezes; **C:** Plântulas inoculadas com *P. nicotianae* + anticorpo contra α-plurivorina diluído 500 vezes; e, **D:** Plântulas inoculadas com *P. nicotianae*. Fotos tiradas no dia da instalação do experimento

2.4.8 Atividade zoosporicida de compostos fenólicos (polimetoxiflavonas e flavonoides) na motilidade e germinação de zoósporos de *Phytophthora nicotianae*

2.4.8.1 Produção de zoósporos

A produção de zoósporos seguiu a metodologia descrita no item 2.4.2, com ajuste da suspensão desse estraminipila para 10^5 zoósporos/mL.

2.4.8.2 Compostos químicos

2',3'-dimetoxiflavona (2',3'-DMF), 7',8'-dimetoxiflavona (7',8'-DMF), escopoletina (ESCOP), escutelareina (ESCU), luteolintetrametoxiflavona (LTMF) e tricetinpentametoxi (TCPM) foram sintetizados e gentilmente cedido pelo Prof. Ph. D. Dieter Treutter, do Departamento de Fruticultura (Fachgebiet für Obstbau)/Faculdade de Estudos de Ciências Agrícolas e Hortícolas (Studienfakultät für Agrar- und Gartenbauwissenschaften)/Centro de Ciências para Nutrição, Uso da Terra e Meio

Ambiente de Weihenstephan (Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt), da Universidade Técnica de Munique (Technische Universität München), localizada em Freising-Weihenstephan, Bavária, Alemanha.

2.4.8.3 Bioensaios

As soluções foram preparadas em pequenas quantidades e diluídas em metanol PA, mas antes, houve a necessidade de saber o peso molecular de cada substância química. Os bioensaios para a motilidade de zoósporos e da zoosporogênese foram realizados seguindo os protocolos descritos anteriormente por Islam et al. (2002, 2004) e Islam e von Tiedeman (2008). Resumidamente, 98 µL da suspensão de zoósporos móveis (10^5 zoósporos/mL) de *P. nicotianae* foram colocadas na superfície de placas de Petri plásticas e 2 µL da solução da substância diluída em metanol na concentração apropriada (3 µM) foi adicionada diretamente sobre essa suspensão e, em seguida, homogeneizada suavemente com uma pipeta automática para que ocorra a difusão. A concentração final do conjunto (suspensão de zoósporos + substância diluída) nunca foi superior a 2% (v/v), fazendo com que o conjunto ficasse com uma concentração similar a encontrada nos citoplasmas cítricos, que é de 60 nM⁴, além de que essa concentração, em experimentos prévios, foi a condição que não afetou a motilidade e a germinação dos zoósporos encistados. Uma solução aquosa de metanol a 2% foi utilizada como controle.

A inibição (perda) da motilidade e a germinação de zoósporos encistados nos diferentes compostos químicos foram observadas sob um microscópio de luz (Olympus CX21FS1, Olympus Optical Co., Ltd, Shenzhen, Guangdong, China), em lente de aumento de 10x. O comportamento natatório e a quantificação do curso de tempo para que ocorresse a inibição de motilidade foi realizada imediatamente após a adição do composto químico na gota de suspensão e nos tempos de 15, 30, 45 e 60 min, após a instalação do experimento. Entre o início e o fim de cada contagem foi estabelecido um intervalo de 1 min. A porcentagem de germinação de zoósporos encistados foi realizada no tempo de 24 h (ISLAM et al., 2002).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e cada tratamento constou de quatro repetições. Os valores da média da porcentagem de inibição da

⁴Informações calculadas e fornecidas pessoalmente pelo Prof. Ph. D. Dieter Treutter, em 20 de novembro de 2013.

motilidade e da germinação em cada tratamento foram calculados. Os desvios padrões foram alocados ao lado dos valores da porcentagem de motilidade inibida.

Antes da aplicação da Anava foram realizadas análises exploratórias dos dados, como descrito no item 2.4.4.3 e, conseqüentemente, houve a necessidade de transformação dos dados para $\sqrt{x+0,5}$, conforme as recomendações de Bartlett (1947) e Yamamura (1999).

Após essa etapa, procedeu-se a análise de variância por meio do teste F (ZAR, 2010, SNEDECOR, 1934; FISHER; MACKENZIE, 1923) ($P = 0,01$), com aplicação do teste de comparações múltiplas de médias pelo método de Tukey (1953) ($P = 0,05$). Para este procedimento, utilizou-se o programa estatístico Assisat (versão 7.7) (SILVA; AZEVEDO, 2002).

2.4.9 Avaliação de meios de cultura no crescimento micelial e na esporulação de *Phytophthora nicotianae*

2.4.9.1 Condução e meios de cultura

Para avaliar o efeito de diversos meios de cultura na taxa de crescimento micelial diária (TCMD) e da esporulação do isolado de *P. nicotianae*, cultivou-se primeiramente o isolado durante dez dias em meio agarizado CA modificado (protocolo descrito no item 2.4.2). Após essa etapa, um disco micelial, contendo estruturas do patógeno, com 4,3 mm de diâmetro, e obtido das margens das colônias do isolado, foi transferido para o centro de novas placas de Petri, contendo os diversos meios de cultura.

Os meios utilizados foram: BDA (Batata–Dextrose–Ágar) (Batatas descascadas e cortadas: 200 g; Dextrose: 20 g; Ágar: 17 g; Água destilada: 1000 mL) (RIKER; RIKER, 1936); CA (Cenoura–Ágar) (descrito anteriormente no item 2.2.2); suco V8[®]–CaCO₃–Ágar não clarificado [V8[®] 100% Vegetable Juice (Campbell Soup Co., Camden, New Jersey, Estados Unidos da América): 200 mL; CaCO₃: 3 g; Ágar: 20 g; Água destilada: 800 mL] (DIENER, 1952; MILLER, 1955; LINDERMAN, 1974); AA (Aveia–Ágar) (Aveia em flocos: 75 g; Ágar: 20 g, Água destilada: 1000 mL) (GOODING; LUCAS, 1959); e, Czapek–Dox–Ágar (Sacarose: 30 g; KH₂PO₄: 1

g; NaNO₃: 2 g; MgSO₄.7H₂O: 0,5 g; KCl: 0,5 g; FeSO₄.7H₂O: 0,01 g; Ágar: 15 g; Água destilada: 1000 mL (CZAPEK, 1902; DOX, 1909, THOM; CHURCH, 1926).

As placas foram colocadas em câmara de crescimento do tipo BOD (AC71, Ação Científica, Piracicaba, São Paulo, Brasil) durante seis dias, com fotoperíodo de 24 h, sob as condições ambientais de 25 ± 1 °C e UR de $65 \pm 5\%$.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com 10 repetições/meio de cultura.

2.4.9.2 Avaliação do crescimento e da esporulação

A avaliação do crescimento micelial das colônias foi realizada diariamente (a cada intervalo de 24 horas) após a montagem do experimento. As medições dos diâmetros ocorreram em dois sentidos diametralmente opostos (em mm), com o auxílio de um paquímetro digital (100.174BL, Digimess, São Paulo, São Paulo, Brasil), obtendo-se o diâmetro médio diário do isolado para cada repetição. A leitura foi realizada até o dia em que pelo menos uma repetição atingiu os bordos das placas (isso aconteceu aos seis dias de cultivo após a instalação do experimento), mas para efeito de cálculo da TCMD, considerou-se até os dados de leitura do dia anterior, para que não houvesse comprometimento na estimativa da TCMD, uma vez que os dados desse último dia poderiam causar influência negativa na estimação dos parâmetros da equação da reta⁵. Em todas as avaliações, descontou-se dos valores obtidos, o diâmetro do disco inicialmente depositado no centro da placa.

A esporulação nos diferentes meios foi estimulada a partir do último dia de leitura do crescimento micelial. Em cada placa, foram adicionados 20 mL de ADE em toda a superfície do meio para estimular a formação de material micélico do “fungo” e de clamidósporos, pelo período de 36 h. A ADE (20 mL) foi trocada de 24 h em 24 h para acelerar o processo de formação destas estruturas. Após esse período, a ADE foi removida das placas, assepticamente, com uma pipeta plástica estéril, sendo substituído por mais 20 mL de ADE, durante o intervalo de tempo de 36 h, com a finalidade dos clamidósporos formarem esporângios. Dessa forma, a

⁵Por exemplo: Se no dia anterior (5º dia), determinada repetição tinha 85,50 mm e as observações para essa repetição, eram de crescimento diário, em média de 16,00 mm, ao longo de todo o experimento e, que no último dia atingiu a borda da placa (90 mm), o crescimento teórico, após essas 24 h, foi de 5 mm. O que evidencia, nessa última leitura e específica repetição, um crescimento micelial irreal para o “fungo”.

obtenção da suspensão de zoósporos foi diferente em alguns passos da metodologia descrita no item 2.2.2. Em seguida, os zoósporos foram quantificados em hemocítmetro, com cinco repetições por tratamento. Para a estimativa de zoósporos/mm², considerou-se os dados de leitura do diâmetro do crescimento micelial daquele último dia, com a finalidade de calcular a área final [$A = (\pi \times \varnothing^2)/4$]. Para aquelas repetições que “fecharam” toda a placa de Petri, o valor da esporulação total foi estimado para a área total da placa de 9 cm (90 mm) de diâmetro. Os dados desse último dia foram aqueles descartados na parte da estimativa do TCMD.

2.4.9.3 Análise estatística dos dados

Os diâmetros médios do crescimento radial (mm) em cada momento da medição (dia) foram plotados e a TCMD (mm/dia) de cada repetição foi calculada pela estimativa do parâmetro “*b*” (coeficiente angular) da equação da reta [inclinação da reta de regressão linear simples ($y = a + b.x$)], tendo o tempo (em dias) após a instalação do experimento como variável independente e a leitura do crescimento micelial diário como variável dependente (FERREIRA; WEBSTER, 1975; DANTIGNY et al., 2005), usando a versão 11.0 do programa Microsoft Excel® (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, Estados Unidos da América) (BAERT et al., 2008). A homogeneidade dos declives das linhas de regressão linear foi testada usando a análise de covariância, bem como uma análise de linha paralela. O coeficiente de determinação (R^2) e as parcelas de resíduos padronizados *versus* os valores previstos a partir da análise de regressão foram utilizados para avaliar a qualidade do ajuste ao modelo linear utilizado nesse experimento (CABANILLAS; JONES, 2009).

Antes da aplicação da Anava foram realizadas análises exploratórias, para os dados em estudo, com a finalidade de verificar o correto atendimento aos pressupostos do modelo matemático, tais como a normalidade de distribuição dos resíduos (W) e dos dados (D), respectivamente (SHAPIRO; WILK, 1965; LILLIEFORS, 1967), a homogeneidade de variâncias entre os tratamentos [homoscedasticidade (Q)] (BURR; FOSTER, 1972), a aditividade do modelo (TUKEY, 1949) e a análise da independência dos erros/resíduos aleatórios (FISHER, 1925; PARENTE, 1984), além do teste de Durbin e Watson (d) (1950; 1951) para

verificar a independência (presença de autocorrelação) dos resíduos da análise de regressão. Todos os testes foram aplicados ao nível de $P \leq 0,5$.

Os dados de esporulação foram transformados para $\sqrt{x+0,5}$, conforme as recomendações de Bartlett (1947) e Yamamura (1999). Em seguida, os dados de TCMD e de esporulação foram submetidos à análise de variância por meio do teste F (ZAR, 2010, SNEDECOR, 1934; FISHER; MACKENZIE, 1923) ($P = 0,01$), com aplicação do teste de comparações múltiplas de médias pelo método de Tukey (1953) ($P = 0,05$). Para este procedimento, utilizou-se o programa estatístico Assistat (versão 7.7) (SILVA; AZEVEDO, 2002).

2.4.10 Avaliação da qualidade da luz no crescimento micelial e na esporulação de *Phytophthora nicotianae*

2.4.10.1 Condução e meios de cultura

Os passos iniciais para este experimento seguiram os procedimentos descritos no primeiro parágrafo do item 2.4.9.1. Os meios de cultura foram substituídos pelos tratamentos listados a seguir.

O isolado foi repicado para o centro de placas de Petri contendo o meio CA e incubados sob diferentes espectros de radiação luminosa, proporcionados pelas lâmpadas lineares fluorescentes coloridas. As placas permaneceram a cerca de 30 cm das lâmpadas, conforme preconizado por Leach (1962), assim como os tratamentos controle (claro), onde as placas de Petri foram submetidas à presença de lâmpada fluorescente comum e do tratamento escuro, em que as placas de Petri foram colocadas em câmara de crescimento sem a alocação de quaisquer lâmpadas.

Os dados da distribuição espectral de energia das lâmpadas fluorescentes coloridas e das medidas de iluminância (fluxo luminoso incidente por unidade de área iluminada) para cada fonte de radiação foram retirados da dissertação de mestrado de Pulz (2007).

As placas foram colocadas em câmara de crescimento do tipo BOD (AC71, Ação Científica, Piracicaba, São Paulo, Brasil) durante seis dias, com fotoperíodo de 24 h, com as mesmas condições ambientais do experimento anterior.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com seis tratamentos {controle [lâmpadas fluorescentes brancas de 20 W (modelo Duramax, General Electric Lighting, Budapeste, Hungria Central, Hungria)]; escuro (BOD sem a presença de lâmpadas); verde [lâmpadas fluorescentes verdes de 20 W (modelo T8, Gld Ecolume, São Paulo, São Paulo, Brasil)]; azul [lâmpadas fluorescentes azuis de 20 W (modelo T8, Gld Ecolume)]; amarelo [lâmpadas fluorescentes amarelas de 20 W (modelo T8, Gld Ecolume)] e vermelho [lâmpadas fluorescentes vermelhas de 20 W (modelo T8, Gld Ecolume)]}. Cada tratamento teve dez repetições.

2.4.10.2 Avaliação do crescimento e esporulação

O procedimento para as avaliações deste experimento seguiu igualmente aos passos descritos no item 2.4.9.2. A obtenção da suspensão de zoósporos seguiu os passos da metodologia descrita no item 2.4.9.2. Neste experimento, para a estimativa de zoósporos/mm², a quantidade de repetições foi de cinco por tratamento.

2.4.10.3 Análise estatística dos dados

O procedimento para a análise estatística deste experimento seguiu igualmente ao descrito no item 2.4.9.3. Não houve transformação dos dados de esporulação.

2.5 Resultados e discussão

2.5.1 Detecção de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência

Os cromatogramas do HPLC das amostras de raízes de plântulas de tangerineira Sunki e de citrumeleiro Swingle não inoculadas e inoculadas com *P. nicotianae* revelaram a presença de diversos compostos fenólicos, muitos deles desconhecidos (Figura 6). Entretanto, a composição quantitativa dos equivalentes dos compostos fenólicos apigenina e ácido clorogênico não foram significativamente

diferentes entre as raízes de plântulas não inoculadas (controle) e inoculadas de ambos os genótipos nos dois tempos de coleta (Tabela 1).

A ausência de diferenças na composição quantitativa dos equivalentes de compostos fenólicos para ambos os genótipos sugere que o processo infeccioso desencadeado por *P. nicotianae* não conseguiu induzir a produção desses compostos nas raízes de plântulas de citrumeleiro Swingle e de tangerineira Sunki, nos tempos em estudo, apesar de que os equivalentes de apigenina fosse mais que o dobro encontrado para o tempo 4 dias, em raízes de citrumeleiro Swingle, quando comparado aos 2 dias de coleta. Resultados semelhantes foram obtidos por Beltrame (2010) e por Escanferla (2011) que não encontraram alterações significativas na concentração de fenóis totais e desses dois compostos fenólicos, respectivamente, em plântulas não inoculadas e inoculadas com *P. nicotianae* de citrumeleiro Swingle e de tangerineira Sunki.

Tabela 1 – Composição quantitativa de compostos fenólicos de raízes (mg/g matéria seca) calculados como equivalentes em apigenina e ácido clorogênico dos genótipos cítricos citrumeleiro Swingle e tangerineira Sunki, não inoculados (tratamento controle) e inoculados com *Phytophthora nicotianae*, aos 2 e 4 dias de coleta após a inoculação

Tratamentos	Apigenina		Ácido clorogênico	
	2 dias	4 dias	2 dias	4 dias
Citrumeleiro Swingle controle	4,61 Aa*	9,85 Aa	3,21 Aa	4,09 Aa
Citrumeleiro Swingle inoculado	7,70 Aa	7,22 Aa	2,33 Aa	3,56 Aa
Tangerineira Sunki controle	12,15 Aa	13,27 Aa	0,69 Aa	0,56 Aa
Tangerineira Sunki inoculado	12,59 Aa	9,05 Aa	0,35 Aa	0,30 Aa

*Médias seguidas pela mesma letra na linha e na coluna, para cada cada composto fenólico, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Todavia, constatou-se diferenças qualitativas na composição dos compostos fenólicos entre esses dois genótipos, principalmente após 10 minutos de eluição das amostras (Figura 6). Com a integração desses picos, os compostos fenólicos analisados no canal de fluorescência de 280 nm foram calculados como equivalentes em apigenina e ácido clorogênico (Tabela 1).

Assim, para raízes de plântulas de citrumeleiro Swingle, alguns picos referentes a compostos fenólicos mais apolares foram determinados após esse a passagem desse tempo, mostrando que esse genótipo possui composição fenólica qualitativamente diferente de raízes de plântulas de tangerineira Sunki, pois a presença de apigenina foi bem maior em tangerineira Sunki inoculada que em raízes não inoculadas. O contrário, para ácido clorogênico foi observado em raízes de citrumeleiro Swingle não inoculado, pois a presença foi bem maior neste genótipo que na tangerineira Sunki.

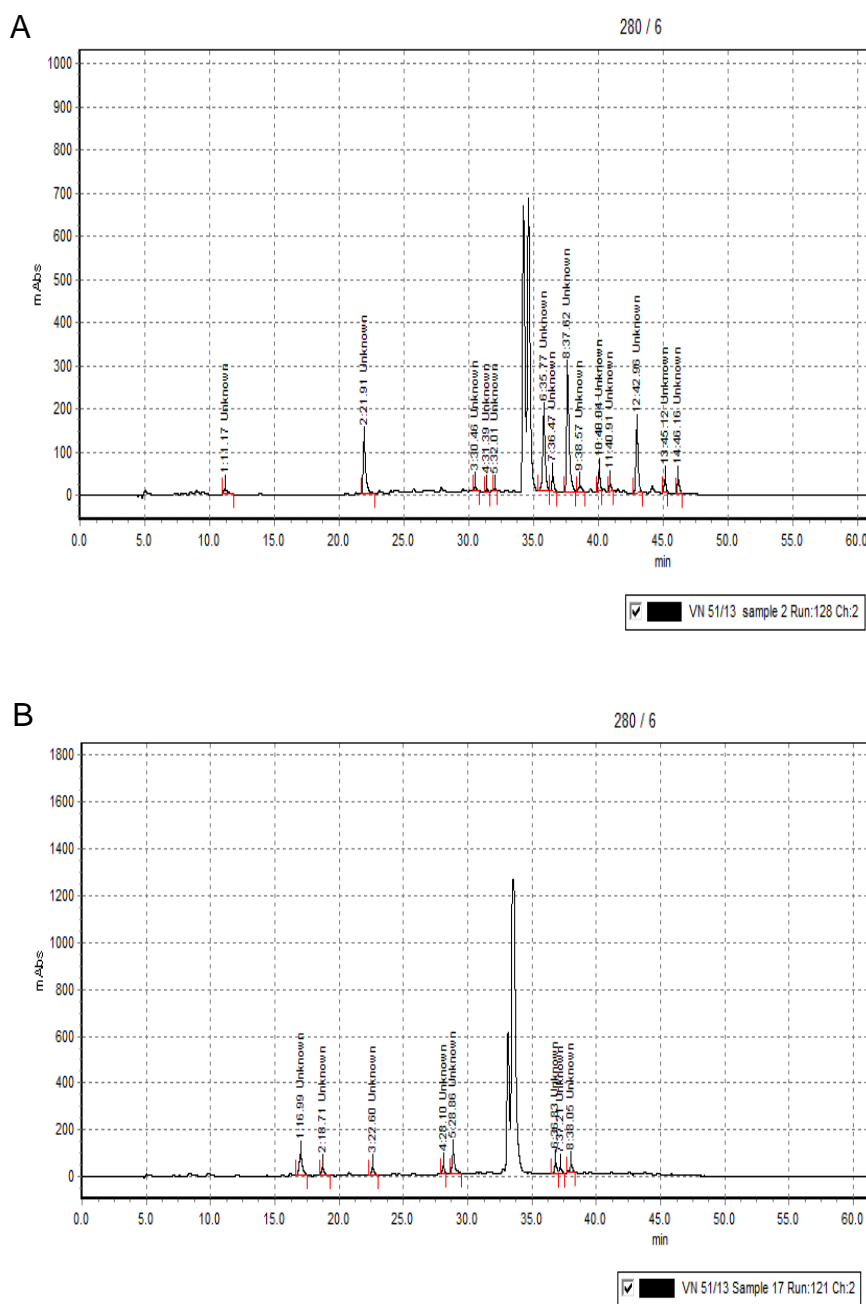


Figura 6 – Cromatogramas gerados pelo HPLC do extrato metanólico de raízes não inoculadas de plântulas de (A) citrumeleiro Swingle e de (B) tangerineira Sunki. Nos picos estão a presença de apigenina e ácido clorogênico

2.5.2 Inibição da síntese de compostos fenólicos através do tratamento das raízes com Prohexadione-Ca e detectados pela técnica HPLC

O resultado do HPLC das amostras de raízes de plântulas do citrumeleiro Swingle tratadas com água (controle) e Pro-Ca está representado na Tabela 2. Todavia, a composição quantitativa dos equivalentes em compostos fenólicos não foi

significativamente diferente entre raízes de plântulas tratadas com água e Pro-Ca (Tabela 2).

