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

**Indução de resistência em citros contra *Phytophthora citrophthora* e
Phytophthora nicotianae: método de inoculação, seleção de indutores, aspectos
fisiológicos e bioquímicos**

Greicy Andrea Sarria Villa

Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Ciências. Área de concentração:
Fitopatologia

**Piracicaba
2010**

Greicy Andrea Sarria Villa
Engenheiro Agrônomo

**Indução de resistência em citros contra *Phytophthora citrophthora* e
Phytophthora nicotianae: método de inoculação, seleção de indutores, aspectos
fisiológicos e bioquímicos**

Orientador:
Prof. Dr. SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI

Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Ciências. Área de concentração:
Fitopatologia

**Piracicaba
2010**

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

Sarria Villa, Greicy Andrea

Indução de resistência em citros contra *Phytophthora citrophthora* e *Phytophthora nicotianae*: método de inoculação, seleção de indutores, aspectos fisiológicos e bioquímicos / Greicy Andrea Sarria Villa. - - Piracicaba, 2010.
85 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Bioquímica vegetal 2. Fisiologia vegetal 3. Frutas cítricas - Resistência 4. Fungos fitopatogênicos 5. Gomose I. Título

CDD 634.3
S247i

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

OFEREÇO

*A **Deus** por estar presente em todos os momentos da minha vida e por fazer possível todas as coisas, a ele todo meu louvor e honra para sempre.*

À memória de meus Paes Plinio e Bertha

A meus irmãos por fazer de mim o que eu sou hoje

A meus sobrinhos por serem a minha força

A Jorge e Mery por seu apoio e carinho e

Ao meu amado esposo Oscar, por me escolher e ser a minha escolha perfeita

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao professor Sérgio Florentino Pascholati, pela orientação e ensinamentos na minha formação Profissional, pela paciência e amizade.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo ESALQ/USP, e a o Programa de Pos-graduação em Fitopatologia pela oportunidade de realização do curso.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia pelo que me ensinaram, especialmente aos professores Nelson Massola e Ivan Bedendo por apoio e ajuda.

A CAPES pela oportunidade e apoio financeiro.

A CENIPALMA por fazer parte fundamental da minha formação.

Ao Centro APTA Citros Sylvio Moreira e Horticitros pelo fornecimento das sementes e mudas, respectivamente.

A meu esposo Oscar por seu amor, por sua valiosa ajuda, por me animar e incentivar em todos os momentos da minha vida.

A os Drs. Gerardo Martinez e Francia Varón por sua amizade, apoio, confiança, ensinamentos, por fazer possível meu desejo de estudar e por me direcionar cada dia na minha paixão pela fitopatologia.

Ao Dr. José Ignacio Sanz Scovino por seu apoio e confiança para realizar meus sonhos de estudar meu mestrado.

Aos Drs. Jorge Alonso Beltrán, Jesús Alberto Garcia, Sandra Gil, Hernán Mauricio Romero por seu apoio.

Ao Pesquisador científico Msc. Eduardo Feichtenberger por fornecer os isolados utilizados neste trabalho.

Ao Dr. André Boldrin Beltrame por sua amizade, por seus ensinamentos que foram fundamentais no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus companheiros de Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica: Leonardo Toffano, Luciana Oharomani, Luciana Iurkiv, Nívea Tonucci, Nikolas, Rafael, Josué, Fernando, Uelinton e em especial Mauricio Fialho, Dalilla Rezende e Simone Brand pela amizade, ajuda e pelo apoio de sempre.

À Dra. Silvia Blumer por sua amizade, ensinamentos e ajuda de sempre.

Aos colegas Leandro Dalagnol, Debora Freitas, Pedro Cordova, Fabrício Parcker, Fernanda, Thayne, Jerônimo, Pastora Querales, Mauro Bomfin Junior, pela convivência.

A meus amigos Barbara Escktein, Ariana Villela, Julio Barbosa, Wagner Pereira, Ana Teresa Mosquera, Angélica Plata, e Luis Carlos Martínez, por sua amizade, pelos momentos que tivemos juntos, momentos que agradeço a Deus por ter vivido.

A Mara e Carol Alves, por serem minhas amigas, por me apoiar e estar comigo nos meus momentos alegres e nos mais difíceis aqui no Brasil. Tenho certeza que vou me lembrar sempre dos alegres.

A minha amiguinha Juliana Ramiro, por me entender, por me escutar e por ser minha parceira em todos os meus trabalhos e ser uma amiga incondicional, que sempre levarei no meu coração.

A Adriana e Johana minhas duas amigas colombianas, pelos lindos momentos que compartilhamos aqui no Brasil.

Aos meus amigos colombianos Leonardo Ramirez, Andrés Ortiz, Rodrigo Ruiz, Miguel Quimbayo, Julieth Parra, Sandra Montenegro, Sandra Vergara, Esteban Galeano pelos momentos compartilhados.

Ao pessoal do Departamento de Fitopatologia e Nematologia ESALQ/ USP, pela ajuda. Em especial a Silvia Lourenço, Fernanda Groppo, Fabiana Nunes, Pedro Arthuso e Heloisa Duarte, por facilitar minha vida aqui no Brasil.

Ao Drs. Carlos Tadeu dos Santo, Eloina Mesa e Luiz Roberto Martins, por sua ajuda nas análises estatísticas e seus conselhos.

A dona Carmen, Silene e Angélica pelo carinho de sempre.

A Silvia Maria Zinsly da biblioteca por me ajudar com a formatação da minha dissertação.

Finalmente, mas no menos importante a minhas duas famílias Sarria Villa e Diaz Rodriguez, por seu amor, por seu apoio, por apesar da distancia estar sempre presentes e por simplesmente existirem!!!!

Muchas gracias!!!!

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 DESENVOLVIMENTO.....	17
2.1 Revisão bibliográfica.....	17
2.1.1 A gomose dos citros causada por <i>Phytophthora</i> spp.....	17
2.1.2 Mecanismos de defesa das plantas	19
2.1.3 Indução de resistência.....	22
2.2 Material e métodos	25
2.2.1 Isolados.....	25
2.2.2 Ativação dos isolados	25
2.2.3 Seleção do isolado mais agressivo	26
2.2.4 Avaliação do método de inoculação	27
2.2.4.1 Punção no caule.....	28
2.2.4.2 Imersão	28
2.2.4.3 Imersão com ferimentos	29
2.2.5 Avaliação <i>in vitro</i> dos indutores.....	30
2.2.6 Seleção <i>in vivo</i> de indutores	30
2.2.7 Interações citros- <i>P. nicotianae</i> e citros- <i>P. citrophthora</i> e resistência induzida	31
2.2.7.1 Inoculação dos patógenos e aplicação de indutores	32
2.2.7.2 Manutenção das plantas em casa de vegetação	33
2.2.7.3 Análises bioquímicas e fisiológicas.....	34
2.2.7.3.1 Obtenção do extrato de raízes.....	34
2.2.7.3.2 Quantificação de proteínas solúveis totais.....	35
2.2.7.3.3 Quantificação de carboidratos totais e açúcares redutores	35
2.2.7.3.4 Atividade de β -1,3 glucanase	36
2.2.7.3.5 Atividade de catalase	36
2.2.7.3.6 Atividade de guaiacol peroxidase.....	36

2.3 Resultados e discussão	37
2.3.1 Ativação dos isolados.....	37
2.3.2 Seleção do isolado mais agressivo	38
2.3.3 Avaliação do método de inoculação	43
2.3.4 Seleção <i>in vivo</i> dos indutores.....	49
2.3.5 Avaliação <i>in vitro</i> dos indutores	56
2.3.6 Aspectos fisiológicos e bioquímicos das interações citros- <i>P. nicotianae</i> e.....	59
citros- <i>P. citrophthora</i> e a resistência induzida.....	59
2.3.6.1 Avaliação da doença	59
2.3.6.2 Análises bioquímicas e fisiológicas	64
2.3.6.2.1 Quantificação de proteínas solúveis totais	64
2.3.6.2.2 Quantificação de carboidratos totais e açúcares redutores.....	66
2.3.6.2.3 Atividade de β -1,3 glucanase	70
2.3.6.2.4 Atividade de catalase	71
2.3.6.2.5 Atividade de guaiacol peroxidase	73
3 CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS.....	77

RESUMO

Indução de resistência em citros contra *Phytophthora citrophthora* e *Phytophthora nicotianae* em citros: método de inoculação, seleção de indutores, aspectos fisiológicos e bioquímicos

Espécies do gênero *Phytophthora* são responsáveis por doenças de importância nas principais culturas no mundo. A citricultura brasileira possui grande importância no agronegócio nacional. Uma das doenças que afeta a cultura é a gomose, causada principalmente por *Phytophthora nicotianae* e *Phytophthora citrophthora*. O controle da doença é feito basicamente por meio de medidas preventivas e curativas, com o uso de fungicidas. Uma das opções de manejo da doença seria induzir os mecanismos de defesa existentes na plantas. Esses mecanismos podem ser potencializados mediante o uso de indutores de resistência. O objetivo deste trabalho foi identificar possíveis indutores de resistência para esse patossistema e avaliar aspectos fisiológicos e bioquímicos envolvidos. Inicialmente, foi realizado um teste para selecionar o isolado mais agressivo. Uma vez selecionado o isolado, foram testados métodos de inoculação: punção no caule, imersão de raízes em suspensão de zoósporos com e sem ferimento. O método de inoculação selecionado foi utilizado para se fazer testes de seleção de substâncias indutoras em plantas de tangerina Sunki, sendo avaliados o peso da matéria fresca e seca dos tecidos das plantas. Finalmente, com a escolha da substância indutora, foi avaliada a indução de resistência na interação citros-*Phytophthora* spp. em plantas de tangerina Sunki e citrumelo Swingle. As variáveis bioquímicas consideradas foram β -1,3- glucanase, peroxidase, catalase, proteína, açúcares totais e açúcares redutores. Foram estudados seis isolados de *P. citrophthora* e oito de *P. nicotianae*, sendo que os isolados selecionados foram 02/02 de *P. citrophthora* e 07/06 de *P. nicotianae*. O método de inoculação selecionado foi a imersão por zoósporos, o qual apresentou diferenças estatísticas nas variáveis avaliadas. Nos testes *in vitro* os indutores Phytogard[®], silicato de potássio e fosfitos apresentaram redução significativa no desenvolvimento de *P. nicotianae* e *P. citrophthora*. Três substâncias indutoras Bion[®], Seacrop[®] e Phytogard[®] apresentaram diferenças estatísticas nas variáveis, peso da matéria seca da parte aérea e da raiz em relação ao controle. Por tanto, a substância selecionada foi o Phytogard[®], com base nos resultados e registros existentes sobre fosfitos, como possíveis indutores de resistência. Na interação citros-*Phytophthora* spp, submetida ao tratamento para resistência induzida, encontrou-se aumento no teor de proteína nas plantas de tangerina Sunki inoculadas com *P. nicotianae*, 24 dias após a inoculação. Efeitos na concentração de carboidratos e um incremento significativo na concentração de açúcar redutor em plantas de citrumelo Swingle foram observados em plantas inoculadas com os dois patógenos. Incremento significativo na atividade da β -1,3-glucanase foi observado 24 dias após a inoculação em plantas inoculadas com *P. nicotianae*, sem o indutor. A atividade da catalase não apresentou diferenças em nenhum tratamento. A atividade de guaiacol peroxidase apresentou alteração significativa em plantas de tangerina Sunki 24 horas após da inoculação com *P. citrophthora*. Por sua vez, a incidência da doença foi menor nas plantas tratadas com o Phytogard[®] nos dois patossistemas. Não foram encontradas alterações na atividade das enzimas avaliadas e o teor de proteínas, açúcares totais e redutores, que explicassem a indução nas plantas tratadas com fosfitos, e os mecanismos de defesa envolvidos nesse patossistema.