A ausência de diferença na composição quantitativa de equivalentes de compostos fenólicos para ambos os genótipos indica que o processo infeccioso desencadeado por *P. nicotianae* não induziu a produção desses equivalentes em raízes de plântulas de citrumeleiro Swingle no tempo estudado, apesar das plântulas tratadas com Pro-Ca apresentar um pico mais elevado de apigenina e um menor para o ácido clorogênico.

Tabela 2 – Composição quantitativa de compostos fenólicos de raízes (mg/g matéria seca) calculados como equivalentes em apigenina e ácido clorogênico do genótipo cítrico citrumeleiro Swingle tratado com água e Pro-Ca

Tratamentos	Apigenina	Ácido clorogênico
Citrumeleiro Swingle (Água)	10,16 a	6,08 a
Citrumeleiro Swingle (Pro-Ca)	10,65 a	5,23 a

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, para cada cada composto fenólico, não diferem significativamente entre si pelo teste t de Student a 5% de probabilidade.

2.5.3 Validação de um protótipo de armadilha para atração de zoósporos de *Phytophthora nicotianae* por exsudatos radiculares de porta-enxertos cítricos

De acordo com a análise estatística, houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 3). O tratamento que atraiu o maior número de zoósporos foi o exsudato radicular da tangerineira Sunki. Por sua vez, a água foi aquele tratamento que atraiu o menor número de zoósporos (ou quase nada), seguido do exsudato do citrumeleiro Swingle. A adesão, o encistamento, a germinação e posteriormente, a formação do tubo germinativo dos zoósporos de *P. nicotianae* podem ser observadas na Figura 7.

Os resultados deste trabalho correlacionaram com os encontrados por Botha, Wehner e Kotzé (1989, 1990a, b), que pesquisaram um novo método e um já existente de *screening* para a tolerância de raízes de abacateiro, com idade de 10–14 meses, mantidas em *seedlings*, ao ataque de *P. cinnamomi*. Os autores observaram que a variedade tolerante do tipo selvagem de abacateiro (*P. schiedeana* Nees) (seleção G755), seguida das variedades consideradas como moderadamente tolerante (G6 e Duke 7) foram as que menos atraíram zoósporos de

P. cinnamomi em relação a cultivar susceptível (Edranol). Neste tipo de experimento, os autores conseguiram distinguir os genótipos susceptíveis do tolerante.

Tabela 3 – Zoósporos encistados de *Phytophthora nicotianae* submetidos à atração de exsudatos radiculares de genótipos cítricos por meio da técnica de diálise de membrana de celulose pelo período de 1 h 30 min

Tratamento	Número de zoósporos encistados ¹
Água	1,50 c*
Citrumeleiro Swingle	228,0 b
Tangerineira Sunki	769,0 a

¹Médias originais de quatro repetições. Para efeito de análise estatística, os valores foram transformados para $\sqrt{x + 0,5}$.

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

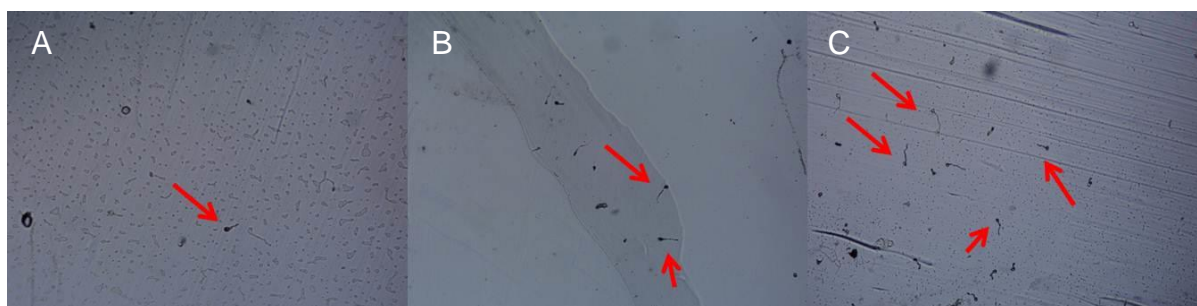


Figura 7 – Microfotografia mostrando a adesão, encistamento, germinação e tubo germinativo dos zoósporos de *Phytophthora nicotianae* em membrana de celulose (diálise). Setas indicam o zoósporo germinado. **A:** Água; **B:** Swingle; e, **C:** Sunki

Botha e Kotzé (1989) constataram que determinados aminoácidos (como o ácido glutâmico, ácido aspártico e arginina) foram mais abundantes nas plantas susceptíveis, assim como o somatório total de aminoácidos liberados por esses genótipos. Ademais, os aminoácidos listados anteriormente foram responsáveis pela maior atração do patógeno a membrana de celulose, que serviu de anteparo para o fluxo de exsudatos radiculares.

Marais e Hattingh (1985) também observaram interações semelhantes entre raízes de variedades de videiras (*Vitis vinifera* L.) e *P. cinnamomi*. O fungo foi mais atraído pelas raízes da variedade susceptível 99 Richter do que raízes de 143 B Mgt (tolerante). De acordo com os autores, os exsudatos radiculares desprendidos por 99 Richter continha concentrações mais elevadas de ácido glutâmico e arginina que exsudatos liberados de raízes de 143 B Mgt e da cultivar tolerante Jacquez. Nesse

caso, o índice quimiotático de atração de zoósporos aumentou com concentrações crescentes de ácido glutâmico, arginina e ácido aspártico, outro aminoácido estudado.

Em muitas espécies de *Phytophthora*, os zoósporos nadam quimiotaxicamente em direção aos compostos liberados pelas raízes de suas plantas hospedeiras e quando os zoósporos têm a capacidade de nadar, esse fator aumenta a chance deles iniciarem a doença, porque a quimiotaxia e a eletrotaxia têm o poder de atraí-los para os locais de infecção (GOW, 2004; TYLER, 2002).

De acordo com Cameron e Carlile (1977), os zoósporos normalmente se deslocam em direção a planta, mas especificamente ao exsudato radicular, através de uma resposta quimiotática (fenômeno denominado, nesse caso, de quimiotaxia positiva, que vem a ser a atração de zoósporos pelo exsudato, com posterior adesão e encistamento destes nas raízes). Mas no caso do presente experimento, os zoósporos ficaram retidos na membrana de celulose. Pode-se inferir que o maior encistamento de zoósporos na tangerineira Sunki ocorreu, pelo fato de haver uma maior afinidade do “fungo” por este exsudato e pela maior liberação de açúcares e aminoácidos presentes no genótipo. Isso levou a uma maior adaptação do fungo ao longo da coevolução do patógeno com o hospedeiro.

Oßwald et al. (2014) destacam que a quimiotaxia de zoósporos de *Phytophthora* por exsudatos radiculares desempenha um papel fundamental no reconhecimento de hospedeiro, bem como na infecção e pode ter uma influência sobre a gama de hospedeiros.

Este é um teste que pode ser utilizado para diferenciar o grau de resistência dos diversos genótipos de citros em estudo, dando uma ideia rápida e simplificada da susceptibilidade ou resistência desses genótipos a *P. nicotianae*, pois a dedução de que o maior número de zoósporos encistados é decorrente da atratividade de exsudatos radiculares de genótipos susceptíveis.

2.5.4 Uso do anticorpo contra a elicítina “ α -plurivorina” no estudo do consumo de água por raízes de plântulas de tangerineira Sunki e inoculadas com *Phytophthora nicotianae*

Este experimento, envolvendo plântulas de tangerineira Sunki, apresentou resultados diferenciados para os tratamentos, uma vez, que houve redução no

consumo de água quando da inoculação de plântulas com *P. nicotianae* e tratadas com o anticorpo primário contra a α -plurivorina. A Figura 8 apresenta uma visão geral de consumo de água. Uma análise visual isolada indicou que o sistema radicular de plântulas de tangerineira Sunki também foi afetado por *P. nicotianae* (dados não mostrados). O apêndice A apresenta a análise estatística do consumo de água. Os dados entre si não se diferem muito. O tratamento das plântulas com o anticorpo teve resultados medianos no controle da doença, quando comparados com os tratamentos de extremos (controle e *P. nicotianae*) (Figura 8; Apêndice A).

Observa-se, de maneira geral, que o maior consumo de água ficou para o tratamento controle, uma vez que a planta realizava a água para o seu metabólito, em consequência disso, acabava adquirindo biomassa. Por outro lado, o tratamento Pn + 200, teve uma ligeira queda no consumo efetivo, porém os dados se aproximam do tratamento controle. Em relação ao tratamento Pn + 500, em alguns dias, os valores equivaleram ao inoculado. Para esses dois tratamentos com a presença do anticorpo, supõe-se que houve o fechamento estomacal das folhas, como medida de defesa da planta. Para o inoculado, o resultado foi mais drástico, com a morte de algumas plântulas.

Nos primeiros dias do experimento, o consumo de água foi quase equivalente para todos os tratamentos. Isso dá uma ideia de que o “fungo” estava em início do processo de infecção. Com o passar do tempo, observa-se que quando há efetivamente o estabelecimento deste processo, decresce o consumo de água pelos tratamentos onde o “fungo” está presente. Porém a situação é mais crítica, naquele em que há somente *P. nicotianae*.

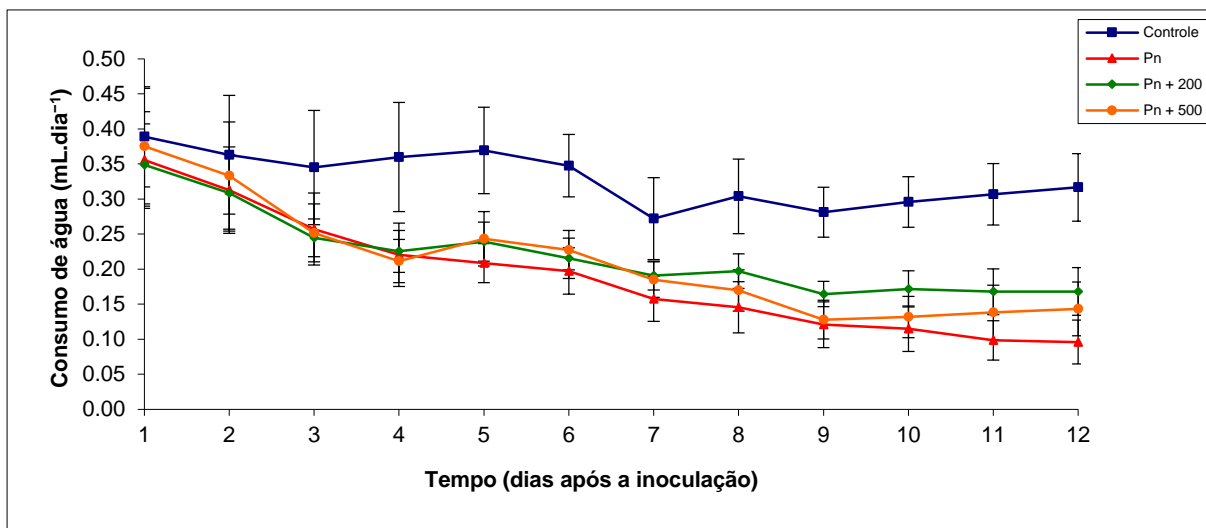


Figura 8 – Visão geral da média do consumo de água de plântulas de tangerineira Sunki, submetidas aos diversos tratamentos com o anticorpo primário contra a elicitorina “ α -plurivorina”, ao longo de 12 dias após a inoculação. As barras indicam o desvio padrão da média ($n = 10$)

Deve-se partir do pressuposto que uma planta sadia tem a necessidade de que todas as suas células recebam água, nutrientes e minerais para que a mesma possa realizar as suas funções fisiológicas habituais. Do contrário, as plantas doentes apresentam o seu metabolismo alterado e os fitopatógenos podem alterar a circulação ascendente da água (STANGARLIN; LEITE, 2008).

Beltrame, Brand e Pascholati (2009) e Beltrame (2010) verificaram que plântulas de tangerineira Sunki (o mesmo porta-enxerto utilizado neste experimento) apresentaram redução significativa de 30% no consumo de água a partir do quinto dia após a inoculação de *P. nicotianae*. Os autores concluíram que *P. nicotianae* além de alterar o balanço hormonal (aumento na produção de etileno) também compromete as relações hídricas em plântulas de tangerineira Sunki. Por outro lado, não foram observadas alterações para plântulas de citrumeleiro Swingle, indicando que este genótipo é mais resistente nas respostas a estas variáveis ecofisiológicas.

De acordo com Beltrame et al. (2004), plantas de faia, quando infectadas por *P. citricola*, antes dos sintomas de clorose e de necrose tornarem-se visíveis, tiveram a taxa fotossintética, a transpiração e o consumo de água reduzidos, indicando a existência de algum sinal molecular enviado até as folhas, para a indução do fechamento estomático, evidenciando um mecanismo de defesa das plantas sob o estresse da ação infectiva e de colonização do patógeno.

Para Nobel (2005), menores aberturas estomáticas levam a uma redução na taxa de transpiração, em consequência, aumenta a temperatura dos tecidos,

afetando significativamente a fotossíntese. Em adição a essa premissa, a regulação estomática da transpiração representa um mecanismo de preservação de água em situações de baixa disponibilidade hídrica (MEDINA; MACHADO; GOMES, 1999). Beltrame et al. (2004) e Fleischmann et al. (2005) mostraram que plântulas de faia-européia, inoculadas com *P. citricola*, reduziram o consumo de água já no segundo dia após a instalação do experimento, sendo que essa redução foi mais significativa a partir do sexto dia após a inoculação. Para Beltrame et al. (2004), essa redução no consumo de água, evidencia a síntese de alguma toxina pelo patógeno.

Na Figura 9 (A, B, C e D), observa-se o ajuste das retas de consumo de água e seus respectivos coeficientes de determinação. Os tratamentos controle e Pn ajustaram ao modelo polinomial. Por sua vez, o tratamento Pn + 200 e Pn + 500 ajustaram-se ao modelo logarítmico.

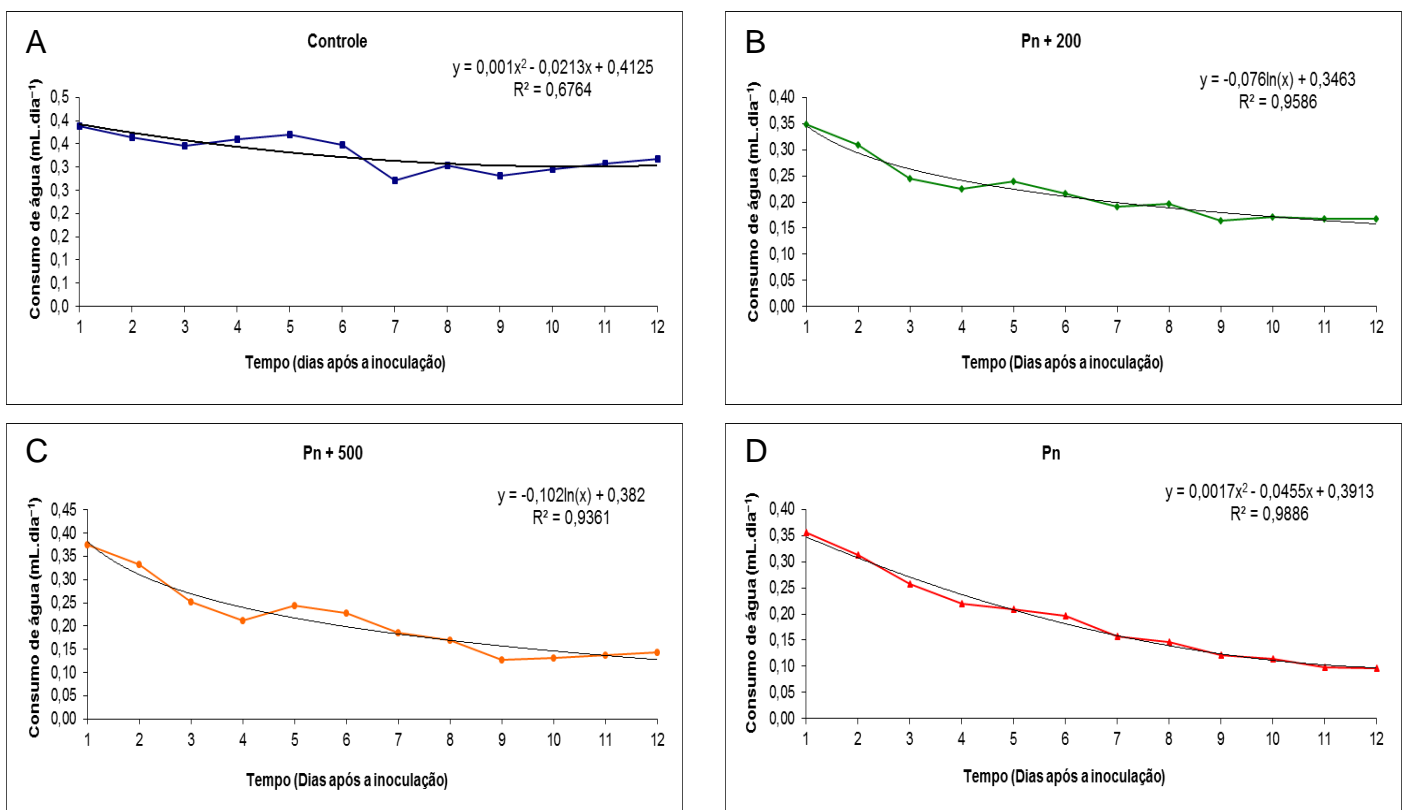


Figura 9 – Ajuste das retas de consumo de água e coeficientes de determinação de plântulas de tangerineira Sunki, submetidas aos diversos tratamentos com o anticorpo primário contra a elicítina “ α -plurivorina” ao longo de 12 dias. **A:** Tratamento controle; **B:** Plântulas inoculadas com *Phytophthora nicotianae* + anticorpo contra α -plurivorina diluído 200 vezes; **C:** Plântulas inoculadas com *P. nicotianae* + anticorpo contra α -plurivorina diluído 500 vezes; e, **D:** Plântulas inoculadas com *P. nicotianae*.