Palavras-chave: *P. nicotianae*; *P. citrophthora*; Citros; Indutores de resistência

ABSTRACT

Induction of resistance in citrus against *Phytophthora citrophthora* and *Phytophthora nicotianae*: inoculation method, selection of inducers, physiological and biochemical aspects

Species of the genus *Phytophthora* are responsible for major diseases in crops around the world. The Brazilian citrus industry plays an important role in the agribusiness. One of the diseases that affects the culture is the root rot, mainly caused by *Phytophthora nicotianae* and *Phytophthora citrophthora*. The disease control is carried out mainly through preventive and curative measures, with the use of fungicides. One of the options for management of the disease would be the induction of defense mechanisms existing in the plants. These mechanisms can be induced through the use of resistance inducers. The aim of this study was to identify potential resistance inducers for this pathosystem and evaluate physiological and biochemical aspects involved. Initially, a test was performed to select the most aggressive oomycete isolate. Afterwards, inoculation methods were tested: stem puncture, root immersion in a suspension of zoospores with and without injury. The inoculation method was used to in an experiment to select inducer substances in plants of Sunki tangerine, and it was evaluated the wet and dry weight of plant tissues. Finally, with the choice of the inducing substance, it was assessed the induction of resistance in the interaction citrus-*Phytophthora* spp. in Sunki tangerine and Swingle citromelo plants. The biochemical variables considered were β -1,3- glucanase, peroxidase, catalase, protein, total sugars and reducing sugars. Six isolates of *P. citrophthora* and eight *P. nicotianae* were studied, and the selected isolates were 02/02 of *P. citrophthora* and 07/06 of *P. nicotianae*. The inoculation method selected was immersion in zoospore suspensions. The inducers Phytogard, potassium silicate and phosphite have shown significant reduction on the development of *P. nicotianae* and *P. citrophthora* on *in vitro* tests. Three inducing substances Bion[®], Seacrop[®] and Phytogard[®] showed statistical differences in variables of dry weight of shoot and root. Therefore, the substance selected was Phytogard[®], based on the results and existing records of phosphite as potential inducers of resistance. In the interaction citrus-*Phytophthora* spp. submitted to the treatment for induced resistance, it was found an increase in protein content in plants of Sunki tangerine inoculated with *P. nicotianae* 24 days after inoculation. Effects on carbohydrate concentration and significant increase in concentration of reducing sugar in plants of Swingle citromelo were observed in plants inoculated with both pathogens. Significant increase in the activity of β -1,3-glucanase was observed 24 days after inoculation in plants inoculated with *P. nicotianae*, without the inducer. The catalase activity showed no differences in any treatment. The activity of guaiacol peroxidase showed significant changes in Sunki tangerine plants 24 hours after inoculation with *P. citrophthora*. Disease incidence was lower in plants treated with Phytogard[®] in both pathosystems. Thus there were no changes in enzyme activity assessed and in the protein content, total and reducing sugars, which could explain the induction in plants treated with phosphite, and the defense mechanisms involved in this pathosystem.

Keywords: *P. nicotianae*; *P. citrophthora*; Citrus; Resistance Inducers

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que a produção de citros situa-se ao redor de 102 milhões de toneladas ao ano, ocupando uma área de 7,3 milhões de hectares (IAC, 2009). O Brasil tem participação superior a 80% no comércio internacional de suco de laranja concentrado congelado. O Produto Interno Bruto (PIB) do segmento citrícola ainda é maior no mercado interno, somando US\$ 4,4 bilhões em 2009 ante US\$ 2,2 bilhões arrecadados com vendas ao mercado externo. Aos produtores de citros, coube um faturamento de US\$ 1,9 em 2009, que chegou a US\$ 14,6 bilhões quando considerados todos os elos da cadeia produtiva. As sucessivas altas nas cotações internacionais da *commodity* resultam da oferta restrita do fruto em São Paulo e na Flórida, segundo maior parque citrícola do mundo. Nos últimos 12 meses, a valorização nos preços do suco de laranja chegou a 26,25%, sendo que em 24 meses, atingiu 71,86% (FNP, 2010).

Os principais fatores bióticos limitantes aos citros incluem doenças como pinta preta, podridão floral dos citros conhecida como “estrelinha”, clorose variegada dos citros (CVC), cancro cítrico, leprose, *greening* ou *huanglongbing* (HLB), tristeza, declínio e morte súbita dos citros (MSC), além de diversas pragas.

As doenças relacionadas à utilização de porta-enxertos sempre foram impactantes ao sistema produtivo. Antes de 1940, o principal porta-enxerto utilizado no Brasil era a laranja Azeda (*Citrus aurantium*), por apresentar boas características agrônômicas e resistência a *Phytophthora* spp., porém o mesmo revelou ser suscetível ao vírus da tristeza dos citros (CTV). É estimado que 90 % das plantas dos pomares citrícolas no Estado de São Paulo morreram devido à infecção por esse vírus. Em função do problema com o CTV, o porta-enxerto laranja Azeda foi substituído por porta-enxertos tolerantes, principalmente limão Cravo (*C. limonia*), o qual é mais suscetível a gomose. A ocorrência de outra doença em torno de 1970, denominada de declínio (*blight*), e mais recentemente com o advento da MSC em 1999, em laranjeiras enxertadas sobre limão Cravo, promoveram diversificações no uso de porta-enxertos. Novos porta-enxertos, resistentes ao declínio e a MSC, passaram a ter maior participação nos pomares citrícolas, como as tangerinas Sunki e Cleópatra, porém sendo mais suscetíveis a gomose (POMPEU JUNIOR, 2005).

Phytophthora spp. são reportadas como agentes causais de doenças como podridão do pé, podridão de raízes e gomose (ERWIN; RIBEIRO, 1996; TIMMER; MENGE, 1993), sendo as espécies mais comuns e importantes que afetam os citros *P. nicotianae* e *P. citrophthora*

(FEICHTENBERGER et al., 2005; TIMMER; MENGE, 1993). Os principais danos causados por *Phytophthora* em citros são podridão na raiz e no caule, ocasionando diversos sintomas na parte aérea, como clorose nas folhas, lesões no tronco, raízes e nos galhos baixos, com exsudação de goma pelo fendilhamento da casca. Com o progresso da doença, os tecidos apodrecem e quando a lesão atinge toda a circunferência do tronco, a planta morre rapidamente. *Phytophthora* também pode infectar frutos devido aos esporos do solo que são transportados pelos respingos de chuvas (ERWIN; RIBEIRO, 1996; FEICHTENBERGER et al., 2005; TIMMER; MENGE, 1993). Para a gomose, o método de controle é principalmente preventivo, envolvendo práticas culturais e o controle químico, sendo este último o mais empregado, porém, acarretando alto custo ambiental, econômico e possíveis problemas de resistência do patógeno.

Embora as plantas na natureza estejam expostas ao ataque de microrganismos, a resistência mostra-se como a regra, enquanto a suscetibilidade, como a exceção (PASCHOLATI; LEITE, 1994). As plantas podem induzir vários mecanismos para prevenir o ingresso e a progressão de potenciais organismos patogênicos (MÉTRAUX, 2007), podem reagir ativa ou passivamente ao ataque de agentes fitopatogênicos utilizando mecanismos ou fatores de defesa pré- infeccionais (passivos/constitutivos) já existentes nas plantas antes da infecção e pós-infeccionais (ativos/induzidos) inexistentes ou presentes em baixos níveis antes da infecção e que são ativados em resposta a invasão do tecido pelo patógeno (PASCHOLATI; LEITE, 1995; VILELA et al, 2008).

Os mecanismos de defesa da planta podem ser estruturais e bioquímicos. Os estruturais constituem-se em verdadeiras barreiras físicas à penetração e/ou colonização do patógeno. Os mecanismos bioquímicos englobam substâncias capazes de inibir o desenvolvimento do patógeno ou gerar condições adversas para a sobrevivência nos tecidos do hospedeiro. Dentro desses mecanismos estão os pré-formados como fenóis, alcalóides glicosídicos, lactonas insaturadas, inibidores protéicos, β -1,3-glucanase, quitinase e fototoxinas. Os pós-formados são fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese, espécies reativas de oxigênio e fototoxinas (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008)

A indução de resistência, definida como a ativação de mecanismos de resistência latentes na planta em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos, pode contribuir na redução da doença, gerando uma resposta local ou sistêmica. Esta pode ser uma aplicação prática

que pode ser empregada visando aumentar a produtividade de culturas pelo controle de doenças (ROMEIRO, 2008).

Um aspecto importante para o manejo integrado é a pesquisa de soluções alternativas menos impactantes para o ambiente, visando a redução de inóculo de microrganismos como *Phytophthora* spp. que afetam o sistema de radicular e o caule, mediante a busca de possíveis agentes que ativem os mecanismos de resistência, contribuindo na geração de instrumentos de controle efetivo da gomose dos citros. Desta forma, o presente trabalho objetivou a identificação de indutores de resistência contra *Phytophthora citrophthora* e *Phytophthora nicotianae* em citros, e a avaliação dos aspectos fisiológicos e bioquímicos nos patossistemas estudados.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 A gomose dos citros causada por *Phytophthora* spp.

Espécies de *Phytophthora* causam algumas das doenças mais importantes veiculadas por patógenos do solo, que afetam culturas de importância econômica como tomate, batata, cacau, árvores frutíferas e florestais, entre outros hospedeiros herbáceos e lenhosos no mundo (ERWIN; RIBEIRO, 1996). Diferentes espécies de *Phytophthora* têm sido associadas à gomose, sendo esta uma das principais doenças veiculadas pelo solo em citros. Com base em critérios fenotípicos e genotípicos, o gênero *Phytophthora* foi reclassificado e está atualmente presente no reino Stramenopila, deixando de ser considerado como fungo (FEICHTENBERGER et al., 2005). Diferentes espécies têm sido associadas às culturas de citros como *Phytophthora palmivora* Butler, *Phytophthora citrophthora* Smith & Smith e *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan (Syn *P. parasitica*) (ERWIN; RIBEIRO, 1996; TIMMER; MENGE, 1993). No Brasil, as espécies comuns são, principalmente, *P. nicotianae* e *P. citrophthora* (FUNDECITRUS, 2009).

A faixa de temperatura para o desenvolvimento de *P. nicotianae* é de 8 - 36°C, com um ótimo aproximado de 31°C. Para *P. citrophthora*, a faixa de temperatura para o desenvolvimento é de 6 – 32 °C e um ótimo aproximado de 26°C (DIRAC; MENGE, 2003).

Os principais sintomas da gomose em condições de campo envolvem a morte dos tecidos internos da epiderme e do floema, formação de calos, exudação de goma, rachaduras e fendas longitudinais no tronco, podridões do colo e raízes, clorose uniforme e progressiva nas folhas, baixo desenvolvimento das folhas, murcha, desfolha e, finalmente, morte da planta (ERWIN; RIBEIRO, 1996; FEICHTENBERGER et al., 2005; FUNDECITRUS, 2009; TIMMER; MENGE, 1993).