Portanto, os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que *P. nicotianae* primeiramente faz a danificação do sistema radicular de tangerineira Sunki, comprometendo a absorção de água pelas raízes. Em consequência disso, as relações hídricas são afetadas ao longo dos dias, uma vez que ocorre o fechamento estomático das folhas por causa da absorção irregular de água pelo sistema radicular das plantas infectadas por *P. nicotianae* e daqueles tratamentos que contém a citricolina nas diversas concentrações estudadas.

2.5.5 Atividade zoosporicida de compostos fenólicos (polimetoxiflavonas e flavonoides) na motilidade e germinação de zoósporos de *Phytophthora nicotianae*

A atividade antifúngica das polimetoxiflavonas e flavonoides estudados neste trabalho contra *P. nicotiane* está representada na Tabela 4. A motilidade de *P. nicotianae* foi 100% paralisada pelos compostos escopoletina e tricetinpentametoxi, além de apresentar menores porcentagens de zoósporos germinados. Por outro lado, os compostos 2',3-dimetoxiflavona e luteolintetrametoxiflavona proporcionaram as maiores taxas de germinação.

O controle (metanol), 2',3-dimetoxiflavona, 7',8'-dimetoxiflavona e luteolintetrametoxiflavona fizeram com que os zoósporos nadassem normalmente na primeira observação. A escutelareina agiu de forma interessante no comportamento natatório dos zoósporos, fazendo com que eles nadassem muito lentamente até os 30 min, além de apresenta uma particularidade. Os zoósporos tinham movimentos bruscos de parada.

Tabela 4 – Comportamento natatório, porcentagem da inibição da motilidade e atividade zoosporicida de compostos químicos (flavonoides/polimetoxiflavonas) contra o patógeno *Phytophthora nicotianae*

Compostos ¹	Inibição da motilidade (% ± D.P.)					GERM (%) ²
	0–1 min	15 min	30 min	45 min	60 min	
CONTR	Nadando normalmente	Nadando normalmente	Nadando normalmente	Nadando normalmente	28 ± 9	65,25 ab*
2',3'-DMF	Nadando normalmente	Nadando normalmente	Nadando normalmente	38 ± 4	56 ± 5	74,25 a
7',8'-DMF	Nadando normalmente	65 ± 3	49 ± 6	71 ± 7	92 ± 6	55,00 bc
ESCOPE	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	25,00 d
ESCU ³	Zoósporos muito lentos	Zoósporos muito lentos	65 ± 3	87 ± 7	100 ± 0	53,00 c
LTMF	Nadando normalmente	41 ± 7	62 ± 6	69 ± 3	81 ± 5	64,75 ab
TCPM	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	22,5 d

¹Compostos (tratamentos): CONTR [Controle (Metanol)]; 2',3'-DMF (2',3-dimetoxiflavona); 7',8'-DMF (7',8'-dimetoxiflavona); ESCOPE (Escopoletina); ESCU (Escutelareina); LTMF (Luteolintetrametoxiflavona); e, TCPM (Tricetinpentametoxi).

²GERM (Germinação).

³Zoósporos estavam se movendo muito lentamente em círculo apertado e apresentando movimentos bruscos de parada.

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O forte efeito antifúngico acima descrito de alguns compostos flavonoides (escopoletina e tricetinpentametoxi) contra *P. nicotianae* pode explicar, em parte, o elevado grau de resistência natural do porta-enxerto Swingle contra este fungo, uma vez que na cromatografia (HPLC), alguns compostos de cadeia similares foram encontrados, corroborando os resultados encontrados nesse trabalho. Uma das funções presentes nos flavonoides e polifenóis é o seu papel na proteção das plantas contra a invasão de micro-organismos. Isto não só diz respeito em relação a sua presença natural em plantas como agentes constituintes, mas também, em relação a sua acumulação como fitoalexinas, em resposta ao ataque microbiano, atuando como agentes antifúngicos, antibacterianos ou antivirais (GRAYE; HARBORNE, 1994, HARBORNE, 1999).

Harborne e Williams (2000) propõem que os compostos fenólicos podem desempenhar um papel protetor das partes da planta contra o ataque fitopatogênico, devido à habilidade dos fenóis em inibir, principalmente, a germinação de esporos fúngicos. O que pode explicar, em partes, os resultados encontrados no presente trabalho, pois esses compostos fenólicos impediram, em diversos níveis, a germinação dos zoósporos de *P. nicotianae*.

2.5.6 Avaliação de meios de cultura no crescimento micelial e na esporulação de *Phytophthora nicotianae*

O resultado do efeito de meios de cultura no crescimento micelial e na esporulação de *P. nicotianae* está representado na Tabela 5. Observa-se que os meios CA, AA e V8–CaCO₃–Ágar influenciaram positivamente no crescimento e na esporulação deste isolado, ao proporcionar as maiores taxas de crescimento micelial, assim como os maiores valores de zoósporos/mm², com exceção do meio AA, que teve menos zoósporos quando comparado com Czapek–Dox–Ágar.

Destacaram-se os grupos formados pelos meios CA, AA e V8–CaCO₃–Ágar, evidenciando sempre os maiores crescimentos nos dois primeiros meios. Por outro lado, os menores crescimentos foram observados nos meios Czapek–Dox–Ágar e BDA, respectivamente.

Os coeficientes de determinação (R^2), que é uma medida de ajustamento de um modelo estatístico linear generalizado, como o da regressão linear, em relação aos valores observados (leitura diária do crescimento micelial x dias), de todas as repetições foram altamente correlacionados, situando entre 0,955 a 1,00, o que demonstra que a regressão linear e o parâmetro “*b*” da equação da reta são bons estimadores da TCMD (dados não mostrados).

Tabela 5 – Crescimento micelial e esporulação de *Phytophthora nicotianae* em meios de cultura agarizados a 25 ± 1 °C

Tratamento	TCMD (mm.dia ⁻¹) ¹	Esporulação (zoósporos.mm ⁻²) ²
CA ³	14,92 b*	989,37 a
AA ⁴	17,32 a	45,96 bc
V8–CaCO ₃ –Ágar ⁵	14,11 b	984,04 a
Czapek–Dox–Ágar	2,36 d	252,09 b
BDA ⁶	5,18 c	0 c

¹Médias de dez repetições.

²Médias originais de cinco repetições. Para efeito de análise estatística, os valores de esporulação foram transformados para $\sqrt{x+0,5}$.

³Cenoura–Ágar.

⁴Aveia–Ágar.

⁵Suco V8–CaCO₃–Ágar.

⁶Batata–Dextrose–Ágar.

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Dentre os meios testados, o AA é o mais rico em carbono por ser composto majoritariamente de amido (uma importante fonte de carboidrato). Várias fontes de carbono são utilizadas para suplementar os meios de cultivo para fungos, como frutose, maltose, sacarose, além da glucose (conhecida também como dextrose) que está presente na composição do meio BDA. Este meio de cultura é considerado um meio de rotina e é geralmente usado na maioria dos laboratórios de micologia.

Apesar do meio de Aveia–Ágar proporcionar as maiores TCMD, ele é um meio difícil de trabalhar porque, no processo de esterilização, quando os frascos de vidro, comumente os dos modelos Schott Duran[®] (marca Schott AG, Mainz, Rhineland-Palatinate, Alemanha) ou Erlenmeyers são usados, com a deposição do conteúdo do meio até a marcação tradicional utilizada para os outros meios, o AA, durante o processo de autoclavagem acaba por “sujar” a tampa e o tampão de algodão ou, às vezes, vaza para a cesta e o fundo do aparelho de autoclavagem. Deve-se tomar o cuidado no momento da distribuição do conteúdo nessas vidrarias laboratoriais. Outra desvantagem desse pouco conteúdo é que esse meio consome bastante material de vidraria, uma vez que o pouco conteúdo depositado para a esterilização exige desnecessariamente mais vidrarias.

Segundo Hohl (1983), as fontes de alimento têm uma profunda influência no crescimento, tanto na extensão linear como no aumento da massa celular. Elas

também determinam as chances de sobrevivência nas várias condições ambientais e formam a base para a reprodução e germinação dos esporos. A relação entre carbono e nitrogênio é muito importante para o crescimento e esporulação dos fungos; alta concentração de nitrogênio reprime a esporulação e está diretamente ligada a concentração de carbono (ELLIOTT, 1949). Desse modo, a adequação de composições de meios de cultivo é fundamental para que se obtenham quantidades satisfatórias de inóculo. A glicose geralmente é estimuladora da formação de esporângios nas concentrações de até 0,5 g/L. Acima desta concentração, a formação de esporângios é normalmente inibida (TARIQ, 1990).

Para Nozaki, Camargo e Barreto (2004), nem sempre as condições que favorecem o crescimento do fungo são as mesmas para esporulação. Sabe-se ainda que, alguns meios de cultura são mais favoráveis para a esporulação de fungos que outros. O meio de suco V8–CaCO₃–Ágar e CA proporcionaram um dos maiores crescimentos miceliais das colônias e induziram grande formação de esporângios. Em consequência disso, obteve-se uma das maiores concentrações de zoósporos quando cultivados nestes substratos. Os vegetais que compõem tais meios possuem alto valor nutricional, por isso são citados por diversos autores como capazes de induzir a reprodução de muitos fungos “mitospóricos” (BRUNELLI et al., 2006).

2.5.7 Avaliação da qualidade da luz no crescimento micelial e na esporulação de *Phytophthora nicotianae*

O resultado para o crescimento micelial e a esporulação deste isolado de *P. nicotianae* em diferentes espectros de luz estão representados na Tabela 7. Os maiores crescimentos vegetativos foram observados no tratamento escuro, seguido do vermelho e amarelo. Os tratamentos verde, azul e claro não diferiram significativamente ao apresentar TCMDs semelhantes nestes diferentes regimes de luz. Por sua vez, a esporulação foi diferenciada nos regimes de luz.

Tabela 6 – Crescimento micelial e esporulação de *Phytophthora nicotianae* sob diferentes regimes de luminosidade a 25 ± 1 °C

Tratamento	TCMD (mm.dia ⁻¹) ¹	Esporulação (zoósporos.mm ⁻²) ²
Vermelho	14,72 ab	732,02 b
Azul	14,24 b	862,78 ab
Verde	14,38 b	1119,23 ab
Amarelo	14,61 ab	858,30 ab
Escuro	14,94 a	743,55 b
Claro	14,35 b	1167,64 a

^{1,2}Médias de 10 e cinco repetições, respectivamente.

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O efeito dos regimes de luz foi mais acentuado quando o isolado foi cultivado no escuro, manifestando-se desde os primeiros dias de avaliação do crescimento. A taxa de crescimento ao quinto dia de incubação demonstra a diferença na evolução das colônias nos regimes escuro, vermelho e amarelo que proporcionaram, nestes meios, em ordem decrescente, os maiores crescimentos.

Quanto à esporulação, houve diferença significativa entre o comportamento deste isolado de *P. nicotianae*. As maiores quantidades de zoósporos foram encontradas no tratamento claro, seguido de azul, verde e amarelo. O vermelho e escuro tiveram pouca produção de zoósporos. Luz et al. (2008) relatam que a concentração mínima de zoósporos utilizada nas metodologias de inoculação de *Phytophthora* spp é de 10^4 zoósporos/mL, e que convertendo esse valor (10^4) para zoósporos/mm², os encontrados neste trabalho estão muito acima desse limite. De maneira geral, a composição dos meios, bem como os regimes de luz, induz variações no micélio aéreo e nas colônias (LUZ, 2006).

De acordo com os valores encontrados para os coeficientes de determinação das repetições para a qualidade da luz, estes foram acima de 90% (oscilaram entre 93,6 a 99,7%), demonstrando que a estimativa do TCMD pelo parâmetro “b” foi bem realizada.

Esses estudos de caracterização fisiológica contribuem ainda mais para o conhecimento sobre esse “fungo”, pois facilitar, em estudos futuros, os testes de patogenicidade, envolvendo *P. nicotianae*, uma vez que verificou qual foi o efeito do

meio de cultivo e da qualidade da luz na produção massiva de inóculo, além de dá subsídios para entender melhor a fisiologia do fitopatógeno.

3 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados nas análises de HPLC revelaram que a tangerineira Sunki possui maiores quantidades de equivalentes em apigenina que o citrumeleiro Swingle nos dois períodos de avaliação. Por sua vez, o porta-enxerto resistente apresentou mais equivalentes de ácido clorogênico que o genótipo susceptível.

Os equivalentes de compostos fenólicos em raízes de plântulas de citrumeleiro Swingle tratado com Pro-Ca não diferiram daquelas plantas tratadas somente com água. Isso comprova que o Pro-Ca, pelo menos, nesse porta-enxerto resistente, não inibiu e não desativou a síntese de compostos fenólicos.

O uso da armadilha permitiu diferenciar a atração de zoósporos de *P. nicotianae* por exsudatos radiculares provenientes dos dois porta-enxertos. O exsudato de citrumeleiro Swingle conseguiu atrair o menor número de zoósporos. Dessa forma, esta armadilha pode ser utilizada em estudos laboratoriais para diferenciar genótipos cítricos susceptíveis de resistentes.

O uso do anticorpo contra a elicítina “ α -plurivorina” diluído nas duas concentrações teve resultados intermediários no controle da doença e do consumo de água por plântulas de tangerineira Sunki.

A atividade zoosporicida das polimetoxiflavonas e flavonoides apresentou resultados variáveis no comportamento da motilidade de zoósporos de *P. nicotianae*, sendo que os compostos fenólicos escopoletina e tricetinpentametoxi conseguiram paralisar a motilidade, assim que foram adicionados à suspensão. Estes mesmos compostos também proporcionaram as menores porcentagens de germinação de zoósporos.

O meio de cultura AA permitiu a maior TCMD, seguido de CA e V8–CaCO₃–Ágar. Os maiores valores de esporulação foram encontrados nesses dois últimos meios, respectivamente. O AA é um meio bom para o crescimento micelial, mas é difícil de ser trabalhado, além de induzir menor esporulação.

Todas as faixas de luzes (e a ausência de luz) estudadas no presente trabalho podem ser avaliadas quanto a fisiologia deste estraminipilia para o crescimento micelial, porém o tratamento claro foi aquele que mais induziu a esporulação de zoósporos de *P. nicotianae*.

REFERÊNCIAS

ACQUAAH, G. Plant reproductive systems. In: ACQUAAH, G. **Principles of plant genetics and breeding**. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. p. 55–73.

AGRIOS, G.N. Genetics of plant disease. In: AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. Burlington: Elsevier Academic, 2005a. p. 124–174.

AGRIOS, G.N. How pathogens attack plants. In: AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. Burlington: Elsevier Academic, 2005b. p. 175–2005.

AGRIOS, G.N. How plants defend themselves against pathogens. In: AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. Burlington: Elsevier Academic, 2005c. p. 207–248.

AGUILAR-VILDOSO, C.I.; POMPEU JÚNIOR, J. Inoculação de *Phytophthora parasitica* em caules de plântulas de variedades cítricas, pelo método do palito. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p. S240, 1997. (Resumo 47).

AGUSTÍ, M. El clima. In: AGUSTÍ, M. **Citricultura**. 2. ed. Madri: Ediciones Mundi-Prensa, 2003. p. 105–119.

AL RAHIM, M.; NAKAJIMA, A.; SAIGUSA, D.; TETSU, N.; MARUYAMA, Y.; SHIBUYA, M.; YAMAKOSHI, H.; TOMIOKA, Y.; IWABUCHI, Y.; OHIZUMI, Y.; YAMAKUNI, T. 4'-Demethylnobiletin, a bioactive metabolite of nobiletin enhancing PKA/ERK/CREB signaling, rescues learning impairment associated with NMDA receptor antagonism via stimulation of the ERK cascade. **Biochemistry**, Washington, v. 48, n. 32, p. 7713–7721, 2009.

ALBRECHT, U.; BOWMAN, K.D. Inducible proteins in citrus rootstocks with different tolerance towards the root rot pathogen *Phytophthora palmivora*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 155, n. 10, p. 606–615, 2007.

ALENCAR, J. Podridão do pé dos citros. **Ceres**, Viçosa, v. 2, n. 12, p. 488–496, 1941.

ALLEN, R.N. NEWHOOK, F.J. Chemotaxis of zoospores of *Phytophthora cinnamomi* to ethanol in capillaries of soil pore dimensions. **Transactions of the British Mycological Society**, Manchester, v. 61, n. 2, p. 287–302, 1973.

ALLEN, R.N.; HARVEY, J.D. Negative chemotaxis of zoospores of *Phytophthora cinnamomi*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 84, n. 1, p. 28–38, 1974.

AMARO, A.A.; BAPTISTELLA, C.S.L. **Viveiros de citros — uma visão econômica**. Araraquara: São Paulo: Instituto de Economia Agrícola, 2010. 13 p. (Instituto de Economia Agrícola. Textos para Discussão, 23). Disponível em: <<ftp://ftp.sp.gov.br/ftpiea/td/td-23-2010.pdf>>. Acesso em: 28 out. 2014.

AMORIM, E.P.R. **Controle biológico de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* Dastur e *Phytophthora citrophthora* (Smith & Smith) Leonian em plântulas de citros**. 1997. 111 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 1997.

ANDRADE, P.B.; MENDES, G.; FALCO, V.; VALENTÃO, P.; SEABRA, R.M. Preliminary study of flavonols in port wine grape varieties. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 73, n. 4, p. 397–399, 2001.

ARAGAKI, M.; HINE, R.B. Effect of radiation on sporangial production of *Phytophthora parasitica* on artificial media and detached papaya fruit. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 53, n. 7, p. 854-856, 1963.

ARCAS, M.C.; BOTÍA, J.M.; ORTUÑO, A.M.; del RÍO, J.A. UV irradiation alters the levels of flavonoids involved in the defence mechanism of *Citrus aurantium* fruits against *Penicillium digitatum*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 106, n. 7, p. 617–622, 2000.

ASHBY, S.F. The oospores of *Phytophthora nicotianae* Br. de Haan, with notes on the taxonomy of *P. parasitica* Dastur. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 13, n. 1/2, p. 86–95, 1928.

AVERNA-SACCÁ, R. Molestias da laranjeira. **Boletim de Agricultura**, São Paulo, v. 18, n. 4, p. 334–346, 1917.

AVERNA-SACCÁ, R. Relatório do gabinete de pathologia vegetal, de maio a 31 de dezembro de 1911. **Boletim de Agricultura**, São Paulo, v. 13, n. 3, p. 208–246, 1912.

AZEVEDO, C.L.L. Solos. In: AZEVEDO, C.L.L. **Sistema de produção de citros para o Nordeste**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. (Sistema de Produção, 16. Versão eletrônica). Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Citros/CitrosNordeste/solos.htm>>. Acesso em: 04 nov. 2014.

BADRI, D.V.; VIVANCO, J.M. Regulation and function of root exudates. **Plant, Cell & Environment**, Chichester, v. 32, n. 6, p. 666–681, 2009.

BAERT, K.; DEVLIEGHERE, F.; BO, L.; DEBEVERE, J.; de MEULENAER, B. The effect of inoculum size on the growth of *Penicillium expansum* in apples. **Food Microbiology**, London, v. 25, n. 1, p. 212–217, 2008.

BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; COSTA, C.G.; ICHASO, C.L.F.; GUIMARÃES, E.F.; LIMA, H.C. Ordem 12 – Sapindales (Família Rutaceae Juss.). In: BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; COSTA, C.G.; ICHASO, C.L.F.; GUIMARÃES, E.F.; LIMA, H.C. (Ed.). **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, v. 2, 1984. p. 251–311.

BARTLETT, M.S. The use of transformations. **Biometrics**, Washington, v. 3, n. 1, p. 39–52, 1947.