Devido à importância da gomose e das podridões das raízes em plantas cítricas, vários pesquisadores vem estudando a resistência de porta-enxertos a *Phytophthora* spp. A principal medida de controle de *Phytophthora* spp. envolve o uso de porta-enxertos resistentes. Trabalhos desenvolvidos com inoculação do solo com clamidósporos de *P. parasitica* permitiram identificar tolerância e habilidade para regenerar raízes em trifoliata e citrumelo Swingle, sendo esse último tolerante à podridão de raízes e resistente à infecção na casca. Foram identificados como intolerantes as tangerinas Cleópatra, Sun Chu Sha e Changsha (GRAHAM, 1995; GRAHAM;

CASTLE, 1993). Matheron et al. (1998), estudando 38 genótipos de plantas cítricas, mostraram que *P. nicotianae* reduzia o peso das raízes de 38 % (*C. macrophylla*) a 95 % (laranja Azeda Savage × tangerina Cleópatra). Medina Filho et al. (2004) relataram que os trifoliatas Davis A e Rich 16-6 e citrumelo Swingle mostraram-se altamente resistentes a *P. nicotianae*. Por outro lado, laranja Azeda, tangerina Suen Kat e limões Cravo e Volkameriano mostravam-se resistentes, enquanto que, as tangerinas Sunki e Cleópatra eram suscetíveis ao patógeno.

Medina Filho *et al.* (2004) avaliaram a taxa de sobrevivência, redução e peso de raízes e parte aérea, diâmetro do caule e altura em diversos porta-enxertos de citros infectados por *P. nicotianae*, além de parâmetros subjetivos como volume de raízes, enfolhamento e coloração das folhas, e concluíram que o citrumelo Swingle é altamente resistente e a tangerina Sunki é suscetível ao fitopatógeno. Siviero et al. (2002), comparando diferentes métodos de inoculação de *P. nicotianae* em plântulas e plantas jovens de citros, mostraram que o comprimento e área média das lesões provocadas pelo patógeno em citrumelo Swingle foram menores do que em tangerina Sunki. Graham (1995) encontrou que muitas espécies que são resistentes a *P. nicotianae* são altamente suscetíveis a *P. palmivora*, que é um patógeno mais agressivo e competitivo em citros. Assim mesmo, em estudos histológicos em citros suscetíveis (laranja azeda) e tolerantes (trifoliatas) aos patógenos *P. nicotianae* e *P. palmivora*, encontraram com ajuda da microscopia eletrônica, que após 48 a 72h hifas de *P. palmivora* colonizaram a casca de laranja azeda mais extensivamente do que a casca de trifoliata; *P. palmivora* também colonizou os dois hospedeiros mais extensivamente do que *P. nicotianae* (WIDMER; GRAHAM; MITCHELL, 1998).

Em avaliações de porta-enxertos a *Phytophthora* spp. tem sido utilizados diferentes métodos de inoculação como, o método de disco, da inserção sob a casca e do contato do patógeno. Em plântulas produzidas *in vitro*, a inoculação é feita por ferimentos na região do colo, permitindo o contato do patógeno com a planta. Em plantas jovens, *in vivo*, pode ser utilizada a técnica do palito de dente ou agulha infestada com o patógeno (SIVIERO et al., 2002). Também podem ser utilizados métodos de inoculação com estruturas do patógeno no substrato, como esporângios e clamidósporos (GRAHAM, 1995; GRAHAM; CASTLE, 1993; ZITCO; TIMMER, 1994), e a inoculação por zoósporos (MATHERON; WRIGHT; PORCHAS, 1998).

2.1.2 Mecanismos de defesa das plantas

A resistência do hospedeiro a um microrganismo patogênico pode ser definida como a capacidade da planta de atrasar ou evitar a entrada e/ou a subsequente atividade do patógeno em seus tecidos. Os mecanismos de defesa das plantas podem ser estruturais ou bioquímicos, sendo os compostos pós-formados representados pelas fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese, espécies ativas de oxigênio e fototoxinas (SCHWAN-ESTRADA, STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008). Esta capacidade da planta de se defender faz parte de mecanismos coordenados e integrados para impedir a entrada e o estabelecimento do patógeno (HAMMERSCHMIDT, 1999; VAN LOON; VAN STRIEN, 1999).

A ativação destes mecanismos de defesa promove a indução de várias proteínas de defesa codificadas por genes da planta, que incluem proteínas estruturais, enzimas do metabolismo secundário e proteínas relacionadas à patogênese (Proteínas-RP), responsáveis pelas mudanças quantitativas nos teores de proteína solúvel durante as respostas de defesa (SCHWAN-ESTRADA, STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008). As Proteínas- RP não só são acumuladas no sítio de infecção, mas também são sistemicamente associadas com o desenvolvimento da resistência sistêmica adquirida (SAR). Uma vez que algumas Proteínas-RP foram identificadas em fumo, como a quitinase e β -1,3-glucanase com atividade antifúngica, têm sido sugerido que podem ser efetivas na inibição, crescimento, multiplicação e dispersão do patógeno (HAMMERSCHMIDT, 1999; VAN LOON; VAN STRIEN, 1999). Por outro lado, a resistência sistêmica induzida (ISR) é induzida pela exposição de raízes a raças específicas de rizobactérias promotoras de crescimento, sendo dependente dos fitormônios etileno e jasmonato, não havendo acúmulo das Proteínas-RP (HAMMERSCHMIDT, 1999; PASCHOLATI et al., 2010; VAN LOON; VAN STRIEN, 1999;).

Inicialmente foram caracterizadas, por técnicas bioquímicas e de biologia molecular, cinco classes de Proteínas-RP (PR 1-5). A família PR-2, representada pelas proteínas com atividade de β -1-3-glucanase, foram classificadas em tipos I, II, III, segundo suas similaridades e diferenças na sequência de aminoácidos (MARTINS, 2008; SCHWAN-ESTRADA, STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008). A maioria possui atividade de endoglucanase, produzindo oligômeros de duas a seis unidades de glicose pela hidrólise da β -1-3-glucana, como a laminarina (extraída de *Laminaria spp.*) (MARTINS, 2008).

A β -1-3-glucana é componente da parede celular das plantas e da parede de fungos patógenos, por isso, estas enzimas tem sido de interesse em estudos envolvendo as interações planta- fungo e seu uso como marcadores bioquímicos para resistência a doenças. Em inoculações com *P. palmivora* em diferentes genótipos de citros, verificou-se que a atividade da β -1-3-glucanase foi alterada em folhas e raízes das plantas infectadas (ULBRECHT; BOWMAN, 2007).

Outro mecanismo ativado na planta como resposta ao ataque dos patógenos é representado pelo estresse oxidativo, o qual é um tipo de resposta fisiológica da planta logo após o reconhecimento do patógeno. Neste tipo de resposta, temos as espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species* - ROS), como superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\cdot OH$), que são produzidas constantemente como subprodutos de várias vias metabólicas localizadas em diferentes compartimentos celulares (APEL; HIRT, 2004), bem como nos eventos de sinalização durante as interações planta-patógeno (HEISER; OSSWALD, 2008). Em células de plantas, as ROS, principalmente o H_2O_2 , são geradas no citosol, cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomas e espaço apoplástico (MITTLER, 2002; NAVAROT et al., 2007). As espécies reativas de oxigênio ocorrem normalmente no metabolismo celular, porém, quando acumuladas tornam-se tóxicas (QUAN et al., 2008).

Pesquisas recentes têm revelado que as ROS, especialmente o H_2O_2 , são componentes centrais na transdução de sinais em cascata, envolvidos em adaptações a mudanças ambientais (NEILL et al., 2002b), as quais ocorrem sob vários estresses bióticos e abióticos (DAT et al., 2000; NEILL et al., 2002a; REZENDE et al., 2007). O peróxido de hidrogênio tem sido aceito como mensageiro secundário para sinais gerados por meio de ROS, visto que tem vida relativamente longa e alta permeabilidade através da membrana plasmática (YANG; POOVAIAH, 2002).

Para minimizar os efeitos do estresse oxidativo, as plantas possuem um complexo sistema antioxidante composto pelas moléculas glutathiona e ascorbato (NOCTOR; FOYER, 1998) e pelas enzimas removedoras de ROS (*scavenging*), como a superóxido dismutase (GUPTA et al., 1993), catalase (FEIRABEND, 2005) e peroxidase (BANCI, 1997). As enzimas atuando como *scavenging* estão presentes em diversos compartimentos celulares, como peroxissomas e glioxissomas (BUCHANAN et al., 2000), cloroplastos (NAKAKO; ASADA, 1981), parede celular, citosol e vacúolo (ASADA, 1992; GOLDBERG et al., 1983). Por sua vez, o sistema

antioxidante determina o tempo de vida do H_2O_2 nos compartimentos celulares da planta (FOYER; NOCTOR, 2003).

As catalases (E.C 1.11.1.6, CAT) são enzimas que convertem o H_2O_2 em H_2O e O_2 em plantas e estão presentes nos peroxissomas e glioxissomas (DEL RIO et al., 1998; WILLEKENS et al., 1997). Estas enzimas são codificadas por famílias multigênicas (FRUGOLI et al., 1996; SUZUKI et al. 1995), sendo que as três principais isoformas de catalase são CAT1, CAT2 e CAT3 (HAVIR et al., 1989; WILLEKENS et al., 1994). Uma nomenclatura básica dividida em classes tem sido proposta para evitar confusão entre as isoenzimas nas diferentes espécies estudadas: classe 1 é altamente expressa em folhas e remove o H_2O_2 produzido durante a fotorespiração; a classe 2 é encontrada em tecidos vasculares; a classe 3 está presente abundantemente em sementes e plantas jovens e sua atividade está relacionada à remoção de H_2O_2 produzido durante a degradação de ácidos graxos no glioxissoma (DAT et al., 2000).

As plantas necessitam de mecanismos enzimáticos alternativos à catalase para remoção do H_2O_2 e proteção contra danos oxidativos. As peroxidases participam de inúmeros processos fisiológicos como lignificação, suberização, catabolismo de auxina, tolerância à salinidade, mecanismos de defesa contra patógenos e herbívoros (HEISER; OSSWALD, 2008; HIRAGA et al., 2001). As peroxidases são proteínas heme que catalisam a oxidação de grande variedade de substratos através da reação com peróxido de hidrogênio (BANCI, 1997; YOSHIDA et al., 2003).

As peroxidases presentes em eucariontes e procariontes são divididas em três superfamílias, com base na sua estrutura e propriedade catalítica (HIRAGA et al., 2001). Dentro da terceira superfamília, estão contidas três classes de peroxidases vegetais (BARCELÓ et al., 2003). A classe I é constituída de enzimas intracelulares em plantas, bactérias e leveduras, como a citocromo c peroxidase (E.C 1.11.1.5) e ascorbato peroxidase (E.C 1.11.1.11, APX) no cloroplasto e citosol. A classe II é formada de enzimas extracelulares de fungos e a classe III é constituída por peroxidases (E.C 1.11.1.7, POX) que são secretadas no apoplasto (HIRAGA et al., 2001).

As peroxidases pertencentes à classe III apresentam uma ampla variedade de substratos, comumente reagindo com compostos que contém grupo hidroxila ligado a anel aromático. Estas peroxidases são denominadas pela sigla POX e apresentam grande número de isoformas. Usualmente, utiliza-se o substrato guaiacol (*o*-metoxi fenol) para se avaliar a atividade das peroxidases totais (HIRAGA et al., 2001; MIKA; LUTHJE, 2003). A guaiacol peroxidase

(GPOX) está localizada no vacúolo, citosol e parede celular, e ausente em organelas celulares, como peroxissomas e cloroplastos (ASADA, 1992).

Diversos trabalhos têm enfatizado o envolvimento do peróxido de hidrogênio e de peroxidases no processo de lignificação (OLSON; VARNER, 1993). As POXs desempenham várias funções na defesa celular devido a sua participação na lignificação e no metabolismo da parede celular, sendo classificadas como proteínas relacionadas à patogênese (proteínas- PR), pertencentes à família PR-9 (GUZOO, 2003; VAN LOON et al., 2006).

2.1.3 Indução de resistência

Resistência de plantas a patógenos é a combinação de barreiras constitutivas e reações de defesa induzíveis (LAMOTTE; LA CAMERA; MÉTRAUX, 2010). A indução de resistência nas plantas consiste na ativação de mecanismos pós-infeccionais, que estavam inativos ou latentes, pelo uso de agentes bióticos e abióticos sem alterar o genoma (PASCHOLATI; LEITE, 1994). As plantas podem se defender passivamente ou ativamente; esses mecanismos são subdivididos em pré-formados (passivos; constitutivos) e pós-formados (ativos; induzíveis), isto é, que existem antes da chegada do patógeno ou são ativados após a chegada do patógeno. No caso dos pré-formados, os fatores estruturais, são a cutícula, tricomas, estômatos, vasos condutores ou fatores bioquímicos, os quais envolvem a presença de fenóis, alcalóides, fototoxinas, glicosídeos cianogênicos e glicosídeos fenólicos. Já para os mecanismos pós-formados, as barreiras estruturais podem envolver a lignificação, suberificação, formação de papilas e de camadas de abscisão e de cortiça, bem como as tiloses. Os mecanismos estruturais podem ser vistos como defesas físicas que restringem o desenvolvimento do patógeno.

Por sua vez, os bioquímicos pós-formados podem englobar o acúmulo de fitoalexinas e de proteínas relacionadas a patogênese (*PR-proteins*), bem como a atividade de quitinases e B-1,3-glucanases (PASCHOLATI; LEITE, 1995; ULBRECHT; BOWMAN, 2007), que são substâncias capazes de inibir o desenvolvimento do patógeno (SCHWAN-ESTRADA, et al, 2008). O objetivo final da atuação desses diferentes mecanismos é evitar ou atrasar a entrada de um microrganismo no interior da planta, bem como criar condições adversas para a colonização dos tecidos vegetais pelo mesmo (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

Nas plantas a indução de resistência caracteriza-se pela ausência de toxicidade do agente indutor sobre o patógeno; pela necessidade de um intervalo de tempo para expressão de resistência após aplicação do tratamento indutor; pela inespecificidade da proteção; por ser dependente do genoma da planta; pela ausência de resposta em níveis crescentes do indutor, e por ser local ou sistêmica (SCHWAN-ESTRADA et al, 2008).

Quanto aos indutores abióticos, a falta de conhecimento sobre a melhor época de aplicação e dosagem induz a resultados não conclusivos sobre a eficiência e possibilidade de uso desse produto, uma vez que, cada interação hospedeiro-patógeno possui um tempo próprio, necessário para a sinalização e a conseqüente ativação de genes de defesa da planta (CAVALCANTI; RESENDE, 2005; LAWTON, 1996).

A busca de produtos para indução de resistência contra *Phytophthora* spp. tem sido uma alternativa importante das pesquisas no controle deste patógeno, sendo que nos últimos dez anos, o número de trabalhos sobre o tema tem aumentado. O uso de indutores como, acibenzolar-S-metílico, ácido DL- β -amino-n-butírico, ácido jasmônico, fosfitos, quitosana, ácido araquidônico, fungos micorrízicos, *Trichoderma* spp e proteínas eliciadoras secretadas pelo patógeno, para o controle da doença pode ser encontrado. Em alguns casos, os indutores foram utilizados para estudos estruturais (papilas e deposição de calose e lignina) e aspectos bioquímicos (superóxido, fenóis, fitoalexinas (AFEX; SZTEJNBERG, 1989), peroxidase, glucanase, quitinase, fenilalanina amônia-liase), bem como rotas de sinalização (ácido jasmônico, ácido salicílico) (PASCHOLATI; VILLA, 2010).

Diferentes trabalhos têm sido realizados envolvendo diversos agentes abióticos, como ativadores de defesa das plantas, como Bion[®], Messenger[®], Milsana[®], Phytogard[®], Quitosana, Fitoforce[®], fosfitos, silicatos e bióticos, como *Sacharomyces cerevisiae*, *Bacillus thuringiensis*, *Lentinula edodes*, *Agaricus blazei* e a cianobacteria *Nostoc* 61 (BELTRAME, 2005; CIA, 2005; KUHN, 2007; MEDEIROS et al., 2010; RAPUSSI-DA SILVA, 2006; TONUCCI, 2004)

Diversas substâncias têm exibido efeitos positivos na redução da doença em diferentes culturas, como no caso do cafeeiro, onde o acibenzolar-S-metílico (ASM) proporcionou proteção em mudas, sendo constatado menor número de lesões por folha e menor incidência média da cercosporiose (RIBEIRO, 2008). Esse indutor também foi testado em plantas de cafeeiro cultivar Mundo Novo, as quais apresentaram proteção significativa contra *Cercospora coffeicola*, quando foram tratadas com a concentração de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do ingrediente ativo (GALEANO et al.,

2010). Em plantas de tomateiro, tratadas com extrato de folhas de café, princípio ativo do Fitoforce[®], foi encontrado uma redução da doença de 67% em relação à testemunha, o qual foi similar ao efeito das plantas tratadas com ASM (MEDEIROS et al, 2010).

Cia (2005), avaliando o efeito de produtos bióticos e abióticos no controle pós-colheita da antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão, constatou que a Quitosana a 1, 2, 4% foi eficiente na redução da severidade da doença. Os agentes bióticos testados *S. cerevisiae* e *B. thuringiensis*, aplicados 24 h antes da inoculação com o patógeno, reduziram de maneira significativa a incidência da antracnose nos frutos.

Outros indutores como fosfitos têm sido estudados nos patossistemas mamão-*P. palmivora* e fumo-*P. nicotianae*, onde foi encontrado um efeito protetor expresso na redução da lesão no sítio da inoculação (SMILLIE; GRANT; GUEST, 1989). Os fosfitos têm sido relatados como um fungicida efetivo contra muitos gêneros de oomycetes, como *Phytophthora* (FEN; COFFEY, 1984). Dunstan et al. (1990), em estudos com *P. palmivora*, encontraram mudanças no metabolismo e a composição da parede celular, sugerindo assim, um mecanismo pelo qual o fosfonato pode reduzir a virulência do patógeno no hospedeiro e conseqüentemente ativar as defesas naturais do hospedeiro em estados iniciais da doença.

Em citros, trabalhos visando a indução de resistência contra patógenos têm sido desenvolvidos, como por exemplo, o de Rapussi-da Silva (2007), no qual foi estudado o efeito da Quitosana no controle da mancha preta em frutos de laranja na pós-colheita. A autora observou que o produto exibiu potencial no controle da doença, quando os frutos foram tratados isoladamente com o Quitosana ou em conjunto com fungicida e UV-C.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Isolados

Foi realizado um ensaio para seleção dos isolados mais agressivos de *P. nicotianae* e *P. citrophthora*. Os 14 isolados testados, provenientes de diferentes locais do Estado de São Paulo, foram cedidos pelo Pesquisador Científico Eduardo Feichtenberger (Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Sorocaba, APTA Regional).

2.2.2 Ativação dos isolados

Os isolados de *P. nicotianae* e *P. citrophthora* foram ativados (recuperados) em frutos de laranja. Para tal, os frutos foram previamente imersos por 15 min em solução de hipoclorito de sódio ao 2,5%, seguido de lavagem em água destilada esterilizada para remoção do excesso. Com auxílio de um furador de rolha (12 mm de diâmetro) flambado, o fruto foi furado penetrando-se a casca e o albedo, sendo removida esta camada e adicionado no local um disco de meio Batata-Dextrose-Agar (BDA), contendo o micélio dos respectivos isolados de *Phytophthora* sp. O orifício foi novamente coberto com a casca inicialmente removida e protegido com esparadrapo (Figura 1).

Os frutos de laranja foram mantidos durante 17 dias em incubadora tipo BOD à 28°C, sob fotoperíodo de 12 h luz e 12h escuro. Após esse período, as sementes foram coletadas e transferidas para meio cenoura-água (200 g de cenoura + 20 g de ágar L⁻¹ de água destilada), a fim de propiciar condições para o desenvolvimento do patógeno. Essas culturas foram observadas até o crescimento característico de *Phytophthora*, para a transferência da colônia pura (Figura 1).

Com objetivo de confirmar se a colônia pura obtida correspondia a isolados de *P. nicotianae* e *P. citrophthora*, 10 discos de meio contendo o crescimento micelial foram transferidos para placas de poliestireno, contendo água destilada esterilizada e expostos a luz a fim de se induzir a produção de esporângios. Após dois dias, as placas foram observadas com auxílio de um microscópio ótico.

Figura 1 - Ativação em frutos de laranja dos isolados de *P. nicotianae* e *P. citrophthora*: **A.** Desinfestação de frutos de laranja pêra; **B.** Furo para retirada da casca e albedo; **C.** Frutos inoculados com o patógeno e vedados com esparadrapo; **D.** Frutos após 17 dias de incubação, sob fotoperíodo 12h luz/12h escuro e 28°C; **E.** Isolamento de sementes infectadas dos frutos inoculados em meio cenoura-água; **F.** Obtenção em colônia pura do microrganismo; na foto *P. nicotianae*

2.2.3 Seleção do isolado mais agressivo

Após a ativação dos isolados em frutos de laranja e sua obtenção em colônias puras, a patogenicidade foi comprovada em plantas de tangerina Sunki, com 70 dias após a semeadura (DAS). A inoculação foi realizada no caule através do método de punção. Com auxílio de uma agulha foi realizado um ferimento atravessando o caule a 6 cm da superfície do solo. Neste local, depositou-se o inóculo utilizando uma agulha contendo micélio de *Phytophthora* spp. e logo em seguida, a área inoculada foi envolvida com gaze e fixada com fita adesiva (Figura 2). A umidade na região inoculada foi mantida até 15 dias após a inoculação, utilizando-se gaze umedecida (SIVIERO et al., 2002).

Figura 2 - Inoculação pelo método de punção no caule em frutos de laranja dos isolados de *P. nicotianae* e *P. citrophthora*: **A.** Seedlings de tangerina Sunki; **B.** Seringa esterilizada para a inoculação; **C.** Agulha infestada com micélio do patógeno; **D.** Inoculação no caule; **E.** Local da inoculação (seta); **F.** Local da inoculação envolvida com gaze e fixada com uma fita adesiva (Seta)

Após 27 dias da inoculação, foram medidos os seguintes parâmetros: comprimento da lesão externa (área lesionada sob a casca), comprimento da lesão interna (área lesionada na parte interna do caule, corte longitudinal), altura, peso da matéria fresca e da matéria seca da raiz e dos tecidos da parte aérea. Os dados obtidos foram transformados: altura ($X^{1,4}$), lesão externa e interna ($1/\sqrt{X}$) e peso da matéria seca da raiz ($\sqrt{X}$) para as análises estatísticas e comparados através do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.2.4 Avaliação do método de inoculação

Foram testadas três metodologias de inoculação de *Phytophthora* spp., visando a escolha de um método eficaz, para ser utilizado na seleção de substâncias indutoras de resistência. Nestes estudos, foram utilizadas plantas de tangerina Sunki (suscetível) e citrumelo Swingle (resistente), com 90 dias após a semeadura (MEDINA FILHO et al., 2004; SIVIERO et al., 2002). As metodologias de inoculação estão descritas a seguir.