BASAK, A.; RADEMACHER, W. Growth regulation of pome and stone fruit trees by use of Prohexadione-Ca. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 514, n. 1, p. 41–50, 2000.

BASSAN, M.M.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; FREIRE, B.F.S.; CANTUARIAS-AVILÉS, T.E.; BELTRAME, A.B. Reação de híbridos somáticos de citros à infecção por *Phytophthora nicotianae*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 2, p. 429–435, 2010.

BASSANEZI, R.B.; FERNANDES, N.G.; YAMAMOTO, P.T. Copas e porta-enxertos em relação à MSC. In: BASSANEZI, R.B.; FERNANDES, N.G.; YAMAMOTO, P.T. **Morte súbita dos citros**. Araraquara: Fundecitrus; Bebedouro: Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro, 2003b. p. 14–17. (Fundecitrus. Boletim Citrícola, 24).

BASSANEZI, R.B.; FERNANDES, N.G.; YAMAMOTO, P.T. Introdução. In: BASSANEZI, R.B.; FERNANDES, N.G.; YAMAMOTO, P.T. **Morte súbita dos citros**. Araraquara: Fundecitrus; Bebedouro: Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro, 2003a. p. 1–7. (Fundecitrus. Boletim Citrícola, 24).

BASSEL, J.; CONTOPOULOU, R.; MORTIMER, R.; FOGEL, S. Comparison of the silica gel and paper replica techniques with respect to the long term storage of strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **United Kingdom Federation for Culture Collections Newsletter**, Egham, n. 4, p. 7, 1977.

BECK, W.; van HOEK, R.; ENGELHARDT, H. Application of a diode-array detector in capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 14, n. 1, p. 540–546, 1993.

BECKER, J.; NAGEL, S.; TENHAKEN, R. Cloning, expression and characterization of protein elicitors from the soybean pathogenic fungus *Phytophthora sojae*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 148, n. 3, p. 161–167, 2000.

BEDENDO, I.P.; AMORIM, L. Ambiente e doença. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 1, 2011. p.133–147.

BEGUM, P.; HASHIDOKO, Y.; ISLAM, M.T.; OGAWA, Y.; TAHARA, S. Zoosporicidal activities of anacardic acids against *Aphanomyces cochlioides*. **Zeitschrift für Naturforschung C. A Journal of Biosciences**, Tübingen, v. 57c, n. 9/10, p. 874–882, 2002.

BELL, A. A. Biochemical mechanisms of disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 32, n. 1, p. 21–81, 1981.

BELTRAME, A. B. **Interação *Phytophthora nicotianae*–porta-enxerto de citros (tangerina Sunki e citrumelo Swingle): efeito no sistema radicular, aspectos fisiológicos e bioquímicos**. 2010. 137p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BELTRAME, A.B.; BRAND, S.C.; PASCHOLATI, S.F. Consumo de água e produção de etileno em interações *Phytophthora nicotianae*–citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 12., 2009, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Universidade Federal do Ceará e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Agroindústria Tropical; Campos dos Goytacazes: Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, 2009. 2 p. Disponível em: <http://www.sbfv.org.br/congresso2009/trabalhos/autor/interacao_planta-inseto_e_planta-microorganismo/-1025.pdf>. Acesso em: 02 jul. 2015.

BELTRAME, A.B.; FLEISCHMANN, F.; OßWALD, W.F.; PASCHOLATI, S.F. Alterações provocadas por toxina de *Phytophthora citricola*, parcialmente purificada, em plântulas de faia (*Fagus sylvatica*). In: CONGRESSO PAULISTA DE

FITOPATOLOGIA, 27., 2004, Campinas. **Anais...Campinas: Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fitossanidade, Instituto Agrônomo de Campinas; Botucatu: Grupo Paulista de Fitopatologia. Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 1, p. 97, 2004.

BEN-AZIZ, A. Nobiletin is main fungistat in tangerines resistant to mal secco. **Science**, Washington, v. 155, n. 3765, p. 1026–1027, 1967.

BERHOW, M. A. Flavonoid accumulation in tissue and cell culture. In: MANTHEY, J. A.; BUSLIG, B. S. (Ed.). **Flavonoids in the living system**. New York: Plenum Press, Springer Science, 1998. p. 67–84. (Plenum Press, Springer Science. Advances in Experimental Medicine and Biology, 439).

BILES, C.L.; WALL, M.M.; WAUGH, M.; PALMER, H. Relationship of *Phytophthora* fruit rot to fruit maturation and cuticle thickness of new mexican-types peppers. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, n. 6, p. 607–611, 1993.

BLUMER, S.; POMPEU JÚNIOR, J. Avaliação de citrandarins e outros híbridos de trifoliata como porta-enxertos para citros em São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 264–267, 2005.

BOTHA, T.; KOTZÉ, J.M. Exudates of avocado rootstocks and their possible role in resistance to *Phytophthora cinnamomi*. **South African Avocado Growers' Association Yearbook**, Tzaneen, v. 12, n. 1, p. 64–65, 1989.

BOTHA, T.; WEHNER, F.C.; KOTZÉ, J.M. An evaluation of *in vitro* screening techniques for determining tolerance of avocado rootstocks to *Phytophthora cinnamomi*. **South African Avocado Growers' Association Yearbook**, Tzaneen, v. 12, n. 1, p. 60–63, 1989.

BOTHA, T.; WEHNER, F.C.; KOTZÉ, J.M. Evaluation of new and existing techniques for *in vitro* screening of tolerance to *Phytophthora cinnamomi* Rands in avocado rootstocks. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 22, n. 3, p. 335–338, 1990a.

BOTHA, T.; WEHNER, F.C.; KOTZÉ, J.M. Screening of avocado rootstocks for tolerance to *Phytophthora cinnamomi* with various *in vitro* techniques and the possible role of amino acids in resistance. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 275, n. 1, p. 737–744, 1990b.

BOYD, H.W. Manganese toxicity to peanuts in autoclaved soil. **Plant and Soil**, The Hague, v. 35, n. 1/3, p. 133–144, 1971.

BRAND, A.; GOW, N.A.R. Tropic orientation responses of pathogenic fungi. In: PÉREZ-MARTÍN, J.; di PIETRO, A. (Ed.). **Morphogenesis and pathogenicity in fungi**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2012. p. 21–41. (Springer-Verlag. Topics in Current Genetics, 22).

BRUNELLI, K.R.; FAZZA, A.C.; ATHAYDE SOBRINHO, C.; CAMARGO, L.E.A. Effect of culture media and light exposure on the sporulation of *Cercospora zeae-maydis*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 1, p. 92–94, 2006.

BURR, I. W.; FOSTER, L.A. **A test for equality of variances**. West Lafayette: Purdue University, 1972. 26p. (Purdue University. Mimeograph Series, 282).

BYERS, R.; YUDER, K.S. Prohexadione-calcium inhibits apple, but not peach tree growth, but has little influence on apple fruit thinning or quality. **HortScience**, Alexandria, v. 34, n. 7, p. 1205–1209, 1999.

CABANILLAS, H.E.; JONES, W.A. Effects of temperature and culture media on vegetative growth of an entomopathogenic fungus *Isaria* sp. (Hypocreales: Clavicipitaceae) naturally affecting the whitefly, *Bemisia tabaci* in Texas. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 167, n. 5, p. 263–271, 2009.

CAHILL, D.M.; HARDHAM, A.R. Exploitation of zoospore taxis in the development of a novel dipstick immunoassay for the specific detection of *Phytophthora cinnamomi*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, n. 2, p. 193–200, 1994.

CALZAVARA, S.A.; SANTOS, J.M.; FAVORETO, L. Resistência de porta-enxertos cítricos a *Pratylenchus jaehni* (Nematoda: Pratylenchidae). **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 31, n. 1, p. 7–11, 2007.

CAMERON, J.N.; CARLILE, M.J. Fatty acids, aldehydes and alcohols as attractants for zoospores of *Phytophthora palmivora*. **Nature**, London, v. 271, n. 5644, p. 448–449, 1978.

CAMERON, J.N.; CARLILE, M.J. Negative chemotaxis of zoospores of the fungus *Phytophthora palmivora*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 120, n. 2, p. 347–353, 1980.

CAMERON, J.N.; CARLILE, M.J. Negative geotaxis of zoospores of the fungus *Phytophthora*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 98, n. 2, p. 599–602, 1977.

CAMPELO, L.M.L.; SÁ, C.G.; FEITOSA, C.M.; SOUSA, G.F.; FREITAS, R.M. Constituintes químicos e estudos toxicológicos do óleo essencial extraído das folhas de *Citrus limon* Burn (Rutaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínia, v. 15, n. 4, s.1, p. 708–716, 2013.

CAMPOS, Â.D. Elicitores e a resposta de indução da resistência. In: CAMPOS, Â. D. **Considerações sobre indução de resistência a patógenos em plantas**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009. p. 14–18. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 264).

CAPASSO, R.; CRISTINZIO, G.; EVIDENTE, A.; VISCA, C.; FERRANTI, P.; del VECCHIO BLANCO, F.; PARENTE, A. Elicitin 172 from an isolate of *Phytophthora nicotianae* pathogenic to tomato. **Phytochemistry**, New York, Oxford, v. 50, n. 5, p. 703–709, 1999.

CARLILE, M.J. Motility, taxis and tropism in *Phytophthora*. In: ERWIN, D.C.; BARTNICKI-GARCIA, S.; TSAO, P.H. (Ed.). **Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology**. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1983. p. 95–107.

CARLILE, M.J. Positioning mechanisms — the role of motility, taxis and tropism in the life of microorganisms. In: ELLWOOD, D.C.; HEDGER, J.N.; LATHAM, M.J.; LYNCH, J.M.; SLATER, J.H. (Ed.). **Contemporary microbial ecology**. London: Academic Press, 1980. p. 55–74.

CARLILE, M.J. The zoospores and its problems. In: AYRES, P.G.; BODDY, L. (Ed.). **Water, fungi and plant**. Cambridge: Cambridge University Press, 1986. p. 105–118. (Cambridge University Press. British Mycological Society Symposium, 11).

CARLOS, E.F.; STUCHI, E.S.; DONADIO, L.C. Introdução. In: CARLOS, E.F.; STUCHI, E.S.; DONADIO, L.C. **Porta-enxerto para a citricultura paulista**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; Fundação de Apoio a Pesquisa, Ensino e Extensão; Bebedouro, Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro, 1997a. p. 1–3. (UNESP/FUNEP/EECB. Boletim Citrícola, 1).

CARLOS, E.F.; STUCHI, E.S.; DONADIO, L.C. Poliembriionia e juvenilidade. In: CARLOS, E.F.; STUCHI, E.S.; DONADIO, L.C. **Porta-enxerto para a citricultura paulista**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; Fundação de Apoio a Pesquisa, Ensino e Extensão; Bebedouro, Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro, 1997b. p. 3–5. (UNESP/FUNEP/EECB. Boletim Citrícola, 1).

CARVALHO, M.T.; BORDIGNON, R.; BALLVÉ, R.M.L.; PINTO-MAGLIO, C.A.F.; MEDINA FILHO, H. P. Aspectos biológicos do reduzido número de sementes da tangerina 'Sunki'. **Bragantia**, Campinas, v. 56, n. 1, p.69–77, 1997.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 42, n. 15, p. 225–226, 1939.

CASTLE, W.S.; TUCKER, D.P.H.; KREZDORN, A H.; YOUTSEY, C.O. **Rootstocks for Florida Citrus**: rootstock selection, the first step to success. 2nd. ed. Gainesville: University of Florida; Institute of Food and Agricultural Sciences, 1993. 92 p. (University of Florida–Institute of Food and Agricultural Sciences. Publication SP–42).

CASTLE, W.S.; WUTSCHER, H.K.; YONTSEY, C.O.; PELOSI, R.R. Citrumelos as rootstocks for Florida citrus. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Tallahassee, v. 101, n. 1, p. 28–33, 1988.

CENTRO DE CITRICULTURA SYLVIO MOREIRA. Nova doença já causa prejuízos a pomares de SP e MG. **Informativo Centro de Citricultura**, Cordeirópolis, n. 76, p.1 e 4, 2001.

CERVONE, F.; HAHN, M.G.; de LORENZO, G.; DARVILL, A.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions: XXXIII. A plant protein converts a fungal pathogenesis factor into an elicitor of plant defense responses. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 90, n. 2, p. 542–548, 1989.

CÉSAR, H.P. A enxertia. In: CÉSAR, H.P. **Manual prático do enxertador e criador de mudas de árvores frutíferas e dos arbustos ornamentais**. 15. ed. São Paulo: Nobel, 1996. p. 11–17.

CHALLICE, J.S.; WILLIAMS, A.H. Comparative biochemical study of phenolase specificity in *Malus*, *Pyrus* and other plants. **Phytochemistry**, New York, Oxford, v. 9, n. 6, p. 1261–1269, 1970.

CHANG-HO, Y.; HICHMAN, C.J. Some factors involved in the accumulation of Phycomycete zoospores on plant roots. In: TOUSSOUN, T.A.; BEGA, R.V.; NELSON, P.E. (Ed.). **Root diseases and soil-borne pathogens**. Berkeley, Los Angeles: University of California Press, 1970. p. 103–108.

CHAPOT, H. The citrus plant. In: CIBA-GEIGY AGROCHEMICALS. **Citrus**. Basle: Ciba-Geigy Agrochemicals, 1975. p. 6–13. (Ciba-Geigy Agrochemicals. Citrus Technical Monograph, 4).

CHERN, L.-L.; TANG, C.-S.; KO, W.-H. Chemical characterization of α hormones of *Phytophthora parasitica*. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v. 40, n. 1, p. 79–85, 1999.

CHIACCHIO, F.P.B.; GALLI, F. Influência da copa e do vigor das plantas cítricas sobre o comportamento do porta-enxerto em relação à *Phytophthora parasitica* Dastur e *Phytophthora citrophthora* (SM & SM) Leonian. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 1, n. 3, p. 35–44, 1978.

CLINE, E.T.; FARR, D.F.; ROSSMAN, A.Y. A synopsis of *Phytophthora* with accurate scientific names, host range, and geographic distribution. **Plant Health Progress**, Saint Paul, 2008. Disponível em: <<https://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/2008/phytophthora/>>. Acesso em 10 nov. 2014.

COCHRANE, V.W. Reproduction (Light). In: COCHRANE, V.W. **Physiology of fungi**. New York: J. John Wiley & Sons, 1958. p. 356–386.

COHEN, Y.; EYAL, H.; SADON, T. Light-induced inhibition of sporangial formation of *Phytophthora infestans* on potato leaves. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 53, n. 22, p. 2680–2686, 1975.

COOPERMAN, C.J.; JENKINS, S.F. Conditions influencing growth sporulation of *Cercospora asparagi* blight development in asparagus. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 76, n. 6, p. 617–622, 1986.

COSTA, G.; ANDREOTTI, C.; BUCCHI, F.; SABATINI, E.; BAZZI, C.; MALAGUTI, S.; RADEMACHER, W. Prohexadione-Ca (Apogee®): growth regulation and reduced fire blight incidence in pear. **HortScience**, Alexandria, v. 36, n. 5, p. 931–933, 2001.

CZAPEK, F. Untersuchungen über die Stickstoffgewinnung und Eiweißbildung der Pflanzen. 1. Die Bedeutung der Aminosäuren als Stickstoffquelle bei Schimmelpilzen. **Beiträge zur Chemischen Physiologie und Pathologie**, Braunschweig, v. 1, n. 10–12, p. 538–560, 1902.

DALIO, R.J.D. **Deciphering mechanisms of pathogenicity and resistance induction in the interaction between *Phytophthora* spp. and European beech (*Fagus sylvatica* L.)**. 2013. 188 p. Dissertation (Doktors der Naturwissenschaften) – Fachgebiet für Pathologie der Waldbäume, Technische Universität München, Freising, 2013.

DALIO, R.J.; FLEISCHMANN, F.; OSWALD, W. Localization of *Phytophthora plurivora* effector protein citricolin in *Fagus sylvatica* roots by light and fluorescence laser scanning microscopy. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 101, n. 6S, p. S40, 2011.

DALIO, R.J.; FLEISCHMANN, F.; OSWALD, W. *Phytophthora plurivora* effector α -plurivorin is essential for virulence and manipulates *Fagus sylvatica* immunity. In: FELDMANN, F.; CARSTENSEN, C. (Ed.). **Zusammenfassungen der Arbeitskreisbeiträge 2012**. Braunschweig: Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, 2012. p. 62.

DALIO, R.; FLEISCHMANN, F.; CHAMBERY, A.; EICHMANN, R.; MASSOLA JÚNIOR, N.S.; PASCHOLATI, S.F.; OSSWALD, W. Blocking of α -plurivorin compromises *Phytophthora plurivora* pathogenicity towards *Fagus sylvatica* seedlings. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL UNION OF FOREST RESEARCH ORGANIZATIONS (IUFRO) WORKING PARTY S07-02-09, 6., 2012, Córdoba. **Proceedings...** Vienna: International Union of Forest Research Organizations, 2012. p. 47.

DANIÈLE, E.; DOMMES, J.; HAUSMAN, J.-F. Carbohydrates and resistance to *Phytophthora infestans* in potato plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 25, n.2, p. 171–178, 2003.

DANTIGNY, P.; GUILMART, A.; RADOI, F.; BENSOUSSAN, M.; ZWIETERING, M. Modelling the effect of ethanol on growth rate of food spoilage moulds. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 98, n. 3, p. 261–269, 2005.

DASTUR, J.F. On *Phytophthora parasitica* nov. sp.: a new disease of the castor oil plant. **Memoirs of the Department of Agriculture in India (Botanical Series)**, Calcutta, v. 5, n. 4, p. 177–231 [p. 226], 1913.

DAVISON, E.M. How do *Phytophthora* spp. de Bary kill trees? **New Zealand Journal of Forestry Science**, Rotorua, v. 41S, n. 1, p. S25–S37, 2011.

DE BARY, A. Researches into the nature of potato-fungus, *Phytophthora infestans*. **The Journal of the Royal Agricultural Society of England. Second Series**, London, v. 12, n. 1, p. 239–269, 1876a.

DE BARY, A. Researches into the nature of potato-fungus, *Phytophthora infestans*. **Journal of Botany, British and Foreign**, London, v. 14 (New Series, v. 5), n. 160, p. 105–126; n. 161, p. 149–154, 1876b.

de SWARDT, G.H.; MAXIE, E.C.; SINGLETON, V.L. Some relationships between enzyme activities and phenolic components in banana tissues. **South African Journal of Agricultural Science = Suid Afrikaanse Tydskrif vir Landbouwetenskap**, Pretoria, v. 10, n. 3, p. 641–650, 1967.

DEACON, J.W.; DONALDSON, S.P. Molecular recognition in the homing responses of zoosporic fungi, with special reference to *Pythium* and *Phytophthora*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 97, n. 10, p. 1153–1171, 1993.

del RÍO, J.A.; ARCAS, M.C.; BENAVENTE-GARCÍA, O.; ORTUÑO, A. Citrus polymethoxylated flavones can confer resistance against *Phytophthora citrophthora*, *Penicillium digitatum*, and *Geotrichum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 10, p. 4423–4428, 1998.

del RÍO, J.A.; ARCAS, M.C.; BOTÍA, J.M.; BÁIDEZ, A.G.; FUSTER, M.D.; ORTUÑO, A.M. Involvement of phenolic compounds in the antifungal defense mechanisms of *Olea europaea* L. and *Citrus* sp. **Recent Research Developments in Agricultural & Food Chemistry**, Trivandrum (Thiruvananthapuram), v. 4, n. 2, p. 331–341, 2000.

del RÍO, J.A.; GÓMEZ, P.; BAIDEZ, A.G.; ARCAS, M.C.; BOTÍA, J.M.; ORTUÑO, A. Changes in the levels of polymethoxyflavones and flavanones as part of the defense mechanism of *Citrus sinensis* (cv. Valencia Late) fruits against *Phytophthora citrophthora*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 7, p. 1913–1917, 2004.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. Culture of pathogens [Factors affecting the cultivation and sporulation of pathogenic fungi (Light)]. In: DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods**. 2nd. ed. Boca Raton: CRC Press, 1995a. p. 11–59. [p. 13–14].