2.2.4.1 Punção no caule

Com auxílio de um escalpelo foi realizado um ferimento de 5 mm de comprimento no caule a 10 cm da superfície do solo. No ferimento foi depositado o inóculo utilizando uma agulha contendo micélio de *Phytophthora* spp. Em seguida, a área inoculada foi envolvida com gaze e fixada com fita adesiva. A umidade na região inoculada foi mantida até 15 dias após a inoculação, utilizando-se gaze umedecida (SIVIERO et al., 2002).

2.2.4.2 Imersão

O sistema radicular das plântulas foi imerso em suspensão de zoósporos, com a finalidade de simular uma infecção natural. Para obtenção dos zoósporos, *Phytophthora* spp foi cultivado durante sete dias em meio cenoura-ágar, sendo após este período retirados dez discos de micélio da borda da colônia e transferidos para placas de Petri de poliestireno com 10 mL de meio cenoura-líquido diluído (meio cenoura-líquido: água destilada autoclavada; 1:5 v/v). Em seguida, as placas foram mantidas a 24 °C sob luz fluorescente constante durante 24 h. Após esse período, a fim de proporcionar estresse nutricional para produção de zoosporângios, o meio de cenoura-líquido diluído foi retirado das placas e substituído por 10 mL de água destilada autoclavada. As placas foram incubadas a 24 °C por 48 h, sob luz fluorescente constante e posteriormente, mantidas a 4°C por 20 min. Para liberação dos zoósporos, as placas foram mantidas a temperatura ambiente por 20 minutos (ARAÚJO, 1998). Os zoósporos foram coletados e sua concentração ajustada para $5,1 \times 10^4$ zoósporos/ml, utilizando-se câmara de Neubauer. Em seguida, o sistema radicular das plântulas de citros foi imerso em 100 ml de suspensão de zoósporos, por 24 h (Figura 3). Após este período, as plântulas foram transplantadas para vasos contendo 1 kg de solo e mantidas em condições de casa de vegetação.

Figura 3 - Inoculação por zoósporos dos isolados de *P. nicotianae* e *P. citrophthora*: **A.** Preparação do inóculo em placas de poliestireno, sob luz fluorescente constante; **B.** Placas mantidas a 4°C por 20 minutos; **C.** Placas mantidas por 20 minutos a temperatura ambiente para liberação de zoósporos; **D.** Coleta dos zoósporos; **E.** Quantificação de zoósporos na câmara de Neubauer; **F.** Inoculação com zoósporos pelo método de imersão de raízes

2.2.4.3 Imersão com ferimentos

Foram realizados ferimentos no sistema radicular das plântulas de citros e, em seguida, foi mergulhado na suspensão de zoósporos de *Phytophthora* spp, obtida conforme metodologia descrita acima no item 2.2.4.2. A finalidade dos ferimentos foi proporcionar aberturas para a entrada do patógeno. Os zoósporos foram coletados e sua concentração ajustada para $5,1 \times 10^4$ zoósporos/ml, utilizando-se a câmara de Neubauer. As plantas de citros permaneceram imersas na suspensão de zoósporos por 24 h e após este período foram transplantadas para vasos de 1 kg, sendo mantidas em casa de vegetação até o surgimento dos sintomas, e avaliada a presença de lesões, diâmetro das lesões, peso da matéria seca e fresca das plantas e do sistema radicular.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC), com sete repetições. Cada repetição foi constituída de uma planta de citros. A análise estatística envolveu o cálculo da média e erro padrão, análise de variância e foi utilizado o teste de Tukey 5%, como teste para comparação de médias.

2.2.5 Avaliação *in vitro* dos indutores

Foram realizadas avaliações *in vitro* da fungitoxicidade das substâncias acibenzolar-S-metílico (ASM) (50mg i.a L⁻¹ do produto Bion[®]), (CIA, 2005; KUHN, 2007), Seacrop[®] (*Ascophyllum nodosum*) (1 ml L⁻¹), Messenger[®] (1g L⁻¹) (Nome atual do produto ProActTM-Ingrediente ativo), Phytogard[®] (1ml L⁻¹), *Sacharomyces cerevisiae* (2,5 x10⁸cel/ml), cianobacteria *Nostoc* 61 (5,37 µg de clorofila a), fosfito de potássio (1 ml L⁻¹) e silicato de potássio (60 g L⁻¹), identificadas previamente como potenciais indutoras de resistência em plantas (REZENDE, 2009; RIBIERO, 2008; DI PIERO, 2003; TONUCCI, 2004; BELTRAME, 2005; CIA, 2005; TOFFANO, 2005). As doses dos produtos comerciais foram as recomendadas pelo fabricante, e a concentração da cianobatéria foi calculada tirando-se uma alíquota de 75 ml das culturas, para obtenção do filtrado de conteúdo celular, segundo Beltrame (2005).

Para os testes foram preparadas as soluções de cada produto em água destilada esterilizada nas doses acima mencionadas e esterilizadas através de filtração utilizado-se membrana filtrante 0,22 µm (tipo Millipore). Posteriormente, 20 ml das soluções foram adicionadas em 180 ml de meio de cultura cenoura-ágar fundente (45 - 50°C) e distribuído em placas de poliestireno. Discos de meio (8 mm) provenientes da borda das colônias de *Phytophthora* spp., foram depositados no centro das placas contendo meio cenoura-ágar. As placas foram incubadas a 28°C em incubadora tipo BOD, sob fotoperíodo de 12h (12 h luz/12 h escuro). O crescimento micelial foi mensurado diariamente até o momento em que a colônia do tratamento controle atingiu todo o diâmetro da placa. O tratamento controle foi representado pela aplicação somente de água. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC), com 7 repetições.

2.2.6 Seleção *in vivo* de indutores

Entre os métodos de inoculação avaliados conforme descrito anteriormente foi escolhido o mais eficiente, o qual foi utilizado para a seleção das possíveis substâncias indutoras de resistência, em plantas de tangerina Sunki com 90 DAS (Tabela 1), a inoculação dos patógenos foi feita conforme ao item 3.2.2. As aplicações das substâncias foram realizadas, 5 dias antes e 5 dias após a inoculação. A aplicação foi feita pulverizando-se 3 ml da solução de cada substância

por planta, nas concentrações mencionadas no item 3.3. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC), com sete repetições. Cada repetição foi constituída de uma planta. A análise estatística consistiu no cálculo da média e erro padrão, análise de variância, teste de Tukey a 5%.

Tabela 1 - Substâncias indutoras e suas respectivas codificações

Codificação	Substância
S1	Bion [®]
S2	Seacrop [®]
S3	Messenger [®] (Nome atual do produto ProAct [™])
S4	Phytogard [®]
S5	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>
S6	Cianobactéria <i>Nostoc</i> 61
S7	Silicato de potássio
CA	Controle aplicado somente com água
BG11	Controle com o meio de crescimento da cianobactéria
BG11PC	Controle com o meio de crescimento da cianobactéria + <i>P. citrophthora</i>
BG11PN	Controle com o meio de crescimento da cianobactéria + <i>P. nicotianae</i>
CPC	Controle <i>P. citrophthora</i>
CPN	Controle <i>P. nicotianae</i>

2.2.7 Interações citros-*P. nicotianae* e citros- *P. citrophthora* e resistência induzida

Foi utilizada a substância selecionada como possível indutora de resistência em plantas cítricas contra *P. nicotianae* e *P. citrophthora*. Neste estudo foram utilizadas plantas de tangerina Sunki e de citrumelo Swingle, com 90 dias após a semeadura. Estas foram cedidas pelo viveiro da Horticitrus de Cordeirópolis, e mantidas durante uma semana em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (Esalq/USP).

2.2.7.1 Inoculação dos patógenos e aplicação de indutores

Nas interações citros- *P. nicotianae* e citros- *P. citrophthora*, foram utilizadas plantas de tangerina Sunki e de citrumelo Swingle, as quais foram inoculadas pelo uso do método escolhido no item 3.2.2. As plantas receberam o indutor em duas aplicações, 5 dias antes e 5 dias após a inoculação. Cada planta foi pulverizada com 3 ml de solução da substância indutora selecionada, e as plantas sem aplicação do indutor (controle) foram pulverizadas com água destilada (Tabela 2). Após a inoculação foi avaliado o número de plantas de citros afetadas em cada tratamento sendo, as avaliações realizadas a cada três dias.

$$\% \text{ Incidência} = \frac{\text{Número de plantas afetadas}}{\text{Total de plantas por tratamento}} \times 100$$

Após a observação dos sintomas da doença nas plantas inoculadas com *P. nicotianae* e *P. citrophthora*, para verificar sua presença em tecidos de raízes das plantas sintomáticas. Foram colocadas iscas, macerando tecido de raízes e colocando-lo em beaker contendo 30 ml de água destilada esterilizada, após foram depositados sobre a superfície da suspensão quatro recortes quadros de aproximadamente 5 ml de tecido de tangerina Sunki sadio suscetível. A seguir, foram vedados com filme plástico e mantidos a luz fluorescente constante por 4-5 dias. Sendo observados com ajuda de microscópio de luz (BELTRAME, 2010).

Tabela 2 - Tratamentos utilizados visando a indução de resistência nas interações citros-*Phytophthora* spp*

Tratamento	Descrição
1	Tangerina Sunki + Água
2	Citrumelo Swingle + Água
3	Tangerina Sunki + Indutor
4	Citrumelo Swingle + Indutor
5	Tangerina Sunki + Indutor + <i>P. nicotianae</i>
6	Citrumelo Swingle + Indutor + <i>P. nicotianae</i>
7	Tangerina Sunki + Indutor + <i>P. citrophthora</i>
8	Citrumelo Swingle + Indutor + <i>P. citrophthora</i>
9	Tangerina Sunki + <i>P. nicotianae</i>
10	Citrumelo Swingle + <i>P. nicotianae</i>
11	Tangerina Sunki + <i>P. citrophthora</i>
12	Citrumelo Swingle + <i>P. citrophthora</i>

* Indutor aplicado 5 dias antes da inoculação e 5 dias após a inoculação.

2.2.7.2 Manutenção das plantas em casa de vegetação

Após a inoculação, as plantas foram transplantadas para vasos de 2 L, contendo uma mistura de solo, areia e matéria orgânica na proporção 2:1:2 (v/v/v), previamente autoclavados a 121°C durante 1 hora, sendo repetido este ciclo 24 horas após. As plantas foram mantidas em casa de vegetação durante o desenvolvimento do trabalho, sob condições de temperatura mínima entre 18 – 24 °C e máxima entre 28 – 36 °C. Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Cada repetição foi constituída de uma planta. A

análise estatística consistiu no cálculo da média e erro padrão, análise de variância e foi utilizado o teste de Tukey 5% como teste para comparação de médias.

2.2.7.3 Análises bioquímicas e fisiológicas

2.2.7.3.1 Obtenção do extrato de raízes

As raízes de plantas de citros, cultivadas em casa de vegetação, foram coletadas para os testes bioquímicos, sendo utilizadas quatro amostras por tratamento. As amostras foram armazenadas em isopor contendo gelo e levadas ao laboratório para posterior pesagem e processamento. Na tabela 3, encontra-se a distribuição da coleta de amostras de tecido para as análises bioquímicas.

Tabela 3 - Distribuição das amostragens de tecidos da raiz utilizados para os testes bioquímicos

Amostragem	Tempo
1	Antes da inoculação, antes da aplicação do indutor
2	Dia da inoculação, correspondendo aos 5 dias após a aplicação do indutor e antes da inoculação
3	1 dia após a inoculação.
4	3 dias após a inoculação
5	7 dias após a inoculação
6	14 dias após a inoculação
7	24 dias após a inoculação

Amostras de 0,5 gramas de raízes foram maceradas em presença de nitrogênio líquido e, em seguida, adicionou-se 4 ml do tampão de extração acetato de sódio 100 mM (pH 5.0), sendo posteriormente o material centrifugado a 20.000g durante 25 minutos a 4°C. O sobrenadante,

considerado como o extrato enzimático, foi utilizado nas análises bioquímicas (KUHN, 2007; BELTRAME, 2010).

2.2.7.3.2 Quantificação de proteínas solúveis totais

A metodologia de Bradford (1976) foi empregada para a quantificação das proteínas totais. Foram adicionados 800 μL do extrato (item 2.2.7.3.1), mais 200 μL de reagente Bradford. Após 5 minutos foi efetuada a leitura da absorbância a 595 nm em espectrofotômetro. A concentração de proteína foi expressa em equivalentes mg de albumina de soro bovino (ASB) g^{-1} de amostra, a qual foi determinada baseada em reta padrão de concentrações de ASB.

2.2.7.3.3 Quantificação de carboidratos totais e açúcares redutores

Para a determinação do conteúdo de açúcares solúveis totais (AST), foi adicionado 500 μL de solução aquosa de fenol a 5% em 500 μL do extrato (item 2.2.7.3.1). Em seguida, foi adicionado 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A solução final foi agitada cuidadosamente e após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente, foi determinada a absorbância a 490 nm. A concentração de AST foi determinada baseando-se em reta padrão da glicose (DUBOIS et al, 1956). O conteúdo de açúcares redutores (AR) foi determinado através do método de Lever (1972). Para tal, em 500 μL do extrato (item 2.2.7.3.1) foram adicionados a 1,5 mL de solução de hidrazida do ácido *p*-hidrobenzóico (1g dissolvido em 20 mL de HCl 0,5M, seguido da adição de 80 mL de NaOH 0,5M). A solução foi aquecida a 100°C durante 5 minutos em banho maria, seguido de resfriamento em geladeira por 5 minutos. Após este período foi determinada a absorbância a 410 nm, sendo a concentração de AR estimada com base em reta padrão de glicose (BELTRAME 2010; RIBIERO, 2006). Os resultados obtidos foram expressos em equivalentes μg de glicose g^{-1} do tecido fresco.

2.2.7.3.4 Atividade de β -1,3 glucanase

A atividade da β -1,3 glucanase foi determinada pela quantificação colorimétrica da glicose liberada enzimaticamente a partir do substrato laminarina, conforme descrito por Kombrink & Hahlbrock (1986). Do extrato obtido no item 2.2.7.3.1 foram pipetados 150 μ L, as quais receberam 150 μ L de laminarina 0,2%, previamente dissolvida no tampão de extração. A incubação foi realizada a 37°C por 3 h. Após este período, a reação foi paralisada e a concentração de AR determinada pelo método de Lever (1972), conforme descrito no item 2.2.7.3.3, a 410 nm. A concentração de glicose liberada pela laminarina foi obtida subtraindo-se os valores de absorbância daqueles obtidos nos tubos controle, sendo que o substrato foi adicionado às amostras apenas ao final do tempo de incubação, não havendo desta forma liberação de glicose. Foi utilizada uma reta padrão de glicose e os valores de concentração expressos em μ g de glicose⁻¹ min⁻¹ mg⁻¹ de proteína (BELTRAME, 2010).

2.2.7.3.5 Atividade de catalase

A atividade da catalase (CAT) foi determinada mediante a reação obtida pela mistura de 1,45 mL de 0,036% H₂O₂ em tampão fosfato de sódio 100mM (pH6.8) e 50 μ L do extrato enzimático (item 2.2.7.3.1). Imediatamente após a adição do extrato, a degradação do H₂O₂ foi monitorada pelo decréscimo da absorbância a 240 nm, em intervalos de 6 s por um período de 1 min. A atividade da CAT foi expressa em unidades de CAT mg⁻¹ de proteína, sendo uma unidade correspondente à decomposição de μ mol de H₂O₂ min⁻¹ nas condições do ensaio.

2.2.7.3.6 Atividade de guaiacol peroxidase

A atividade da guaiacol peroxidase foi medida em espectrofotômetro a 410 nm. O meio de reação foi constituído por 2,9 mL de tampão de reação (tampão fosfato de sódio 10 mM pH 6.0, 23 mM de guaiacol e 2,9 mM H₂O₂) e 0,1 mL do extrato (item 2.2.7.3.1). Imediatamente após a adição do extrato, a reação foi monitorada a cada 10 s durante 1 min. Os resultados foram expressos em Δ abs_{410 nm} min⁻¹ mg⁻¹ de proteína (BELTRAME, 2010; RONCATO; PASCHOLATI, 1998).

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Ativação dos isolados

Conforme detalhado na tabela 4, e ilustrado na figura 4, foram ativados e obtidos em colônia pura 14 isolados de *P. nicotianae* e *P. citrophthora*.

Tabela 4 - Fonte de isolados de *P. nicotianae* e *P. citrophthora*, obtidos após ativação em frutos de laranja

Cultura nº	Procedência	Município	Data isolamento	Espécie
LRS 32/89	Pomar comercial	Itapetininga – SP	03/07/1989	<i>P.citrophthora</i> *
LRS 16/90	Viveiro de campo	Taquari – RS	**	<i>P. citrophthora</i> *
LRS 39/90	Pomar comercial	Itapetininga – SP	15/10/1990	<i>P. citrophthora</i> *
LRS 02/02	Pomar comercial	Capela do Alto – SP	05/03/2002	<i>P.citrophthora</i> *
LRS 46/05	Viveiro telado	Matias Cardoso- MG	11/01/2006	<i>P.citrophthora</i> *
LRS 04/07	Pomar Comercial	Taquaral – SP	14/02/2007	<i>P. citrophthora</i> *
LRS 07/06	Pomar Comercial	Iacanga – SP	27/07/2006	<i>P. nicotianae</i> *
LRS 01/07	Viveiro telado	Sales de Oliveira – SP	09/01/2007	<i>P. nicotianae</i>
LRS 03/07	Viveiro telado	Pindorama – SP	26/01/2007	<i>P. nicotianae</i>
LRS 02/08	Viveiro telado	Mogi Mirim – SP	22/01/2008	<i>P. nicotianae</i>
LRS 05/09	Viveiro telado	Santa Albertina – SP	27/02/2009	<i>P. nicotianae</i>
LRS 22/09	Pomar comercial	Brotas – SP	13/04/2009	<i>P. nicotianae</i>
LRS 04/06**				<i>P. nicotianae</i>
LRS 01/06**				<i>P. nicotianae</i>

* Identidade confirmada por PCR

** Dados não disponíveis

Figura 4 - Crescimento *in vitro* de *P. nicotianae*, desenvolvendo-se a partir de sementes dos frutos de laranja, 6 dias após seu isolamento

2.3.2 Seleção do isolado mais agressivo

A partir dos isolados obtidos na primeira fase da ativação, foram estabelecidos os tratamentos para avaliação da agressividade dos mesmos (Tabela 5).

Tabela 5 - Tratamentos utilizados no teste de seleção dos isolados mais agressivos de *P. nicotianae* e *P. citrophthora*

Tratamentos	Isolado	Espécie
T1	Testemunha	Testemunha
T2	LRS 01/07	<i>P. nicotianae</i>
T3	LRS 22/09	<i>P. nicotianae</i>
T4	LRS 02/08	<i>P. nicotianae</i>
T5	LRS 07/06	<i>P. nicotianae</i>
T6	LRS 05/09	<i>P. nicotianae</i>
T7	LRS 04/06	<i>P. nicotianae</i>
T8	LRS 03/07	<i>P. nicotianae</i>
T9	LRS 01/06	<i>P. nicotianae</i>
T10	LRS 02/02	<i>P. citrophthora</i>
T11	LRS 16/90	<i>P. citrophthora</i>
T12	LRS 39/90	<i>P. citrophthora</i>
T13	LRS 04/07	<i>P. citrophthora</i>
T14	LRS 46/05	<i>P. citrophthora</i>
T15	LRS 32/89	<i>P. citrophthora</i>

Na incidência avaliada para a seleção do isolado mais agressivo, não houve diferença estatística significativa, sendo que a incidência da doença foi baixa (17,35%) (Figura 5). Porém, foi possível observar o surgimento de sintomas entre 10 e 27 dias após a inoculação.

Figura 5 - Incidência em plantas de tangerina Sunki que apresentaram sintomas e morte, após a inoculação do caule com os isolados de *P. nicotianae* e *P. citrophthora*, segundo os tratamentos apresentados na tabela 5: **T2**, LRS 01/07; **T3**, LRS 22/09; **T5**, LRS 07/06; **T6**, LRS 05/09; **T10**, LRS 02/02; **T12**, LRS 39/90; **T13**, LRS 04/07; **T14**, LRS 46/05

Nos testes de comparação de médias de Duncan ($p < 0,05$) foram observadas diferenças entre tratamentos, quando foram analisados parâmetros como comprimento da lesão sob a casca e interna do caule em relação a testemunha (Figura 6). Diferenças significativas ($p < 0,05$) na variável altura da planta e peso da matéria seca da raiz foram observadas nos tratamentos T10 e T14, quando comparadas com a testemunha (Figura 7). Nestes dois tratamentos também foi observado maior porcentagem de plantas afetadas por *P. citrophthora*. Com base nestes resultados, foi selecionado o isolado T10 (02/02) para as etapas seguintes do trabalho. Embora este isolado só tenha apresentado diferenças significativas no peso da matéria seca da raiz, a variável peso da matéria fresca da parte aérea e da raiz apresentou uma maior redução quando comparada com os outros tratamentos. No caso de *P. nicotianae*, o isolado foi selecionado com base na incidência do patógeno nas plantas inoculadas, onde os isolados T3 e T5 apresentaram

uma maior porcentagem de incidência aos quatorze dias, a qual se manteve até o final do experimento. Desses dois isolados, foi selecionado o T5 (07/06), para estudos posteriores, visto que o mesmo possuía confirmação da identidade por PCR.

Figura 6 - Altura, comprimento da lesão sob a casca e interna observada em plantas cítricas de tangerina Sunki inoculadas com isolados de *P. nicotianae* e *P. citrophthora*, segundo os tratamentos apresentados na tabela 5. Barras indicam a média $\pm$ erro padrão

Trabalhos de avaliação de isolados de *P. nicotianae* em fumo foram realizados para se determinar a patogenicidade pelo método de inoculação na raiz em plântulas (RICCI et al 2007). Sete isolados de *P. nicotianae* foram inoculados em plantas de limão Gênova para seleção pela sua agressividade no caule, sendo selecionado o isolado LRS 01/06 por apresentar o maior tamanho da lesão (BELTRAME, 2010).

Os sintomas observados nas plantas afetadas nos estados iniciais, foram caracterizados por uma perda na turgidez da planta ou início de murcha, após as folhas enrolaram-se da borda até o centro da lamina foliar, sendo este processo progressivo até alcançar o secamento total da planta, com a perda progressiva das folhas (Figura 8). Algumas plantas apresentaram amarelecimentos nas folhas mais jovens.