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. Long-term storage of plant pathogens (II. Periodic transfer). In: DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Basic plant pathology methods**. 2nd. ed. Boca Raton: CRC Press, 1995b. p. 61–81. [p. 61–63].

DICK, M.W. Systematics (The Straminipila). In: DICK, M.W. **Straminipilous fungi: Systematics of the Peronosporomycetes** including accounts of the marine straminipilous protists, the plasmodiophorids and similar organisms. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001. p. 267–432. [p. 275].

DIENER, U.L. A method for inducing abundant sporulation of *Stemphylium solani* in pure culture. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 42, n. 1, p. 7, 1952.

DIXON, R.A. The phytoalexin response: elicitation, signalling and control of host gene expression. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 61, n. 3, p. 239–291, 1986.

DIXON, R. A.; LAMB, C.J. Molecular Communication in Interactions Between plants and microbial pathogens. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 41, n. 1, p. 339–367, 1990.

DONADIO, L.C.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MOREIRA, C.S. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Org.). **Citros**. Cordeirópolis: Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Citros Sylvio Moreira; Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas e Fundação de Apoio à Pesquisa Agrícola, 2005. p. 1–18.

DONALDSON, S.P.; DEACON, J.W. Changes in motility of *Pythium* zoospores induced by calcium and calcium-modulating drugs. **Mycological Research**, Cambridge, v. 97, n. 7, p. 877–883, 1993.

DONALDSON, S. P.; DEACON, J. W. Role of calcium in adhesion and germination of zoospore cysts of *Pythium*: a model to explain infection of host plants. **Journal of General Microbiology**, London, v. 138, n. 10, p. 2051–2059, 1992.

DOX, A.W. The intracellular enzymes of lower fungi, especially those of *Penicillium camemberti*. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 6, n. 5, p. 461–467, 1909.

DUCLOS, J.; GARCIA, M.T.; GRAÇA, J.; COELHO, A.C.; FAUCONNIER, A.; JACQUET, A.; BOLLEN, A.; CRAVADOR, A.; BIEMANS, R.; GODFROID, E. Identification of an elicitor gene cluster in *Phytophthora cinnamomi* and analysis of the necrotic activity of a purified recombinant β -cinnamomin. **Mededelingen van de Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Universiteit Gent**, Gent, v. 63, n. 4b, p. 1695–1698, 1998.

DUKES, P.D.; APPLE, J. L. Chemotaxis of zoospores of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* by plant roots and certain chemical solutions. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 51, n. 3, p. 195–197, 1961.

DURBIN, J.; WATSON, G.S. Testing for serial correlation in least squares regression. II. **Biometrika**, Oxford, v. 38, n. 1/2, p. 159–177, 1951.

DURBIN, J.; WATSON, G.S. Testing for serial correlation in least squares regression: I. **Biometrika**, Oxford, v. 37, n. 3/4, p. 409–428, 1950.

EBEL, J. Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, n. 1, p. 235–264, 1986.

EGEA, C.; DICKINSON, M.J.; CANDELA, M.; CANDELA, M.E. β -1,3-Glucanase isoenzymes and genes in resistant and susceptible pepper (*Capsicum annuum*) cultivars infected with *Phytophthora capsici*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 107, n. 3, p. 312–318, 1999.

ELAD, Y. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. **Crop Protection**, Guildford, v. 19, n. 8/10, p. 709–714, 2000.

EL-BORAI-KODA, F.E. **The Interactions between nematode and fungal pathogens on the citrus fibrous root cortex**. 2001. 119 p. Ph. D. Dissertation (Doctor of Philosophy – Nematology) – Entomology and Nematology Department, University of Florida, Gainesville, 2001.

ELLIOTT, E.S. The effect of the sugar concentration on conidial size of some species of *Helminthosporium*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 39, n. 12, p. 953–958, 1949.

ENKERLI, K.; HAHN, M.G.; MIMS, C.W. Ultrastructure of compatible and incompatible interactions of soybean roots infected with the plant pathogenic oomycete *Phytophthora sojae*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 75, n. 9, p. 1493–1508, 1997.

ERWIN, D.C.; RIBEIRO, O.K. *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan (1896) = *Phytophthora parasítica* Dastur (1913). In: ERWIN, D.C.; RIBEIRO, O.K. (Ed.). **Phytophthora diseases worldwide**. Saint Paul: The American Phytopathological Society Press, 1996. p. 391–407.

ESCANFERLA, M.E. **Histologia e bioquímica da interação entre porta-enxertos de citros resistente e suscetíveis a *Phytophthora nicotianae***. 2011. 101p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

FARR, D.F.; ROSSMAN, A.Y. *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan 1896 (Oomycetes, Pythiales). In: FARR, D.F.; ROSSMAN, A.Y. **Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory**. Washington: Agricultural

Research Service; United States Department of Agriculture, 2014. Disponível em: <<http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases>>. Acesso em: 13 nov. 2014.

FAWCETT, H.S. Gummosis of citrus. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 24, n. 3, p. 191–236, 1923.

FEICHTENBERGER, E. Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros. In: LUZ, E. D. M. N.; SANTOS, Á. F.; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J.L. (Ed.) **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Livraria e Editora Rural, 2001. p. 283–342.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE JUNIOR, J. Doenças dos citros (*Citrus* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, 2005. p. 239–269.

FEICHTENBERGER, E.; ROSSETTI, V.; POMPEU JÚNIOR, J.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; FIGUEIREDO, J.O. Evaluation of tolerance to *Phytophthora* species in scion rootstock combinations of citrus in Brazil: a review. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 7., 1992; Acireale. **Proceedings...** Riverside: International Society of Citriculture, v. 2, 1992. p. 854–858.

FENNELL, D.I. Conservation of fungous cultures. **The Botanical Review**, Bronx, v. 26, n. 1, p. 79–141, 1960.

FERNANDES, N.G.; BASSANEZI, R.B. Doença de causa desconhecida afeta pomares cítricos no norte de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 93, 2001.

FERNANDO, W.G.D.; JONES, A.L. Prohexadione-calcium — a tool for reducing secondary fire blight infection. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 489, n. 1, p. 597–600, 1999.

FERREIRA, S.A.; WEBSTER, R.K. The relationship of sporulation, sclerotia production, and growth rate to virulence and fitness of *Sclerotium oryzae*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 65, n. 9, p. 972–976, 1975.

FIGUEIREDO, J.O.; POMPEU JÚNIOR, J.; PIO, R.M.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; DOMINGUES, E.T.; LARANJEIRA, F.F. Produção inicial do tangor ‘Murcote’, sobre

dezesseis porta-enxertos em São Paulo. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 18, n. 1, p.165–173, 1997.

FIGUEIREDO, J.O.; STUCHI, E.S.; DONADIO, L.C.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; LARANJEIRA, F.F.; PIO, R.M.; SEMPIONATO, O.R. Porta-enxertos para a lima-ácida – ‘Tahiti’ na região de Bebedouro, SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 155–159, 2002.

FIGUEIREDO, M.B. Estudos sôbre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas. **O Biológico**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 9–13, 1967.

FIGUEIREDO, M.B.; PIMENTEL, C.P.V. Métodos de preservação de fungos em cultura. **O Biológico**, São Paulo, v. 55, n. 1/2, p. 27–33, 1989.

FISCHER, T. C.; HALBWIRTH, H.; ROEMMELT, S.; SABATINI, E.; SCHLANGEN, K.; ANDREOTTI, C.; SPINELLI, F.; COSTA, G.; FORKMANN, G.; TREUTTER, D.; STICH, K. Induction of polyphenol gene expression in apple (*Malus xdomestica*) after the application of a dioxygenase inhibitor. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 128, n. 4, p. 604–617, 2006.

FISHER, R.A. Distributions. In: FISHER, R. A. **Statistical methods for research workers**. Edinburgh, London: Oliver & Boyd, 1925. p. 43–78. (Oliver & Boyd, Biological Monographs and Manuals, 5).

FISHER, R.A.; MACKENZIE, W.A. Studies in crop variation. II. The manurial response of different potato varieties. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 13, n. 3, p. 311–320. 1923.

FLEISCHMANN, F.; KOEHL, J.; PORTZ, R.; BELTRAME, A.B.; OSWALD, W. Physiological changes of *Fagus sylvatica* seedlings infected with *Phytophthora citricola* and the contribution of its elicitor “citricolin” to pathogenesis. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 7, n. 6, p. 650–658, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. UNITED NATIONS. STATISTICS DIVISION. **Faostat (The FAO Statistical Database)**: production. Roma: Food and Agriculture Organization, 2015. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>>. Acesso em: 27 ago. 2015.

FRYDMAN, A.; WEISSHAUS, O.; BAR-PELED, M.; HUHMANN, D.V.; SUMNER, L. W.; MARIN, F.R.; LEWINSOHN, E.; FLUHR, R.; GRESSEL, J.; EYAL, Y. Citrus fruit

bitter flavors: isolation and functional characterization of the gene Cm1,2RhaT encoding a 1,2 rhamnosyltransferase, a key enzyme in the biosynthesis of the bitter flavonoids of citrus. **The Plant Journal**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 88–100, 2004.

GALLUP, C. A. **The impacts of black shank resistance management on the population biology of *Phytophthora nicotianae* in tobacco**. 2009. 195p. Ph. D. Dissertation (Doctor of Philosophy) – Graduate Faculty, North Carolina State University, Raleigh, 2009.

GALLUP, C.A.; SULLIVAN, M.J.; SHEW, H D. Black shank of tobacco. **The Plant Health Instructor**, Saint Paul, 2006. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/oomyces/Pages/BlackShank.aspx>>. Acesso em: 14 nov. 2014.

GAULIN, E.; JAUNEAU, A.; VILLALBA, F.; RICKAUER, M.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M. T.; BOTTIN, A. The CBEL glycoprotein of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* is involved in cell wall deposition and adhesion to cellulosic substrates. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 115, n. 23, p. 4565–4575, 2002.

GIBSON, R.W. Trapping of the spider mite *Tetranychus urticae* by glandular hairs on the wild potato *Solanum berthaultii*. **Potato Research**, Dordrecht, v. 19, n. 2, p. 179–182, 1976.

GLIDDEN, H.W. The lemon in Asia and Europe. **Journal of the American Oriental Society**, Ann Arbor, v. 57, n. 4, p. 381–396, 1937.

GMITTER JUNIOR, F.G.; HU, X. The possible role of Yunnan, China in the origin of contemporary *Citrus* species (Rutaceae). **Economic Botany**, New York, v. 44, n. 2, p. 267–277, 1990.

GOLDBERG, N.P.; HAWES, M.C.; STANGHELLINI, M.E. Specific attraction to and infection of cotton root cap cells by zoospores of *Pythium dissotocum*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 67, n. 6, p. 1760–1767, 1989.

GOMES, C.B.; CARNEIRO, R.M.D.G. Receptividade de diferentes solos à colonização pelo fungo *Paecilomyces lilacinus* em três formulações. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 21, n. 2, p. 61–73, 1997.

GOODING, G.V.; LUCAS, G.B. Factors influencing sporangial formation and zoospore activity in *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 49, n. 5, p. 277–281, 1959.

GOUVEIA, M.E.M. **Doença da tinta do castanheiro avaliação da resistencia a *Phytophthora cinnamomi* Rands.** 1993. 118 p. Dissertação (Mestrado em Proteção Integrada) – Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 1993.

GOW, N. A. New angles in mycology: studies in directional growth and directional motility. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, n. 1, p. 5–13, 2004.

GOW, N.A.R.; CAMPBELL, T.A.; MORRIS, B.M.; OSBORNE, M.C.; REID, B.; SHEPHERD, S.J.; van WEST, P. Signals and interactions between phytopathogenic zoospores and plant roots. In: ENGLAND, R.; HOBBS, G.; BAINTON, N.; ROBERTS, D. McL. (Ed.). **Microbial signalling and communication.** Cambridge: Cambridge University Press, 1999. p. 285–305. (Cambridge University Press. Society for General Microbiology Symposium, 57).

GRAHAM, J.H. Evaluation of tolerance of citrus rootstocks to *Phytophthora* root rot in chlamydospore-infested soil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 74, n. 10, p. 743–746, 1990.

GRAHAM, J.H. Root regeneration and tolerance of citrus rootstocks to root rot caused by *Phytophthora nicotianae*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, n. 1, p. 111–117, 1995.

GRAHAM, J.H.; McCOY, C.W.; ROGERS, J.S. The *Phytophthora–Diaprepes* weevil complex. **Citrus Industry**, Ocala, v. 78, n. 8, p. 67–70, 1997.

GRANT, J.J.; YUN, B.W.; LOAKE, G.J. Oxidative burst and cognate redox signalling reported by luciferase imaging: identification of a signal network that functions independently of ethylene, SA and Me-JA but is dependent on MAPKK activity. **The Plant Journal**, Oxford, v. 24, n. 5, p. 569–582, 2000.

GRAYER, R.J.; HARBORNE, J.B. A survey of antifungal compounds from higher plants 1982–1993. **Phytochemistry**, New York, Oxford, v. 37, n. 1, p. 19–42, 1994.

HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. Biochemical responses of plants to pathogens. In: CHET, I. (Ed.). **Innovative approaches to plant disease control.** New York: John Wiley & Sons, 1987. p. 229–254.

HAHN, M.G. Microbial elicitors and their receptors in plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, n. 1, p. 387–412, 1996.

HÄKKINEN, S.; HEINONEN, M.; KÄRENLAMPI, S.; MYKKÄNEN, H.; RUUSKANEN, J.; TÖRRÖNEN, R. Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. **Food Research International**, Oxford, v. 32, n. 5, p. 345–353, 1999.

HALL, G. An integrated approach to the analysis of variation in *Phytophthora nicotianae* and a redescription of the species. **Mycological Research**, Cambridge, v. 97, n. 5, p. 559–574, 1993.

HALL, G. *Phytophthora nicotianae*. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 126, n. 1, p. 61–63, 1994. [IMI (International Mycological Institute). Descriptions of Fungi and Bacteria, 1200].

HALSALL, D.M. Zoospore chemotaxis in Australian isolates of *Phytophthora* species. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 22, n. 3, p. 409–422, 1976.

HANELT, P.; BÜTTNER, R.; MANSFELD, R. Rutaceae. In: HANELT, P.; BÜTTNER, R.; MANSFELD, R.; INSTITUTE OF PLANT GENETICS AND CROP PLANT RESEARCH. (Ed.). **Mansfeld's encyclopedia of agricultural and horticultural crops (except ornamentals)**. Berlin: Springer-Verlag, v. 2, 2001. p. 996–1039.

HARBORNE, J.B. The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. **Biochemical Systematics and Ecology**, Elmsford, v. 27, n. 4, p. 335–367, 1999.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, New York; Oxford, v. 55, n. 6, p. 481–504, 2000.

HARDHAM, A.R. The cell biology behind *Phytophthora* pathogenicity. **Australasian Plant Pathology**, Toowoomba, v. 30, n. 2, p. 91–98, 2001.

HARDHAM, A.R.; SHAN, W. Cellular and molecular biology of *Phytophthora*–plant interactions. In: DEISING, H.B. (Ed.). **Plant relationships**. 2nd ed. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2009. p. 3–27. (Springer-Verlag. The Mycota: a Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research, 5).

HARUTYUNYAN, S.R.; ZHAO, Z.; DEN HARTOG, T.; BOUWMEESTER, K.; MINNAARD, A.J.; FERINGA, B.L.; GOVERS, F. Biologically active *Phytophthora* mating hormone prepared by catalytic asymmetric total synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, n. 25, p. 8507–8512, 2008.

HAWKER, L.E. The effect of environment on sporulation (Light). In: HAWKER, L. E. **The physiology of reproduction in fungi**. Cambridge: Cambridge University Press, 1957. p. 24–47. [p. 38–45]. (Cambridge University Press. Cambridge Monographs in Experimental Biology, 6).

HAWKER, L.E. The physiology of development in fungi. [Colonial growth fungi (Zonation).]. In: RUHLAND, W.; ASHBY, E.; BONNER, J.; GEIGER-HUBER, M.; JAMES, W.O.; LANG, A.; MÜLLER, D.; STÄLFELT, M.G. (Ed.). **Encyclopedia of plant physiology (Handbuch der Pflanzenphysiologie)**: differentiation and development (differenzierung und Entwicklung). Berlin: Springer-Verlag, v. 15, pt. 1, 1965. p. 716–757.

HICKMAN, C.J.; HO, H.H. Behavior of zoospores in plant-pathogenic Phycomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 4, n. 1, p. 195–220, 1966.

HO, H.H.; JONG, S.C. *Phytophthora nicotianae* (*P. parasitica*). **Mycotaxon**, Ithaca, v. 35, n. 2, p. 243–276, 1989.

HO, P.; HOGG, T.A.; SILVA, M.C.M. Application of a liquid chromatographic method for the determination of phenolic compounds and furans in fortified wines. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 64, n. 1, p. 115–122, 1999.

HODGSON, R.W. Horticultural varieties of citrus. In: REUTHER, W.; WEBBER, H. J.; BATCHELOR, L.D. (Ed.). **The Citrus industry**: history, world distribution, botany, and varieties. Berkeley: University of California Press; Division of Agricultural Sciences, v. 1, 1967. p. 431–591.

HOHL, H.R. Nutrition of *Phytophthora*. In: ERWIN, D.C.; BARTNICKI-GARCIA, S.; TSAO, P.H. (Ed.). **Phytophthora**: its biology, taxonomy, ecology and pathology. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1983. p. 41–54.

HOLDCROFT, A.M. **Alternative methods of control for *Phytophthora nicotianae* of tobacco**. 2013. 95p. Thesis (Master of Science) – College of Agriculture, University of Kentucky, Lexington, 2013.

HOLLEY, J.D.; KING, R.R.; SINGH, R.P. Glandular trichomes and the resistance of *Solanum berthaultii* (PI 473340) to infection from *Phytophthora infestans*. **Canadian Journal of Plant Pathology = Revue Canadienne de Phytopathologie**, Guelph, v. 9, n. 4, p. 291–294, 1987.

HORIO, T.; KAWABATA, Y.; TAKAYAMA, T.; TAHARA, S.; KAWABATA, J.; FUKUSHI, Y.; NISHIMURA, H.; MIZUTANI, J. A potent attractant of zoospores of *Aphanomyces cochlioides* isolated from its host, *Spinacia oleracea*. **Experientia**, Basel, v. 48, n. 4, p. 410–414, 1992.

HORTA, M.R.G. **Estudo do papel biológico das elicinas de *Phytophthora cinnamomi* e do seu envolvimento no processo infeccioso**. 2006. 266 p. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Faculdade de Engenharia dos Recursos Naturais, Universidade do Algarve, Faro, 2006.

HUA, C.; WANG, Y.; ZHENG, X.; DOU, D.; ZHANG, Z.; GOVERS, F.; WANG, Y. A *Phytophthora sojae* G-protein α subunit is involved in chemotaxis to soybean isoflavones. **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 7, n. 12, p. 2133–2140, 2008.

HUANG, T.-C.; HO, C.-T. Dried citrus fruits: phytochemicals and health beneficial effects. In: ALASALVAR, C.; SHAHIDI, F. (Ed.). **Dried fruits: phytochemicals and health effects**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2013. p. 258–283.

HUET, R. Constituants des agrumes à effet pharmacodynamique: les citroflavonoïdes. **Fruits**, Paris, v. 37, n. 4, p. 267–271, 1982.

HUITEMA, E.; VLEESHOUWERS, V.G.A.A.; CAKIR, C.; KAMOUN, S.; GOVERS, F. Differences in intensity and specificity of hypersensitive response induction in *Nicotiana* spp. by INF1, INF2A and INF2B of *Phytophthora infestans*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 18, n. 3, p. 183–193, 2005.

HUTCHISON, D.J. Swingle citrumelo — a promising rootstock hybrid. **Proceedings of the Florida State for Horticultural Society**, Tallahassee, v. 87, n. 1, p. 89–91, 1974.

HUTCHISON, D. J.; WUTSCHER, H. K.; CARPENTER, J. B. Swingle citrumelo: an ultrasensitive rootstock. **Citrograph**, Los Angeles, v. 59, n. 11, p. 387–388 e 391, 1974.

INDEX FUNGORUM. ***Phytophthora nicotianae* Breda de Haan**. Egham: Centre for Agriculture and Biosciences International, 2014. Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=194443>>. Acesso em: 06 nov. 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**: pesquisa mensal de previsão e

acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Rio de Janeiro: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, v. 29, n. 06, p. 1–81, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção agrícola municipal**: culturas temporárias e permanentes. Rio de Janeiro: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, v. 40, n. 1, p. 1–102, 2013.

ISLAM, M.D.; TAHARA, S. Chemotaxis of fungal zoospores, with special reference to *Aphanomyces cochlioides*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tōkyō, v. 65, n. 9, p. 1933–1948, 2001a.

ISLAM, M.D.; TAHARA, S. Repellent activity of estrogenic compounds toward zoospores of the phytopathogenic fungus *Aphanomyces cochlioides*. **Zeitschrift für Naturforschung C. A Journal of Biosciences**, Tübingen, v. 56c, n. 3–4, p. 253–261, 2001b.

ISLAM, M.T.; HASHIDOKO, Y.; ITO, T.; TAHARA, S. Interruption of the homing events of phytopathogenic *Aphanomyces cochlioides* zoospores by secondary metabolites from nonhost *Amaranthus gangeticus*. **The Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v. 29, n. 1, p. 6–14, 2004.

ISLAM, M. T.; ITO, T.; SAKASAI, M.; TAHARA, S. Zoosporicidal activity of polyflavonoid tannin identified in *Lannea coromandelica* stem bark against phytopathogenic oomycete *Aphanomyces cochlioides*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 23, p. 6697–6703, 2002.

ISLAM, M.T.; von TIEDEMAN, A. Zoosporogenesis and differentiation of grapevine downy mildew pathogen *Plasmopara viticola* in host-free system. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, n. 6S, p. S72, 2008.

JOHANN, S.; OLIVEIRA, V.L.; PIZZOLATTI, M. G.; SCHRIPSEMA, J.; BRAZ-FILHO, R.; BRANCO, A.; SMÂNIA JUNIOR, A. Antimicrobial activity of wax and hexane extracts from *Citrus* spp. peels. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 6, p. 681–685, 2007.

JUDELSON, H.S.; BLANCO, F.A. The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 3, n. 1, p. 47–58, 2005.

KALLITHRAKA, S.; ARVANITOYANNIS, I.; EL-ZAJOULI, A.; KEFALAS, P. The application of an improved method for trans-resveratrol to determine the origin of Greek red wines. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 75, n. 3, p. 355–363, 2001.

KAMOUN, S. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, n. 1, p. 41–60, 2006.

KAMOUN, S.; HRABER, P.; SOBRAL, B.; NUSS, D.; GOVERS, F. Initial assessment of gene diversity of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 28, n. 2, p. 94–106, 1999.

KAMOUN, S.; HUITEMA, E.; VLEESHOUWERS, V.G.A.A. Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response? **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 4, n. 5, p. 196–200, 1999.

KAMOUN, S.; KLUCHER, K.M.; COFFEY, M.D.; TYLER, B.M. A gene encoding a host-specific elicitor protein of *Phytophthora parasitica*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 6, n. 5, p. 573–581, 1993.

KAMOUN, S.; LINDQVIST, H.; GOVERS, F. A novel class of elicitor-like genes from *Phytophthora infestans*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 10, n. 8, p. 1028–1030, 1997.

KAMOUN, S.; van WEST, P.; VLEESHOUWERS, V.G.A.A.; de GROOT, K.E.; GOVERS, F. Resistance of *Nicotiana benthamiana* to *Phytophthora infestans* is mediated by the recognition of the elicitor protein INF1. **The Plant Cell**, Rockville, v. 10, n. 9, p. 1413–1425, 1998.

KAPLAN, D.T.; O'BANNON, J.H. Evaluation and nature of citrus nematode resistance in Swingle citrumelo. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Tallahassee, v. 94, n.1, p. 33–36, 1981.

KATSURA, K.; MIYATA, Y. Swimming behavior of *Phytophthora capsici* zoospores. In: AKAI, S.; OUCHI, S. (Ed.). **Morphological and biochemical events in plant-parasite interaction**. Tōkyō: Phytopathological Society of Japan, 1971. p. 107–128.

KAUL, T.N.; MIDDLETON JUNIOR, E.; OGRA, P.L. Antiviral effects of flavonoids on human viroses. **Journal of Medical Virology**, Hoboken, v. 15, n. 1, p. 71–79, 1985.

KEEN, N.T. Specific elicitors of plant phytoalexin production: determinants of race specificity in pathogens? **Science**, Washington, v. 187, n. 4171, p. 74–75, 1975.

KHEW, K.L.; ZENTMYER, G.A. Chemotactic response of zoospores of five species of *Phytophthora*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 63, n. 12, p. 1511–1517, 1973.

KHEW, K. L.; ZENTMYER, G. A. Electrotactic response of zoospores of seven species of *Phytophthora*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 64, n. 4, p. 500–507, 1974

KO, W.H.; CHASE, L.L. Aggregation of zoospores of *Phytophthora palmivora*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 78, n. 1, p. 79–82, 1973.

KO, W.-H. Chemical stimulation of sexual reproduction in *Phytophthora* and *Pythium*. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v. 39, n. 2, p. 81–86, 1998.

KO, W.-H. Hormonal heterothallism and homothallism in *Phytophthora*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 26, n. 1, p. 57–73, 1988.

KO, W.-H. Hormonal regulation of sexual reproduction in *Phytophthora*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 116, n. 2, p. 459–463, 1980.

KO, W.-H. Isolation and partial characterization of a hormones produced by *Phytophthora parasitica*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 129, n. 5, p. 1397–1401, 1983.

KO, W.-H.; KUNIMOTO, R.K. Hormone production and reception among different isolates of *Phytophthora parasitica* and *P. palmivora*. **Mycologia**, New York, v. 73, n. 3, p. 440–444, 1981.

KOCA, U.; BERHOW, M.A.; FEBRES, V.J.; CHAMP, K.I.; CARRILLO-MENDOZA, O.; MOORE, G.A. Decreasing unpalatable flavonoid components in Citrus: the effect of transformation constructo. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 137, n. 2, p. 101–114, 2009.

KUMAGAI, T. Mycochrome system in the induction of fungal conidiation. In: SENGER, H. (Ed.). **Blue light effects in biological systems**. Berlin: Springer-Verlag, 1984, p. 29–38.

LAI, A.; CIANCIOLO, V.; CHIAVARINI, S.; SONNINO, A. Effects of glandular trichomes on the development of *Phytophthora infestans* infection in potato (*S. tuberosum*). **Euphytica**, Dordrecht, v. 114, n. 3, p. 165–174, 2000.

LANGERON, M. Techniques d'étude des champignons. In: LANGERON, M. **Précis de mycologie: mycologie générale, mycologie médicale**. Paris: Masson et Cie, Éditeurs, 1945. p. 398–507.

LARANJEIRA, F.F.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; COLETTA FILHO, H.D. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Org.). **Citros**. Cordeirópolis: Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Citros Sylvio Moreira; Campinas: Instituto Agronômico de Campinas e Fundação de Apoio à Pesquisa Agrícola, 2005. p. 509–566.

LATIJNHOUWERS, M.; LIGTERINK, W.; VLEESHOUWERS, V.G.A.A.; van WEST, P.; GOVERS, F.A α subunit controls zoospore motility and virulence in the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. **Molecular Microbiology**, Chichester, v. 51, n. 4, p. 925–936, 2004.

LEACH, C. Sporulation of diverse species of fungi under near-ultraviolet radiation. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 40, n. 1, p. 151–161, 1962.

LEITE, B.; RONCATO, L.D.B.; PASCHOLATI, S.F.; LAMBAIS, M.R. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações plantas–fungos patogênicos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo v. 5, n. 1, p. 235–280, 1997.

LI, S.; LO, C.-Y.; HO, C.-T. Hydroxylated polymethoxyflavones and methylated flavonoids in sweet orange (*Citrus sinensis*) peel. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 12, p. 4176–4185, 2006.

LI, S.; LO, C.-Y.; HO, C.-T. Hydroxylated polymethoxyflavones and methylated flavonoids in sweet orange (*Citrus sinensis*) peel. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 12, p. 4176–4185, 2006.

LILLIEFORS, H.W. On the Kolmogorov-Smirnov test for normality with mean and variance unknown. **Journal of the American Statistical Association**, New York, v. 62, n. 318, p. 399–402, 1967.

LINDERMAN, R. G. The role of abscised *Cylindrocladium*-infected azalea leaves in the epidemiology of *Cylindrocladium* wilt of azalea. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 64, n. 4, p. 481–485, 1974.

LO, C.; NICHOLSON, R.L. Phenolic compounds and their importance in plant diseases. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação planta–patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 2008. p. 285–303.

LOPES, A.S.; WOLLUM II, A.G. Comparative effects of methylbromide, propylene oxide, and autoclave sterilization on specific soil chemical characteristics. **Turrialba**, San Jose, v. 26, n. 4, p. 351-355, 1976.

LUCAS, G. B. Black shank. In: LUCAS, G. B. **Disease of tobacco**. New York: The Scarecrow Press, 1958. p. 115–139.

LUDOWICI, V.A.; ZHANG, W.; BLACKMAN, L.M.; HARDHAM, A.R. *Phytophthora nicotianae*. In: LAMOUR, K. (Ed.). **Phytophthora: a global perspective**. Wallingford: Centre for Agriculture and Biosciences International, 2013. p. 113–123. (Centre for Agriculture and Biosciences International. Plant Protection Series, 2).

LUZ, E.D.M.N. O gênero *Phytophthora* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, (Suplemento), v. 31, p. 80–81, 2006.

LUZ, E.D.M.N.; MATSUOKA, K. *Phytophthora*: fungo, protista ou chromista? In: LUZ, E.D.M.N.; SANTOS, Á.F.; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J.L. (Ed.) **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Livraria e Editora Rural, 2001. p. 1–22.

LUZ, E.D.M.N.; SILVA, S.D.V.M.; BEZERRA, J.L.; SOUZA, J.T.; SANTOS, Á.F. **Glossário ilustrado de *Phytophthora***: técnicas especiais para o estudo de Oomicetos. Itabuna: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia/Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira, 2008. 204p.

MABBERLEY, D.J. A classification for edible *Citrus* (Rutaceae). **Telopea**, Sydney, v. 7, n. 2, p. 167–172, 1997.

MACHADO FILHO; J.A.; SIQUEIRA, D.L.; SALOMÃO, L.C.C.; PEREIRA, W.E. **Características dos principais porta-enxertos de citros**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; Pró-Reitoria de Extensão e Cultura, 2003. 22p. (UFV. Boletim de Extensão, 45).

MAHESHWARI, R. Photoresponses and circadian rhythm. [Photoresponse phenomena (Zonations)]. In: MAHESHWARI, R. **Fungi: experimental methods in biology**. 2nd. ed. Boca Raton: CRC Press, 2012. p. 231–247 [p. 232].

MAHMOOD, T.; MEHNAZ, S.; FLEISCHMANN, F.; ALI, R.; HASHMI, Z.H.; IQBAL, Z. Soil sterilization effects on root growth and formation of rhizosheaths in wheat seedlings. **Pedobiologia**, Jena, v. 57, n. 3, p. 123–130, 2014.

MANDALARI, G.; BENNETT, R.N.; BISIGNANO, G.; TROMBETTA, D.; SAIJA, A.; FAULDS, C.B.; GASSON, M.J.; NARBAD, A. Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 103, n. 6, p. 2056–2064, 2007.

MANDEMAKER, A.J.; CUTTING, J.G.M.; SMITH, D.B.; DIXON, J. Effect of Prohexadione-Ca on shoot growth, fruit set and retention in 'Hass' avocado in new zealand. **New Zealand Avocado Grower's Association Annual Research Report**, Tauranga, v. 5, n. 1, p. 35–42, 2005.

MANOHARACHARY, C.; MUKERJI, K.G. Rhizosphere biology — an overview. In: MUKERJI, K. G.; MANOHARACHARY, C.; SINGH, J. (Ed.). **Microbial activity in the rhizosphere**. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2006. p. 1–15. (Springer-Verlag. Soil Biology, 7).

MANTHEY, J.A.; GROHMANN, K.; GUTHRIE, N. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 8, n. 2, p. 135–153, 2001.

MAO, Y.; TYLER, B M. Cloning and sequence analysis of elicitor genes of *Phytophthora sojae*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 20, n. 2, p. 169–172, 1996.

MARAIS, P.G.; HATTINGH, M.J. Exudates from roots of grapevine rootstocks tolerant and susceptible to *Phytophthora cinnamomi*. **Phytophylactica**, Pretória, v. 17, n. 4, p. 205–208, 1985.

MARSH, P.B.; TAYLOR, E.E.; BASSLER, L.M. A guide to the literature on certain effects of light on fungi: reproduction, morphology, pigmentation, and phototropic phenomena. **The Plant Disease Reporter**, Washington, suplemento 261, p. 251–312, 1959.

MARTÍNEZ-NICOLÁS, J.; CONESA-MARTINEZ, A.; PORRAS-CASTILLO, I.; ORTUÑO, A.; del RÍO-CONESA, J.A. Distribución de flavanonas y flavonas en frutos de *Citrus sinensis* (L) Osbeck, cv Sanguinelli cultivados em Murcia. In: CONGRESO IBÉRICO DE AGROINGENIERÍA Y CIENCIAS HORTÍCOLAS, 7., 2013, Madrid. **Resúmenes...** Madrid: Universidad Politécnica de Madrid, 2013. Ref. n. C0351, 6 p.

MASSOLA JÚNIOR, N.S.; DALIO, R.; FLEISCHMANN, F.; OSSWALD, W. A new method to quantify zoospore chemo-attraction. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL UNION OF FOREST RESEARCH ORGANIZATIONS (IUFRO)

WORKING PARTY S07-02-09, 6., 2012, Córdoba. **Proceedings...** Vienna: International Union of Forest Research Organizations, 2012. p. 60.

MEDINA FILHO, H.P.; BORDIGNON, R.; BALLVÉ, R.M.L.; SIQUEIRA, W.J.; CARVALHO, M.R.T. Porta-enxertos híbridos de citros produzidos no Instituto Agrônômico de Campinas. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 13, n. 2, p. 777–792, 1992.

MEDINA FILHO, H.P.; BORDIGNON, R.; SIQUEIRA, W.J.; FEICHTENBERGER, E.; CARVALHO, M.R.T.; TEÓFILO SOBRINHO, J. Resistência de clones e híbridos de porta-enxertos de citros à gomose de tronco causada por *Phytophthora parasitica*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 5, p. 534–540, 2003.

MEDINA FILHO, H.P.; BORDIGNON, R.; SIQUEIRA, W.J.; FEICHTENBERGER, E.; CARVALHO, M.R.T. Tolerância de híbridos e de clones de porta-enxertos de citros à infecção de raízes por *Phytophthora nicotianae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 169–178, 2004.

MEDINA, C.L.; MACHADO, E.C.; GOMES, M.M.A. Condutância estomática, transpiração e fotossíntese em laranjeira ‘Valência’ sob deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 11, n. 1, p. 29–34, 1999.

MEHROTRA, R.S. Techniques for demonstrating accumulation of zoospores of *Phytophthora* species on roots in soil. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 48, n. 5, p. 879–882, 1970.

MELO, M.M.; REIS, E.M. Efeito de substratos, luz e sobreposição de papel de filtro na esporulação de *Corynespora cassiicola*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n. 3, p. 251–253, 2010.

MENEZES, M.; ASSIS, S.M.P. Limpeza e esterilização em fitopatologia (Esterilização de solos para vasos.). In: MENEZES, M.; ASSIS, S.M.P. **Guia prático para fungos fitopatogênicos**. 2. ed. Recife: UFRPE, 2004. p. 11–17. [p. 16–17].

MÉTRAUX, J.-P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 13–18, 2001.

MEYER, M.C.; SILVA, J.C.; MAIA, G.L.; BUENO, C.J.; SOUZA, N L. Mancha de mirotécio em algodoeiro causada por *Myrothecium roridum*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 4, p. 390–393, 2006.

MEYER, V.R. Detectors. In: MEYER, V.R. **Practical High-Performance Liquid Chromatography**. 5th ed. New York: John Wiley & Sons, 2010. p. 91–115.

MICHEREFF, S.J.; PERUCH, L.A.M.; ANDRADE, D.E.G. T. Manejo integrado de doenças radiculares. In: MICHEREFF, S.J.; ANDRADE, D.E.G.T.; MENEZES, M. (Ed.). **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005. p. 367–388.

MILLER, P.M. V-8 juice agar as a general-purpose medium for fungi and bacteria. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 45, n. 8, p. 461–462, 1955.

MINUSSI, E.; MACHADO, C.C.; MENTEN, J.O.M.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeitos de diferentes regimes de luz na esporulação de *Stemphylium solani* Weber em meio de cultura. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 2, n. 2, p. 167–171, 1977.

MITCHELL, D.J.; KANNWISCHER-MITCHELL, M.E. *Phytophthora*. In: SINGLETON, L L. MIHAIL, J.D.; RUSH, C.M. (Ed.). **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1992. p. 31–38.

MITCHELL, R.T.; DEACON, J.W. Differential (host-specific) accumulation of zoospores of *Pythium* on roots of graminaceous and non-graminaceous plants. **New Phytologist**, Oxford, v. 102, n. 1, p. 113–122, 1986.

MOORE, G.A. Oranges and lemons: clues to the taxonomy of *Citrus* from molecular markers. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 17, n. 9, p. 536–540, 2001.

MORRIS, B.M.; GOW, N.A.R. Mechanism of electro taxis of zoospores of phytopathogenic fungi. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, n. 8, p. 877–882, 1993.

MORRIS, B.M.; REID B.; GOW, N.A.R. Tactic responses of zoospores of the fungus *Phytophthora palmivora* to solutions of different pH in relation to plant infection. **Microbiology**, London, v.141, n. 5, p. 1231–1237, 1995.

MORRIS, B. M.; REID, B.; GOW, N. A. R. Electro taxis of zoospores of *Phytophthora palmivora* at physiologically relevant field strengths. **Plant, Cell and Environment**, Chichester, v. 15, n. 6, p. 645–653, 1992.

MORRIS, P. F.; BONE, E.; TYLER, B. M. Chemotropic and contact responses of *Phytophthora sojae* hyphae to soybean isoflavonoids and artificial substrates. **Plant Physiology**, Rockville, v. 117, n. 4, p.1171–1178, 1998.

MORRIS, P.F.; WARD, E.W.B. Chemoattraction of zoospores of the soybean pathogen, *Phytophthora sojae*, by isoflavones. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 40, n. 1, p.17–22, 1992.

MÜLLER, D.G. Quantitative evaluation of sexual chemotaxis in two marine brown algae. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v. 80, n. 2, p. 120–130, 1976.

MÜLLER, G.W.; DE NEGRI, J.D.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; MATTOS JÚNIOR, D.; POMPEU JÚNIOR, J.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; CARVALHO, S.A.; GIROTTO, L.F.; MACHADO, M.A. Morte súbita dos citros: uma nova doença na citricultura brasileira. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 23, n. 2, p. 371–386, 2002b.