Figura 7 - Peso fresco e Peso seco da matéria da raiz e parte aérea de plantas cítricas de tangerina Sunki inoculadas com isolados de *P. nicotianae* e *P. citrophthora* apresentados na tabela 5. Barras indicam a média $\pm$ erro padrão. *Diferença estatística pelo teste de Duncan a 5%

A infecção por *Phytophthora* spp. na raiz pode afetar com severidade porta-enxertos, ocasionando diminuição do tamanho das plantas e perdas no rendimento. Em estados avançados da infecção, a produção de novas raízes é inferior ao ritmo de morte das raízes, ocasionando uma incapacidade da planta de manter água em quantidade suficiente e captação adequada de minerais. Portanto, as reservas de nutrientes na raiz diminuem, resultando na redução da produção, perda de folhas e morte progressiva da copa (GRAHAM; TIMMER, 1994).

Figura 8 - Plantas de tangerina Sunki com 70 dias após a semeadura, inoculadas pelo método de ferimento no caule com *P. nicotianae* (T5: A, B), *P. citrophthora* (T10:D,E, F) e Testemunha (A). Sintomas observados aos 24 dias após a inoculação

Espécies de *Phytophthora* podem afetar plantas em pomares adultos e em viveiros, ocasionando podridão de raízes. O patógeno cresce no interior do câmbio vascular e pode se manifestar com escurecimento e a morte de pequenas regiões da casca do caule, com a exudação de goma no colo. Tecidos infectados da casca se rompem mostrando rachaduras e fendilhamentos longitudinais. Em lesões muito desenvolvidas, as plantas têm um rápido declínio, devido à destruição do floema, restringindo o fluxo de seiva elaborada da copa para o sistema radicular, provocando assim a morte da planta (FEICHTENBERGER et al., 2005; MEDINA FILHO et al., 2003; TIMMER; MENGE, 1993).

2.3.3 Avaliação do método de inoculação

Nas plantas inoculadas com o uso do método do ferimento no caule não foram observados sintomas foliares dos patógenos avaliados, bem como diferenças significativas no comprimento da lesão. A lesão externa observada no sítio da inoculação foi de crescimento arredondado e de cor parda; quando foi retirada a casca para se avaliar o tamanho da lesão, encontrou-se que o comprimento variou entre 6,29 a 2,86 mm, sendo a lesão de cor parda um pouco mais escura do que a observada superficialmente. Com o objetivo de comprovar se o patógeno exibia crescimento longitudinal, verificou-se que na parte central o comprimento da lesão nos tecidos internos oscilou entre 5 e 2,57 mm (Figura 9).

Figura 9 - Comprimento da lesão ocasionada pelo ferimento em plantas cítricas de tangerina Sunki e citrumelo Swingle inoculadas com isolados de *P. citrophthora* (T3:Sunki e T4:Swingle) e *P. nicotianae* (T5:Sunki e T6: Swingle) e, testemunhas não inoculadas (T1: Sunki e T2: Swingle). Barras indicam a média $\pm$ erro padrão

Por sua vez, plantas de tangerina Sunki inoculadas com *P. nicotianae* e *P. citrophthora* pelo método de ferimento no caule, não apresentaram diferenças significativas nas variáveis avaliadas referentes ao peso da matéria fresca e seca dos tecidos da parte aérea. Porém, citrumelo Swingle apresentou uma diminuição significativa no peso da matéria fresca e seca em presença de *P. nicotianae* e *P. citrophthora* ($p < 0,05$) (Figura 10).

Figura 10 - Peso da matéria fresca e seca das plantas cítricas de tangerina Sunki e citrumele Swingle, inoculadas pelo método de ferimento no caule com isolados de *P. citrophthora* (T3:Sunki e T4:Swingle) e *P. nicotianae* (T5:Sunki e T6: Swingle) e, testemunhas não inoculadas (T1: Sunki e T2: Swingle). Barras indicam a média $\pm$ erro padrão

Os métodos que incluíram a imersão das raízes na suspensão de zoósporos, foram os que ocasionaram sintomas da doença nas plantas. Os sintomas iniciais foram representados por perda na turgidez da planta, seguida de início de murcha, após as folhas começarem a apresentar enrolamento da borda, sendo que esse processo foi avançando até alcançar o secamento total da planta. Algumas das folhas murcharam conservando a cor verde do tecido, e em outros casos as folhas apresentaram sintomas de cor parda desde a borda da folha até o centro (Figura 11).

Figura 11 - Sintomas em plantas de tangerina Sunki inoculadas pelo método de imersão em zoósporos com *P. nicotianae*. **A.** Testemunha; **B.** Sintomas iniciais da murcha, 15 dias após a inoculação; **C.** Murcha e secamento do tecido foliar, 21 dias após a inoculação; **D.** Secamento foliar e coloração parda do tecido 30 dias após a inoculação

Os primeiros sintomas foram observados aos 15 dias após a inoculação em plantas de tangerina Sunki inoculadas com *P. nicotianae* e pelo método de imersão de raízes na suspensão de zoósporos. Nos seguintes 21 a 38 dias, foram observados sintomas nos outros tratamentos avaliados, sendo que somente foram observados sintomas da doença em 9,5% do total das plantas inoculadas (Figura 12).

Embora os sintomas da doença somente tenham sido observados nos tratamentos que envolveram a presença de zoósporos, este método de inoculação é o mais similar ao método de infecção natural de *Phytophthora* (BELTRAME, 2010). Porém, existem alguns trabalhos onde demonstrou-se eficiências menores, quando esse método foi comparado com outros métodos de inoculação (SIVIERO et al, 2002).

Figura 12 - Porcentagem de plantas de tangerina Sunki e citrumelo Swingle que apresentaram sintomas da doença, quando foram inoculadas pelo método de imersão das raízes em suspensão de zoósporos com isolados de *P. citrophthora* (T7: Sunki) e *P. nicotianae* (T9: Sunki, T10: Swingle, T15: Sunki e T16: Swingle)

As plantas de tangerina Sunki apresentaram um efeito significativo nas variáveis avaliadas, quando foram inoculadas sem fermentos e com zoósporos de *P. nicotianae* e *P. citrophthora*, corroborando assim com o relatado de trabalhos em que as mesmas apresentam maior suscetibilidade à gomose dos citros (MEDINA FILHO et al., 2004). Plantas de citrumelo Swingle inoculadas por este método apresentaram diminuição significativa no peso da matéria fresca da parte aérea, peso da matéria seca dos tecidos aéreos e da raiz, quando foram inoculadas com *P. citrophthora* (Figura 13).

Figura 13 - Peso da matéria fresca e seca das plantas cítricas de tangerina Sunki e citrúelo Swingle inoculadas pelo método de imersão das raízes em suspensão de zoósporos com isolados de *P. citrophthora* (T7:Sunki – T8: Swingle) e *P. nicotianae* (T9: Sunki - T10:Swingle) e, testemunhas não inoculadas (T11:Sunki - T12: Swingle)

Em geral, os maiores pesos da matéria seca dos tecidos aéreos e da raiz das plantas avaliadas foram obtidos em plantas testemunhas com e sem ferimento, seguidas pelas inoculadas por ferimento no caule (Figura 13). As plantas inoculadas com o patógeno na raiz apresentaram uma diminuição no peso da matéria seca, especialmente nos tecidos da raiz, provavelmente devido aos danos ocasionados pela presença de *Phytophthora* spp. nas raízes das plantas, o qual já foi relatado por outros autores, ocasionando perdas nesta cultura (MEDINA FILHO, 2003; TIMMER; MENGE, 1993; TYLER, 2002; WIDMER et al., 1998).

Figura 14 - Peso da matéria fresca e seca das plantas cítricas de tangerina Sunki e citrumele Swingle inoculadas pelo método de imersão + fermento das raízes em suspensão de zoósporos com isolados de *P. citrophthora* (T13: Sunki -T14: Swingle) e *P. nicotianae* (T15: Sunki -T16: Swingle) e, testemunhas (T17: Sunki - T30: Swingle)

Embora fossem observadas diferenças significativas nas variáveis avaliadas nos três métodos de inoculação testados, o método de inoculação escolhido nesta fase foi a inoculação por imersão das raízes na suspensão de zoósporos e sem fermento, devido a que apresentou a maior quantidade de efeitos significativos (Tabela 6). Além disso, é um método que concebe a maior similaridade ao que acontece nas condições naturais. Alguns autores mencionam que o reconhecimento do hospedeiro pelo patógeno inclui a detecção de propriedades químicas, elétricas e físicas do tecido do hospedeiro, incluindo a difusão de produtos químicos na superfície do tecido do hospedeiro, que podem ter efeito nas respostas tácticas de motilidade dos zoósporos.

Esses esporos são atraídos à zona de elongação das raízes, onde encistam, germinam e penetram diretamente, sendo que este fenômeno de atração parece ser uma estratégia para incrementar a probabilidade de infecção (ATTARD et al., 2008; TIMMER; MENGE, 1993; TYLER, 2002).

Tabela 6 - Resumo da comparação de médias pelo teste de Tukey a 5%, e seleção dos tratamentos com diferença significativa nas variáveis de peso da matéria fresca dos tecidos aéreos (PFA) e da raiz (PFR), peso da matéria seca dos tecidos aéreos (PSA) e da raiz (PSR) de plantas inoculadas com *P. citrophthora* (PC) e *P. nicotianae* (PN). O sinal indica diferenças significativas

		Patógenos	PFA	PFR	PSR	PSA
T1	Ferimento Test. Sunki	Controle				
T2	Ferimento Test. Swingle	Controle				
T3	Ferimento –Sunki	PC				
T4	Ferimento –Swingle	PC				
T5	Ferimento –Sunki	PN				
T6	Ferimento –Swingle	PN				
T7	Imersão –Sunki	PC	✓	✓	✓	✓
T8	Imersão –Swingle	PC		✓	✓	✓
T9	Imersão –Sunki	PN	✓	✓	✓	✓
T10	Imersão –Swingle	PN			✓	
T11	Imersão Test.-Sunki	Controle				
T12	Imersão –Test. Swingle	Controle				
T13	Imersão+fer. Sunki	PC	✓			✓
T14	Imersão+fer. Swingle	PC				
T15	Imersão+fer. Sunki	PN	✓		✓	✓
T16	Imersão+fer. Swingle	PN	✓	✓	✓	✓
T17	Imersão+fer. Test. Sunki	Controle				
T18	Imersão+fer. Test. Swingle	Controle				

2.3.4 Seleção *in vivo* dos indutores

As plantas inoculadas apresentaram sintomas da doença aos 7 dias após a inoculação, sendo que os sintomas observados foram de murcha, secamento progressivo das bordas da folha até alcançar toda a lamina folhar, seguida do secamento geral da planta e senescência das folhas

(Figura 15). A maior incidência da doença nas primeiras avaliações foi observada nas plantas inoculadas com *P. citrophthora*, as quais na avaliação aos sete dias a incidência foi de 44,4% comparado com as inoculadas com *P. nicotianae* com 1,58% (Figuras 16 e 17).