MÜLLER, G.W.; DE NEGRI, J.D.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; MATTOS JÚNIOR, D.; POMPEU JÚNIOR, J.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; MACHADO, M.A.; CARVALHO, S.A.; GIROTTO, L.F. Citrus Sudden Death: a new citrus disease in Brazil. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 15., 2001, Paphos. **Proceedings...** Riverside: International Organization of Citrus Virologists; Department of Plant Pathology, University of California, 2002a. p. 405–407.

NAQVI, S.A.M.H. Diagnosis and management of certain important fungal diseases of citrus. In: NAQVI, S.A.M.H. (Ed.). **Diseases of fruits and vegetables: diagnosis and management**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, v. 1, 2004. p. 247–290.

NICHOLSON, R.L. Events in resistance expression in maize and sorghum: molecular and biochemical perspectives. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 21, n. 1, p. 95–99, 1995.

NICHOLSON, R.L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopatology**, Palo Alto, v. 30, n. 1, p. 369–389, 1992.

NOBEL, P.S. Leaves and fluxes. In: NOBEL, P. S. **Physicochemical and environmental plant physiology**. 3rd ed. San Diego: Academic Press, 2005. p. 351–418.

NOGATA, Y.; OHTA, H.; SUMIDA, T.; SEKIYA, K. Effect of extraction method on the concentrations of selected bioactive compounds in mandarin juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 25, p. 7346–7351, 2003.

NOZAKI, M.H.; CAMARGO, M.; BARRETO, M. Caracterização de *Diaporthe citri* em diferentes meios de cultura, condições de temperatura e luminosidade. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 429–432, 2004.

OCHIAI, N.; DRAGIILA, M.I.; PARKE, J.L. Pattern swimming of *Phytophthora citricola* zoospores: an example of microbial bioconvection. **Fungal Biology**, Manchester, v. 115, n. 3, p. 228–235, 2011.

OJIKI, M.; MOLLI, S.D.; KANAZAWA, H.; YAJIMA, A.; TODA, K.; NUKADA, T.; MAO, H.; MURATA, R.; ASANO, T.; QI, J.; SAKAGAMI, Y. The second *Phytophthora* mating hormone defines interspecies biosynthetic crosstalk. **Nature Chemical Biology**, New York, v. 7, n. 9, p. 591-593, 2011.

OLIVEIRA, J.B. Solos para citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.C.P.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A.A. (Ed.). **Citricultura brasileira**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, v. 1, 1991. p. 196–227. (Fundação Cargill, Série Técnico-científica, 176).

OLIVEIRA, J.M. **Caracterização morfológica, molecular e patogênica de espécies de *Phytophthora* associadas aos citros**. 2008. 50p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

OLIVEIRA, R.P.; SOARES FILHO, W.S.; PASSOS, O.S.; SCIVITTARO, W.B.; ROCHA, P.S.G. Histórico dos porta-enxertos de citros no Brasil. In: OLIVEIRA, R. P.; SOARES FILHO, W.S.; PASSOS, O.S.; SCIVITTARO, W.B.; ROCHA, P.S.G. **Porta-enxertos para citros**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008a. p.13–14. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 226).

OLIVEIRA, R.P.; SOARES FILHO, W.S.; PASSOS, O.S.; SCIVITTARO, W.B.; ROCHA, P.S.G. Produção de porta-enxertos de citros. In: OLIVEIRA, R.P.; SOARES FILHO, W.S.; PASSOS, O.S.; SCIVITTARO, W.B.; ROCHA, P.S.G. **Porta-enxertos para citros**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008b. p.15–25. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 226).

OLIVEIRA, R.P.; SOARES FILHO, W.S.; PASSOS, O.S.; SCIVITTARO, W.B.; ROCHA, P.S.G. Características dos principais porta-enxertos de citros. In: OLIVEIRA, R.P.; SOARES FILHO, W. S.; PASSOS, O. S.; SCIVITTARO, W.B.;

ROCHA, P.S.G. **Porta-enxertos para citros**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008c. p.25–32. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 226).

OMOKOLO, N.D.; NANKEU, D.J.; NIEMENAK, N.; BOUDJEKO, T. Variation of β -1,3-glucanase, chitinase and polyphenoloxidase activities in cacao pods upon *Phytophthora megakarya* inoculation. **African Crop Science Journal**, Kampala, v. 11, n. 2, p. 97–106, 2003.

OßWALD, W.; FLEISCHMANN, F.; RIGLING, D.; COELHO, A.C.; CRAVADOR, A.; DIEZ, J.; DALIO, R.J.; HORTA-JUNG, M.; PFANZ, H.; ROBIN, C.; SIPOS, G.; SOLLA, A.; CECH, T.; CHAMBERY, A.; DIAMANDIS, S.; HANSEN, E.; JUNG, T.; ORLIKOWSKI, L.B.; PARKE, J.; PROSPERO, S.; WERRES, S. Strategies of attack and defence in woody plant–*Phytophthora* interactions. **Forest Pathology**, Hamburg, v. 44, n. 3, p. 169–190, 2014.

PARENTE, R.C.P. **Aspectos da análise de resíduos**. 1984. 139p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1984.

PASCHOLATI, S.F. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 1, 2011b. p. 593–636.

PASCHOLATI, S.F. Fisiologia do parasitismo: como os fitopatógenos atacam as plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 1, 2011a. p. 543–591.

PASCHOLATI, S.F.; STANGARLIN, J.R.; LEITE, B.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Mecanismos de patogenicidade em fungos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 6, n. 1, p. 1–47, 1998.

PELCZAR JR., M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. Nutritional requirement and microbiological media (Media used for cultivating microorganisms). In: PELCZAR JR., M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiology: an application based approach**. New Delhi: Tata McGraw-Hill Education, 2010. p. 134–154. [p. 138].

PHYTOPHTHORA DATABASE. ***Phytophthora nicotianae* (Species Detail Information. Cyber-infrastructure for *Phytophthora*)**. State College: The Pennsylvania State University, 2014. Disponível em:

<<http://www.phytophthoradb.org/species.php?a=dv&id=16086>>. Acesso em: 05 nov. 2014.

PIO, R.M.; FIGUEIREDO, J.O.; STUCHI, E S.; CARDOSO, S.A.B. Variedades copas. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Org.). **Citros**. Cordeirópolis: Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Citros Sylvio Moreira; Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas e Fundação de Apoio à Pesquisa Agrícola, 2005. p. 37–60.

PIRANI, J.R. **A ordem Rutales na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil**. 1982. 258 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas/Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1982.

PIRES, G.C.C.; APARECIDO, C.C.; FINATTI, D. Preservação em laboratório de fungos filamentosos por longos períodos de tempo. **O Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 1, p. 9–16, 2012

POMPEU JÚNIOR, J. Porta-enxertos para citros. In: RODRIGUEZ, O. VIÉGAS, F.C.P. (Ed.). **Citricultura brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, v. 1, 1980. p. 279–296.

POMPEU JÚNIOR, J. Porta-enxertos. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Org.). **Citros**. Cordeirópolis: Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Citros Sylvio Moreira; Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas e Fundação de Apoio à Pesquisa Agrícola, 2005. p. 61–104.

POMPEU JÚNIOR, J. Porta-enxertos. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.C.P.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A.A. (Ed.). **Citricultura brasileira**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, v. 1, 1991. p. 265–280. (Fundação Cargill, Série Técnico-científica, 176).

PONCHET, M.; PANABIÈRES, F.; MILAT, M.-L.; MIKES, V.; MONTILLET, J.-L.; SUTY, L.; TRIANTAPHYLIDES, C.; TIRILLY, Y.; BLEIN, J.-P. Are elicitors cryptograms in the plant–Oomycete communications? **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 56, n. 11/12, p. 1020–1047, 1999.

PORTER, J. R.; SHAW, D. S. Aggregation of *Phytophthora drechsleri* zoospores; pattern analysis suggests a taxis. **Transactions of the British Mycological Society**, Manchester, v. 71, n. 3, p. 515–518, 1978.

PULZ, P. **Crescimento e esporulação de *Alternaria dauci* e *A. solani* em meio de cultura**. 2007. 68 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

PULZ, P.; MASSOLA JR., N.S. Efeito de meios de cultura e fatores físicos no crescimento e esporulação de *Alternaria dauci* e *A. solani*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 2, p. 121–126, 2009.

QUTOB, D.; HRABER, P.; SOBRAL, B.; GIJZEN, M. Comparative analysis of expressed sequences in *Phytophthora sojae*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 123, n. 1, p. 243–253, 2000.

QUTOB, D.; KEMMERLING, B.; BRUNNER, F.; KÜFNER, I.; ENGELHARDT, S.; GUST, A.A.; LUBERACKI, B.; SEITZ, H.U.; STAHL, D.; RAUHUT, T.; GLAWISCHNIG, E.; SCHWEEN, G.; LACOMBE, B.; WATANABE, N.; LAM, E.; SCHLICHTING, R.; SCHEEL, D.; NAU, K.; DODT, G.; HUBERT, D.; GIJZEN, M.; NÜRNBERGER, T. Phytotoxicity and innate immune responses induced by Nep1-like proteins. **The Plant Cell**, Rockville, v. 18, n. 12, p. 3721–3744, 2006.

RADEMACHER, W. Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 51, n. 1, p. 501–531, 2000.

RADEMACHER, W.; KOBER, R. Efficient use of Prohexadione-Ca in pome fruits. **European Journal of Horticultural Science**, Stuttgart, v. 68, n. 3, p. S101–S107, 2003.

RADEMACHER, W.; STAMMLER, G.; CREEMERS, P. Prohexadione-Ca: effects against scab in apples. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 89, n. 6S, p. S63–S64, 1999.

RADEMACHER, W.; TEMPLE-SMITH, K.E.; GRIGGS, D. L.; HEDDEN, P. The mode of action of acylcyclohexanediones — a new type of growth retardant. In: KARSSSEN, C. M.; van LOON, L. C.; VREUGDENHIL, D. (Ed.). **Progress in plant growth regulation**. Dordrecht: Springer Science, 1992. p. 571–577. (Springer Science. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, 13).

RADEMACHER, W.; van SAARLOOS, K.; GARUZ-PORTE, J.A.; RIERA-FORCADES, F.; SENECHAL, Y.; ANDREOTTI, C.; SPINELLI, F.; SABATINI, E.; COSTA, G. Impact of Prohexadione-Ca on the vegetative and reproductive performance of apple and pear trees. **European Journal of Horticultural Science**, Stuttgart, v. 69, n. 6, p. S221–S228, 2004.

RAMPAZZO, V.; TAKIKAWA, A.Y.; HAMINIUK, C.W.I. Quantificação de compostos fenólicos em frutas vermelhas (*Fragaria vesca*, *Rubus idaeus*, *Morus nigra*). In: SEMINÁRIO DE EXTENSÃO E INOVAÇÃO, 2., 2012, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2012. 7 p. Disponível em: <[http://www.sei.utfpr.edu.br/sei_anais/trabalhos/comunicacao_oral/Sala%20E/QUANTIFICA%C3%87%C3%83O%20DE%20COMPOSTOS%20FEN%C3%93LICOS%20EM%20FRUTAS%20VERMELHAS%20\(Fragaria%20vesca,%20Rubus%20idaeus,%20Morus%20nigra\).pdf](http://www.sei.utfpr.edu.br/sei_anais/trabalhos/comunicacao_oral/Sala%20E/QUANTIFICA%C3%87%C3%83O%20DE%20COMPOSTOS%20FEN%C3%93LICOS%20EM%20FRUTAS%20VERMELHAS%20(Fragaria%20vesca,%20Rubus%20idaeus,%20Morus%20nigra).pdf)>. Acesso em: 08 jun. 2015.

REGOS, I.; TREUTTER, D. Optimization of a high-performance liquid chromatography method for the analysis of complex polyphenol mixtures and application for sainfoin extracts (*Onobrychis viciifolia*). **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, n. 40, p. 6169–6177, 2010.

RESENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.L.; CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 123–130. 2003.

RIBEIRO, O.K. Physiology of asexual sporulation and spore germination in *Phytophthora*. In: ERWIN, D.C.; BARTNICKI-GARCIA, S.; TSAO, P.H. (Ed.). **Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology**. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1983. p. 55–70.

RIBEIRO, O.K.; BAUMER, J.S. Techniques for sporangia production of *Phytophthora megasperma* isolates. **Phytophthora Newsletter**, Bangor, v. 1, n. 5, p. 42–43, 1977.

RIBEIRO, O.K.; ZENTMYER, G.A.; ERWIN, D.C. Comparative effects of monochromatic radiation on the germination of oospores of three *Phytophthora* spp. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 65, n. 8, p. 904–907, 1975.

RIKER, A.J.; RIKER, R.S. Culture media. In: RIKER, A.J.; RIKER, R.S. **Introduction to research on plant diseases: a guide to the principles and practice for studying various plant-disease problems**. Saint Louis, Chicago, New York, Indianapolis: John S. Swift Company, Inc., 1936. p. 26–35 [p.28].

ROEMMELT, S.; ZIMMERMANN, N.; RADEMACHER, W.; TREUTTER, D. Formation of novel flavonoids in apple (*Malus × domestica*) treated with the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase inhibitor prohexadione-Ca. **Phytochemistry**, New York, Oxford, v. 64, n. 3, p. 709–716, 2003.

ROGERS, J.S.; GRAHAM, J.H.; McCOY, C.W. Insect–plant pathogen interactions: preliminary studies of *Diaprepes* root weevil injuries and *Phytophthora* infections.

Proceedings of the Florida State Horticultural Society, Tallahassee, v. 109, n.1, p. 57–62, 1996.

ROSA, D.D.; CAMPOS, M.A.; TARGON, M.L.P.N.; SOUZA, A.A. *Phytophthora parasitica* transcriptome, a new concept in the understanding of the citrus gummosis. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 3, supl., p. 997–1008, 2007.

ROSE, J.K.C.; HAM, K.-S.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. Molecular cloning and characterization of glucanase inhibitor proteins: coevolution of a counterdefence mechanism by plant pathogens. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 6, p. 1329–1345, 2002.

ROSSETTI, V. Estudos sobre a “gomose de *Phytophthora*” dos citrus. I — Suscetibilidade de diversas espécies cítricas a algumas espécies de “*Phytophthora*”. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 97–124, 1947–1948.

ROYLE, D.J.; HICKMAN, C.J. Analysis of factors governing in vitro accumulation of zoospores of *Pythium aphanidermatum* on roots: I. Behavior of zoospores. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 10, n. 2, p. 151–162, 1964.

SALAS, C.; ZAMORA, H.M. $\beta(1,3)$ glucanasas de los espacios intercelulares de hojas de tomate *Lycopersicon esculentum ceraciforme* después de infección con *Phytophthora infestans*. **Revista Colombiana de Química**, Bogotá, v. 38, n.1, p. 43–59, 2009.

SALIBE, A.B.; JAEHN, A. Reação de doze porta-enxertos cítricos ao nematóide *Tylenchulus semipenetrans* Cobb, 1913. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 20, n. 1, p. 44–52, 1996.

SANTOS, G.R.; DIAS NETO, J.J.; NASCIMENTO, I.R.; CASTRO, H.G.; CASTRO NETO, M.D. Influência da idade, número de repicagens e coloração dos micélios na esporulação de isolados de *Magnaporthe oryzae*, causador da brusone em arroz no Estado do Tocantins. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, Guarapuava, v. 3, n. 3, p. 113–124, 2010.

SANTOS, J.S.; LOPES, P.R.C.; OLIVEIRA, I.V.M.; SILVA, R.R.S.; SANTOS, T. I.S.S. Prohexadione cálcio no controle do crescimento da macieira ‘Princesa’ no Submédio do Vale do São Francisco. In: CONGRESSO TÉCNICO CIENTÍFICO DA ENGENHARIA E DA AGRONOMIA, 71.; SEMANA OFICIAL DA ENGENHARIA E DA AGRONOMIA, 71., 2014, Teresina. **Anais...** Teresina: Universidade Federal do Piauí, 2014. 4 p. Disponível em:

<<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/109516/1/Paulo-Roberto-2.pdf>>. Acesso em: 14 jun. 2015.

SANTOS, M.V.O. ***Phytophthora* spp. em cultivos diversos no sul da bahia e identificação de agentes de biocontrole a estes patógenos**. 2010. 92 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2010.

SAVITA, G.S.V.; NAGPAL, A. Citrus diseases caused by *Phytophthora* species. **GERF Bulletin of Biosciences**, Lucknow, v. 3, n. 1, p. 18–27, 2012.

SAVORY, A.I.M.; GRENVILLE-BRIGGS, L.J.; WAWRA, S.; VAN WEST, P.; DAVIDSON, F.A. Auto-aggregation in zoospores of *Phytophthora infestans*: the cooperative roles of bioconvection and chemotaxis. **Journal of the Royal Society Interface**, London, v. 11, n. 94, 8 p. (20140017), 2014.

SCHÄFER, G.; BASTIANEL, M.; DORNELLES, A.L.C. Porta-enxertos utilizados na citricultura. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 4, p. 723–733, 2001.

SCHÖTTELNDREIER, M.; FALKENGREN-GRERUP, U. Plant induced alteration in the rhizosphere and the utilisation of soil heterogeneity. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 209, n. 2, p. 297–309, 1999.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Mecanismos bioquímicos e defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 2008. p. 227–248.

SCORA, R.W. On the history and origin of citrus. **The Bulletin of the Torrey Botanical Club**, New York, v. 102, n. 6, p. 369–375, 1975.

SENTELHAS, P.C. Agrometeorologia dos citros. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Org.). **Citros**. Cordeirópolis: Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Citros Sylvio Moreira; Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas e Fundação de Apoio à Pesquisa Agrícola, 2005. p. 317–344.

SHAPIRO, A.; MULLINS, J.T. Hyphal tip growth in *Achlya bisexualis*. I. Distribution of 1,3- β -glucans in elongating and non-elongating regions of the wall. **Mycologia**, New York, v. 94, n. 2, p. 267–272, 2002.

SHAPIRO, S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, Oxford, v. 52, n. 3–4, p. 591–611, 1965.

SILVA, A.L.L.; BISOGNIN, D.A. Resistência a doenças em *Solanum tuberosum* L. – Solanaceae: artigo de revisão. **Caderno de Pesquisa. Série Biologia**, Santa Cruz do Sul, v. 16, n. 2, p. 117–129, 2004.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 71–78, 2002.

SILVA, G.S.; DOIHARA, I.P. Uma técnica para obter abundante esporulação de *Phytophthora palmivora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 5, p. 568–568, 2003.

SILVA, R.A.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.L. Estratégias de ataque desenvolvidas por fitopatógenos. In: SILVA, R.A.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.L. **Defesa de plantas contra o ataque de fitopatógenos**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008b. p. 29–33. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 250).

SILVA, R.A.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.L. Processos de indução de resistência. In: SILVA, R.A.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.L. **Defesa de plantas contra o ataque de fitopatógenos**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008a. p. 12–19. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 250).

SIVIERO, A. **Avaliação de métodos de inoculação de *Phytophthora parasitica* e mapeamento de QTLs de resistência em híbridos de *Citrus sunki* vs. *Poncirus trifoliata* a gomose**. 2001. 114 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2001.

SIVIERO, A.; FURTADO, E.L.; MACHADO, M.A. Métodos de inoculação e avaliação de doenças causadas por *Phytophthora* em citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 23, n. 1, p. 203–219, 2002.

SIVIERO, A.; FURTADO, E.L.; MACHADO, M.A. Métodos de inoculação de *Phytophthora parasitica* em citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 23, n. 1, p.203–219, 2002.

SNEDECOR, G.W. Single criterion of classification. In: SNEDECOR, G.W. **Calculation and interpretation of analysis of variance and covariance**. Ames: Collegiate Press, 1934. p. 3–20. (Iowa State College. Division of Industrial Science. Monograph, 1).

SOARES FILHO, W.S.; MOREIRA, C.S.; CUNHA, M.A.P.; CUNHA SOBRINHO, A.P.; PASSOS, O.S. Poliembrionia e frequência de híbridos em *Citrus* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 4, p. 857–864, 2000.

SOLAR, A.; JAKOPIC, J.; NOUR, V.; MIKULIC-PETKOVSEK, M.; VEBERIC, R.; BOTU, M.; STAMPAR, F. Prohexadione-Ca induces reduction in bacterial blight severity and alteration in phenolic content in walnuts. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 94, n. S1, p. S1.47–S1.52, 2012.

SONNEVELD, C. Changes in chemical properties of soil caused by steam sterilization. In: MULDER, D. (Ed.). **Soil disinfestation**. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing, 1979. p. 39–50. (Elsevier Scientific Publishing. Developments in Agricultural and Managed-Forest Ecology, 6).

SOOST, R.K.; CAMERON, J.W. *Citrus*. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (Ed.). **Advances in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1975. p. 507–540.

SOUZA, E.L.S.; SCHWARZ, S.F.; OLIVEIRA, R.P. Porto-enxertos para citros no Rio Grande do Sul. In: SOUZA, P.V.D.; SOUZA, E.L.S.; OLIVEIRA, R.P.; BONINE, D.P. (Ed.). **Indicações técnicas para a citricultura no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, 2010. p. 19–29.

SPECIES FUNGORUM. **Synonymy (*Phytophthora nicotianae* Breda de Haan)**. Egham: Centre for Agriculture and Biosciences International, 2014. Disponível em: <<http://www.speciesfungorum.org/Names/SynSpecies.asp?RecordID=194443>>. Acesso em: 06 nov. 2014.

SPIEGEL-ROY, P.; GOLDSCHMIDT, E.E. History and growing of citrus. In: SPIEGEL-ROY, P.; GOLDSCHMIDT, E.E. **The biology of *Citrus***. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. p. 4–18. (Cambridge University Press, The Biology of Horticultural Crops).

SPINELLI, F.; RADEMACHER, W.; SABATINI, E.; COSTA, G. Reduction of scab incidence (*Venturia inaequalis*) in apple with prohexadione-Ca and trinexapac-ethyl, two growth regulating acylcyclohexanediones. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 29, n. 7, p. 691–698, 2010.

STAMATO JÚNIOR, R.P. **Condições meteorológicas e consumo de água por mudas cítricas em ambiente protegido**. 2007. 67 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia da Produção Agrícola) – Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 2007.

STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; TOLEDO, M.V.; PORTZ, R.L; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; PASCHOLATI, S.F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v. 10, n. 1, p. 18–46, 2011.

STANGARLIN, J.R.; LEITE, B. Alterações fisiológicas na suscetibilidade. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação planta-patógenos: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: Fealq, 2008. p. 177–226.

STINTZI, A.; HEITZ, T.; PRASAD, V.; WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; KAUFFMANN, S.; GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, Paris, v. 75, n. 8, p. 687–706, 1993.

STUDENT. The probable error of a mean. **Biometrika**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 1–25, 1908.

SULLIVAN, M.J. **Characterization and management of the race structure of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae***. 2004. 148 p.. Ph. D. Dissertation (Doctor of Philosophy) – Graduate Faculty, North Carolina State University, Raleigh, 2004.

SUMBALI, G.; MEHROTRA, R.S. Growth, culture and maintenance of microorganisms (Culture media and types). In: SUMBALI, G.; MEHROTRA, R. S. **Principles of microbiology**. New Delhi: Tata McGraw-Hill Education, 2009. p. 71–124. [p. 98].

SWINGLE, W.T.; REECE, P.C. The botany of citrus and its wild relatives. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (Ed.). **The Citrus industry: history, world distribution, botany, and varieties**. Berkeley: University of California Press; Division of Agricultural Sciences, v. 1, 1967. p. 190–430.

TAKAYAMA, T.; MIZUTANI, J.; TAHARA, S. Drop method as a quantitative bioassay method of chemotaxis of *Aphanomyces cochlioides* zoospore. **Annals of the Phytopathological Society of Japan = Nihon Shokubutsu Byōri Gakkaiho**, Tōkyō, v. 64, n. 3, p. 175–178, 1998.

TANAKA, T. *Citrus sunki* Hort. ex Tanaka. In: TANAKA, T. **Species problem in *Citrus***: a critical study of wild and cultivated units of *Citrus*, based upon field studies in their native homes. (*Revisio Aurantiacearum IX*). Tōkyō: Japanese Society for the Promotion of Science, 1954. p. 137. (Japanese Society for the Promotion of Science. Tōkyō Agricultural University, Technical Paper, 10).

TANAKA, T. Ecological and geographical view of *Citrus* culture in the Pacific region. **The Memoirs of the Tanaka Citrus Experiment Station**, Tanushimaru, v. 1, n. 1, p. 37–49, [p. 42], 1927.

TARIQ, V.N. Factors influencing zoosporangia formation by *Phytophthora fragariae* *in vitro*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 94, n. 2, p. 205–210, 1990.

TAVARES, M.F.F. **O mercado futuro de suco de laranja concentrado e congelado**: um enfoque analítico. 2006. 279 p. Tese (Doutorado em Agronegócios) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

TEIXEIRA, H.; CHITARRA, L.G.; ARIAS, S.M.S.; MACHADO, J.C. Efeito de diferentes fontes de luz no crescimento e esporulação *in vitro* de fungos fitopatogênicos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 6, p. 1314–1320, 2001.

THANSEEM, I.; JOSEPH, A.; THULASEEDHARAN, A. Induction and differential expression of β -1,3-glucanase mRNAs in tolerant and susceptible *Hevea* clones in response to infection by *Phytophthora meadii*. **Tree Physiology**, Oxford, v. 25, n. 11, p. 1361–1368, 2005.

THE AUSTRALIAN NATIONAL UNIVERSITY (Australia). CAHILL, D. M; HARDHAM, A. R. **Detection of motile organisms in a sample EP0663015 A1**. 22 set. 1993. 19 jul. 1995.

THE AUSTRALIAN NATIONAL UNIVERSITY (Australia). HARDHAM, A. R.; CAHILL, D. M. **Detection of motile fungal zoospores in a sample US 5817472 A**. 22 set. 1993. 6 out. 1998.

THE AUSTRALIAN NATIONAL UNIVERSITY (Australia). HARDHAM, A. R.; CAHILL, D. M. **Detection of motile cells in a sample EP 0663015 B1**. 22 set. 1993. 13 fev. 2002.

THOM, C.; CHURCH, M.B. Culture of *Aspergilli*. In: THOM, C.; CHURCH, M. B. **The *Aspergilli***. Baltimore: Williams & Wilkins, 1926. p. 39–46. [p. 39].

THOMAS, D.D.; PETERSON, A.P. Chemotactic auto-aggregation in the water mould *Achlya*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 136, n. 5, p. 847–853, 1990.

THOMIDIS, T.; EXADAKTYLOU, E.; SOTIROPOULOS, T. Susceptibility of three citrus rootstocks towards *Phytophthora cactorum*, *P. citrophthora*, *P. parasitica* and *P. citricola*. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz = Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v. 112, n. 2, p. 204–207, 2005.

THORNE, R.F. The classification and geography of the flowering plants: Dicotyledons of the class Angiospermae (subclasses Magnoliidae, Ranunculidae, Caryophyllidae, Dilleniidae, Rosidae, Asteridae, and Lamiidae). **The Botanical Review**, New York, v. 66, n. 4, p. 441–647, 2000.

TIAN, M.; BENEDETTI, B.; KAMOUN, S. A second kazal-like protease inhibitor from *Phytophthora infestans* inhibits and interacts with the apoplastic pathogenesis-related protease P69B of tomato. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 138, n. 3, p. 1785–1793, 2005.

TIMMER, L.W.; AGOSTINI, J.P.; GRAHAM, J.H.; CASTLE, W.S. Relationship of citrus rootstocks to *Phytophthora* root rot and populations of *Phytophthora parasitica*. **Proceedings of the Florida State for Horticultural Society**, Tallahassee, v. 104, n. 1, p. 173–178, 1991.

TIMMER, L.W.; GARNSEY, S.M.; BROADBENT, P. Diseases of *Citrus*. In: PLOETZ, R. C. (Ed.). **Diseases of tropical fruit crops**. Wallingford: Centre for Agriculture and Biosciences International, 2003. p. 163–195. [175–176].

TIMMER, L.W.; MENGE, J. A. *Phytophthora*-induced diseases. In: WHITESIDE, J. O.; GARNSEY, S.M.; TIMMER, L.W. (Ed.). **Compendium of citrus diseases**. Saint Paul: The American Phytopathological Society Press, 1988. p. 22–24.

TONÓN, C.; GUEVARA, G.; OLIVA, C.; DALEO, G. Isolation of a potato acidic 39 kDa β -1,3-glucanase with antifungal activity against *Phytophthora infestans* and analysis of its expression in potato cultivars differing in their degrees of field resistance. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 150, n. 4–5, p. 189–195, 2002.

TREUTTER, D.; SANTOS-BUELGA, C.; GUTMANN, M.; KOLODZIEJ, H. Identification of flavan-3-ols and procyanidins by high-performance liquid chromatography and chemical reaction detection. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 667, n. 1/2, p. 290–297, 1994.

TROUTMAN, J.L.; WILLS, W.H. Electrotaxis of *Phytophthora parasitica* zoospores and its possible role in infection of tobacco by the fungus. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 54, n. 2, p. 225–228, 1964.

TSUJI, M.; MORI, H.; YAMAMOTO, T.; TANAKA, S.; KANG, Y.; SAKURAI, K.; IWASAKI, K. Manganese toxicity of melon plants growing on an isolated soil bed after steam sterilization. **Journal of the Science of Soil and Manure**, Tokyo, v. 77, n. 3, p. 257–263, 2006. (Artigo em japonês com abstract em inglês).

TUKEY, J.W. One degree of freedom for non-additivity. **Biometrika**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 232–242, 1949.

TUKEY, J.W. **The problem of multiple comparisons**. Princeton: Princeton University, 1953. 396 p. [Notas mimeografadas]. [Manuscrito não-publicado].

TYLER, B.M. Molecular basis of recognition between *Phytophthora* pathogens and their hosts. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, n. 1, p. 137–167, 2002.

TYLER, B. M. *Phytophthora sojae*: root rot pathogen of soybean and model oomycete. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2007.

TYLER, B.M.; TRIPATHY, S.; ZHANG, X.; DEHAL, P.; JIANG, R.H.Y.; AERTS, A.; ARREDONDO, F.D.; BAXTER, L.; BENSASSON, D.; BEYNON, J.L.; CHAPMAN, J.; DAMASCENO, C.M.B.; DORRANCE, A.E.; DOU, D.; DICKERMAN, A.W.; DUBCHAK, I.L.; GARBELOTTO, M.; GIJZEN, M.; GORDON, S.G.; GOVERS, F.; GRUNWALD, N.J.; HUANG, W.; IVORS, K.L.; JONES, R.W.; KAMOUN, S.; KRAMPIS, K.; LAMOUR, K. H.; LEE, M.-K.; MCDONALD, W.H.; MEDINA, M.; MEIJER, H.J.G.; NORDBERG, E.K.; MACLEAN, D. J.; OSPINA-GIRALDO, M. D.; MORRIS, P.F.; PHUNTUMART, V.; PUTNAM, N.H.; RASH, S.; ROSE, J.K.C.; SAKIHAMA, Y.; SALAMOV, A.A.; SAVIDOR, A.; SCHEURING, C.F.; SMITH, B.M.; SOBRAL, B.W.S.; TERRY, A.; TORTO-ALALIBO, T.A.; WIN, J.; XU, Z.; ZHANG, H.; GRIGORIEV, I.V.; ROKHSAR, D.S.; BOORE, J.L. *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. **Science**, Washington, v. 313, n. 5791, p. 1261–1266, 2006.

TYLER, B.M.; WU, M.-H.; WANG, J.-M.; CHEUNG, W.; MORRIS, P.F. Chemotactic preferences and strain variation in the response of *Phytophthora sojae* zoospores to host isoflavones. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 8, p. 2811–2817, 1996.

UMEMOTO, N.; KAKITANI, M.; IWAMATSU, A.; YOSHIKAWA, M.; YAMAOKA, N.; ISHIDA, I. The structure and function of a soybean β -glucan-elicitor-binding protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, n. 3, p. 1029–1034, 1997.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE. **Citrus**: world markets and trade. Washington: United States Department of Agriculture, July 2015. 11 p. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>>. Acesso em: 27 ago. 2015.

van BREDA DE HAAN, J. De bibitziekte in de Deli-tabak veroorzaakt door *Phytophthora nicotianae*. **Mededeelingen uit 's Lands Plantentuin**, Batavia (Jakarta), v. 15, n. 1, p. 1–107 [p. 57], 1896.

van WEST, P.; MORRIS, B.M.; REID, B.; APPIAH, A.A.; OSBORNE, M.C.; CAMPBELL, T.A.; SHEPHERD, S.J.; GOW, N.A.R. Oomycete plant pathogens use electric fields to target roots. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 15, n. 8, p. 790–798, 2002.

van WEST, P.; VLEESHOUWERS, V.G.A.A. The *Phytophthora infestans*–potato interaction. In: TALBOT, N.J. (Ed.). **Plant-Pathogen interactions**. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.; Boca Raton: CRC Press LLC, 2004. p. 219–242. (Blackwell Publishing. CRC Press. Annual Plant Reviews, 11).

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. Families of phenolic compounds and means of classification. In: VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. **Phenolic compound biochemistry**. 2006a. p. 1–34.

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. The role of phenols in plant defense. In: VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. **Phenolic compound biochemistry**. 2006b. p. 211–234.

WANG, Y.; LI, A.; WANG, X.; ZHANG, X.; ZHAO, W.; DOU, D.; ZHENG, X.; WANG, Y. GPR11, a putative seven-transmembrane G protein-coupled receptor, controls zoospore development and virulence of *Phytophthora sojae*. **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 9, n. 2, p. 242–250, 2010.

WATERHOUSE, G.M. **Key to the species of *Phytophthora* de Bary**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1963. 22p. (Commonwealth Mycological Institute. Mycological Papers, 92).

WEBBER, H.J. History and development of the Citrus industry. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (Ed.). **The Citrus industry: history, world distribution, botany, and varieties**. Berkeley: University of California Press; Division of Agricultural Sciences, v. 1, 1967. p. 1–39.

WEILER, R.L.; BRUGNARA, E.C.; BASTIANEL, M.; MACHADO, M.A.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; SOUZA, P.V.D.; SCHWARZ, S.F. Teste de paternidade e avaliações agronômicas de possíveis híbridos de tangerineira 'Sunki'. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 10, n. 6, p. 429–435, 2009.

WIDMER, T.L.; GRAHAM, J.H.; MITCHELL, D.J. Histological comparison of fibrous root infection of disease-tolerant and susceptible citrus hosts by *Phytophthora nicotianae* and *P. palmivora*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 88, n. 5, p. 389–395, 1998.

WILLIAMS-LINERA, G.; EWEL, J.J. Effect of autoclave sterilization of a tropical aneuploid on seed germination and seedling growth. **Plant and Soil**, The Hague, v. 82, n. 2, p. 263–268, 1984.

WINKLER, V.W. Reduced risk concept for Prohexadione-calcium, a vegetative growth control plant growth regulator in apples. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 451, n. 1, p. 667–671, 1997.

YAMAMOTO, P.T.; BASSANEZI, R.B. **Manual de morte súbita dos citros**. Araraquara: Fundecitrus, 2006. 12p.

YAMAMOTO, P.T.; BASSANEZI, R.B. **Manual técnico de morte súbita dos citros**. Araraquara: Fundecitrus, 2007. 12p.

YAMAMURA, K. Transformation using $(x + 0.5)$ to stabilize the variance of populations. **Researches on Population Ecology**, Tokyo, v. 41, n. 3, p. 229–234, 1999.

YANG, Y.-L.; XIAO, L.-T.; HU, X.-Q. Study on the relationship between the toxin of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary and resistance of potato. **Agricultural Sciences in China**, Beijing, v. 10, n. 2, p. 238–245, 2011.

YODER, K.S.; MILLER, S.S.; BYERS, R.E. Suppression of fireblight in apple shoots by Prohexadione-calcium following experimental and natural inoculation. **HortScience**, Alexandria, v. 34, n. 7, p. 1202–1204, 1999.

YOUNG, L.G.; NELSON, L. Calcium ions and control of the motility of sea-urchin spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 41, n. 2, p. 371–378, 1974.

YU, L.M. Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 92, n. 10, p. 4088–4094, 1995.

ZAR, J.H. Multisample hypotheses and the analysis of variance. In: ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 5th. ed. Upper Saddle River: Pearson–Prentice Hall, 2010. p. 189–224.

ZENTMYER, G.A. Chemotaxis of zoospores for root exudates in relation to infection by *Phytophthora cinnamomi*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 50, n. 9, p. 660, 1960. (Abstract).

ZENTMYER, G.A. Chemotaxis of zoospores for root exudates. **Science**, Washington, v. 133, n. 3464, p. 1595–1596, 1961a.

ZENTMYER, G.A. Attraction of zoospores of *Phytophthora cinnamomi* to avocado roots. **California Avocado Society Yearbook**, San Juan Capistrano, v. 45, n. 1, p. 93–95, 1961b.

ZENTMYER, G.A. Tactic responses of zoospores of *Phytophthora*. In: TOUSSOUN, T.A.; BEGA, R.V.; NELSON, P.E. (Ed.). **Root diseases and soil-borne pathogens**. Berkeley, Los Angeles: University of California Press, 1970. p. 109–111.

ZENTMYER, G.A.; ERWIN, D.C. Development and reproduction of *Phytophthora*. **Phytopathology**, Saint Paul, n. 60, n. 7, p. 1120–1127, 1970.

ZENTMYER, G.A.; RIBEIRO, O.K. The effect of visible and near visible radiation on sporangium production by *Phytophthora cinnamomi*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 67, n. 1, p. 91–95, 1977.

ZHU, D.; HETTIARACHCHY, N.S.; HORAX, R.; CHEN, P. Isoflavone contents in germinated soybean seeds. **Plant Foods for Human Nutrition**, New York, v. 60, n.3, p. 147–151, 2005.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

GARCIA, E.M.; CARMO, L.C.; FERRAZ, K.M.A. **Normas para elaboração de dissertações e teses**. 3. ed. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/Universidade de São Paulo, 2005. 99 p.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Consumo de água de plântulas de tangerineira Sunki, submetidas aos diversos tratamentos com o anticorpo primário contra a elicítina “ α -plurivorina”, ao longo de 12 dias após a inoculação com *Phytophthora nicotianae*

Dias	Tratamentos [Consumo Total de Água (mL/dia)] ¹			
	Controle	Pn + 200 ²	Pn + 500 ³	Pn ⁴
01	0,3887 a	0,3486 a	0,3753 a	0,3556 a
02	0,3629 a	0,3087 a	0,3333 a	0,3127 a
03	0,3450 a	0,2444 b	0,2516 b	0,2571 b
04	0,3598 a	0,2253 b	0,2113 b	0,2203 b
05	0,3693 a	0,2392 b	0,2431 b	0,2085 b
06	0,3475 b	0,2153 b	0,2271 b	0,1973 b
07	0,2720 a	0,1906 b	0,1849 b	0,1576 b
08	0,3037 a	0,1971 b	0,1695 b	0,1455 b
09	0,2811 a	0,1644 b	0,1279 b	0,1206 b
10	0,2958 a	0,1717 b	0,1316 bc	0,1148 c
11	0,3067 a	0,1676 b	0,1383 bc	0,0983 c
12	0,3167 a	0,1680 b	0,1432 bc	0,0958 c

¹A análise estatística foi realizada com os dados de dez repetições do 01º ao 12º dia.

²*Phytophthora nicotianae* + Anticorpo primário “ α -plurivorina” diluído 200x.

³*Phytophthora nicotianae* + Anticorpo primário “ α -plurivorina” diluído 500x.

⁴*Phytophthora nicotianae*.

*Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.