Figura 15 - Sintomas em plantas de Tangerina Sunki inoculadas pelo método de imersão de raízes em suspensão de zoósporos de *P. citrophthora* no ensaio de seleção de substâncias indutoras. Sintomas observados aos A. 5 dias, B. 7 dias, C. 10 dias após a inoculação

Figura 16 - Incidência em plantas de tangerina Sunki inoculadas na raiz com zoósporos de *P. citrophthora* e tratadas com substâncias indutoras, segundo a tabela 1. Na legenda cada quadro colorido representa um tratamento: S1, Bion®; S2, Seacrop®; S3, Messenger®; S4, Phytogard®; S5, *S. cerevisiae*; S6, *Nostoc* 61; S7, Silicato de potássio; BG11, Controle contendo meio de cultura da *Nostoc* 61; PC, controle *P. citrophthora*

Essa maior porcentagem média de incidência nas plantas inoculadas com *P. citrophthora* foi mantida até o final do ensaio, onde as plantas inoculadas com este patógeno, e tratadas com as substâncias indutoras, mantiveram uma incidência de 96,8% comparada com as inoculadas nas mesmas condições com *P. nicotianae* que tiveram uma incidência de 77,7% (Figuras 16 e 17). No caso do efeito das substâncias indutoras sobre o desenvolvimento da doença, no patossistema citros- *P. citrophthora*, ao final do ensaio, observou-se menor incidência da doença nas plantas tratadas com Messenger®, em média, 85,7%.

Figura 17 - Incidência em plantas de tangerina Sunki inoculadas na raiz com zoósporos de *P. nicotianae* e tratadas com substâncias indutoras, segundo a tabela 1. Na legenda cada quadro colorido representa um tratamento

No patossistema citros-*P. nicotianae*, em alguns tratamentos a doença apareceu 13 dias após a inoculação, porém foi um comportamento similar ao observado nas plantas com o patógeno sem substância indutora (Figura 18).

Figura 18 - Sintomas em plantas de tangerina Sunki inoculadas com *P. nicotianae* e *P. citrophthora* em presença de tratamento com indutor, Coluna A. Plantas inoculadas *P. nicotianae* + Phytogard®; B. Controle com Phytogard®; C. Plantas inoculadas *P. citrophthora* + Phytogard®; D. Controle *P. nicotianae*; E. Controle água; F. Controle *P. citrophthora*. Na coluna à esquerda apresenta-se as repetições em cada tratamento. Tratamento horizontal (T) e repetições vertical (R)

Ainda que as porcentagens de incidência finais da doença no patossistema citros- *P. nicotianae* não permitiram observar diferenças significativas entre os indutores e o controle, foi possível observar algumas diferenças nos sintomas desses tratamentos (Figura 18).

O melhor comportamento das substâncias nas variáveis avaliadas só foi observado nas variáveis do peso da matéria seca do tecido aéreo e da raiz, em plantas tratadas com Bion[®], Seacrop[®] e Phytogard[®] inoculadas com *P. nicotianae* e *P. citrophthora* (Figuras 19 e 20).

Figura 19 - Plantas de tangerina Sunki inoculadas na raiz com zoósporos de *P. citrophthora* e tratadas com substâncias indutoras, segundo a Tabela 1. O peso da matéria seca dos tecidos foi obtido após 72 horas a 60 °C. Barras indicam a média $\pm$ erro padrão. *Diferença estatística pelo teste de Duncan a 5%

Embora não tenham sido observadas diferenças significativas no peso fresco da parte aérea e das raízes, as plantas apresentaram diferenças no peso da matéria seca de tecidos aéreos e da raiz. Plantas tratadas com os indutores atingiram um maior peso quando comparadas com as plantas tratadas somente com água e as inoculadas com o patógeno.

Ulbrecht e Bowman (2004) encontraram um efeito do patógeno na redução das raízes de citros inoculadas com *P. nicotianae* e *Phytophthora palmivora*, possivelmente devido aos processos de infecção e colonização do patógeno.

Figura 20 - Plantas de tangerina Sunki inoculadas na raiz com zoósporos de *P. nicotianae* e tratadas com substâncias indutoras, segundo a Tabela 1. O peso da matéria seca dos tecidos foi obtido após 72 horas a 60 °C. Barras indicam a média $\pm$ erro padrão. *Diferença estatística pelo teste de Duncan a 5%

2.3.5 Avaliação *in vitro* dos indutores

Os testes de avaliação do efeito direto das substâncias indutoras sobre o crescimento micelial de *P. nicotianae* e *P. citrophthora* *in vitro*, mostraram um efeito de redução no desenvolvimento em comparação com o crescimento dos patógenos no meio de cultura sem os indutores. A maior redução foi observada com os indutores Phytogard®, silicato de potássio e fosfito de potássio, com porcentagens de 70,9; 90,2; 90,2 e 86,5; 79,2; 90,2 para *P. nicotianae* e *P. citrophthora*, respectivamente (Figura 21 e 22). Nas condições deste ensaio, somente as substâncias que tinham como componentes o potássio apresentaram um efeito sobre o desenvolvimento micelial *in vitro* dos patógenos avaliados, corroborando com trabalhos onde tem sido observado o efeito de fosfitos de potássio sobre *Phytophthora* spp (Figura 22).

Figura 21 – Crescimento micelial de *P. nicotianae* sob o efeito das substâncias indutoras de resistência em meio de cultura cenoura-água. Material incubado a 28 °C, fotoperíodo de 12 h luz/12 h escuro. Os valores são médias de 7 repetições ($\pm$ DP). **Diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%

Figura 22 - Crescimento micelial de *P. citrophthora* sob o efeito das substâncias indutoras de resistência em meio de cultura cenoura-ágar. Material incubado a 28 °C, fotoperíodo de 12 h luz/12 h escuro. Os valores são médias de 7 repetições ($\pm$ DP). **Diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%

Figura 22 – Efeito das substâncias indutoras sob o crescimento de *P. citrophthora* (A. Testemunha, B. Fosfito de potássio, C. Phytogard®, D. Silicato de potássio) e *P. nicotianae* (E. Testemunha, F. Fosfito de potássio, G. Phytogard®, H. Silicato de potássio) em meio de cultura cenoura-água. Placas incubadas a 28 °C, sob fotoperíodo de 12 h luz/12 h escuro por 5 dias

O efeito inibidor *in vitro* dos produtos a base de fosfitos, tem sido discutido por muitos autores, os quais apresentam, em seus trabalhos, resultados contraditórios no tocante ao mecanismo de ação destes produtos no patossistema citros- *Phytophthora* spp. Alguns atribuem efeito direto sobre o patógeno, atuando *in vitro* como inibidor do crescimento micelial (FENN; COFFEY, 1984). Outros autores atribuem efeitos a substâncias como o fosfonato de potássio, que seriam substâncias químicas translocadas sistemicamente para proteger as plantas contra oomicetos, induzindo respostas rápidas e localizadas de defesa nas plantas suscetíveis (DANIEL; GUEST, 2006).

Affek and Sztejnberg (1989), com base em tratamentos com fosetyl-Al e ácido fosforoso, em plantas de macrophylla, laranja azeda e limão rugoso, sugeriram que estes induzem resistência em citros pelo aumento na produção de fitoalexinas. Os autores também sugeriram que o efeito *in vivo* do fosetyl-Al pode ocorrer de duas maneiras: tratamentos em níveis baixos do

fosetyl-Al incrementariam os mecanismos de defesa do hospedeiro, e em altos níveis atuariam como um agente fungistático.

2.3.6 Aspectos fisiológicos e bioquímicos das interações citros-*P. nicotianae* e citros- *P. citrophthora* e a resistência induzida

2.3.6.1 Avaliação da doença

Os primeiros sintomas da doença foram observados aos 6 dias após a inoculação, sendo a maior incidência observada nos tratamentos dos controles com patógeno e sem Phytogard® (Figura 23). Os sintomas observados foram os mesmos apresentados nas inoculações anteriores, onde as plantas exibiam sintomas de murcha até alcançarem o secamento total. No caso das plantas tratadas com a substância indutora, as mesmas apresentaram a menor ocorrência da doença, sendo o menor valor observado em plantas de citrumelo Swingle inoculadas com *P. nicotianae* e *P. citrophthora* e tratadas com o Phytogard®, o que pode estar relacionado ao fato de que o citrumelo Swingle é resistente ao *P. nicotianae* (MEDINA FILHO, 2003). Plantas de tangerina Sunki inoculadas com *P. nicotianae* e tratadas com Phytogard® apresentaram uma redução do 50% na incidência em relação as plantas controle em presença do patógeno. A incidência da doença permitiu observar diferenças entre as plantas tratadas e não tratadas nos patossistemas citros – *P. nicotianae* e citros - *P. citrophthora* (Figura 24).

Figura 23 - Incidência em plantas de tangerina Sunki e citrumele Swingle inoculadas na raiz com zoósporos de *P. nicotianae* e *P. citrophthora* e tratadas com indutor, segundo os tratamentos da tabela 2. Na legenda cada quadro colorido representa um tratamento: **5**, Tangerina Sunki + Phytogard® + *P. nicotianae*; **6**, Citrumele Swingle + Phytogard® + *P. nicotianae*; **7**, Tangerina Sunki + Phytogard® + *P. citrophthora*; **8**, Citrumele Swingle + Phytogard® + *P. citrophthora*; **9**, Tangerina Sunki + *P. nicotianae*; **10**, Citrumele Swingle + *P. nicotianae*; **11**, Tangerina Sunki + *P. citrophthora*; **12**, Citrumele Swingle + *P. citrophthora*

Visualmente foi verificada uma redução nas raízes secundárias das plantas tratadas com o indutor e as plantas sem tratamento na presença do patógeno apresentaram uma menor quantidade de raízes secundárias, as quais foram frágeis, sofrendo quebra e descortçamento (Figura 25).

Figura 24 – Plantas de tangerina Sunki (A) e citrumelo Swingle (B) aos 90 dias após a semeadura. Sintomas observados aos 24 dias após a inoculação da raiz com zoósporos de *P. nicotianae* e *P. citrophthora* e tratadas com indutor, segundo os tratamentos da tabela 2: **T1**, Tangerina Sunki + água; **T2**, Citrumelo Swingle + água; **T3**, Tangerina Sunki + Phytogard®; **T4**, Citrumelo Swingle + Phytogard®; **T5**, Tangerina Sunki + Phytogard® + *P. nicotianae*; **T6**, Citrumelo Swingle + Phytogard® + *P. nicotianae*; **T7**, Tangerina Sunki + Phytogard® + *P. citrophthora*; **T8**, Citrumelo Swingle + Phytogard® + *P. citrophthora*; **T9**, Tangerina Sunki + *P. nicotianae*; **T10**, Citrumelo Swingle + *P. nicotianae*; **T11**, Tangerina Sunki + *P. citrophthora*; **T12**, Citrumelo Swingle + *P. citrophthora*

Os efeitos visíveis na redução da incidência da doença em plantas tratadas com a substância indutora, podem resultar das inúmeras substâncias pré-formadas, que exibem atividade antimicrobiana e que estão envolvidas na resistência de plantas contra patógenos (MÉTRAUX, 2007; PASCHOLATI; LEITE, 1994), dos mecanismos de defesa que podem ser ativados como resposta à infecção por *Phytophthora* spp. e do efeito do indutor na ativação desses mecanismos de resposta (PASCHOLATI; LEITE, 1994; PASCHOLATI; TOFFANO, 2007).

Plantas de *citros macrophylla*, laranja azeda e limão rugoso inoculadas com *P. citrophthora* e tratadas com fosetyl-Al ou ácido fosforoso, apresentaram aumento nas concentrações de fitoalexina (escoparone), bem como na diminuição do comprimento da lesão (AFEK; SZTEJNBERG, 1989). Efeitos na redução da infecção em raízes de plantas afetadas por *Phytophthora cinnamomi* foram observadas pela aplicação de fosfonato de potássio e acibenzolar-S-metílico (ALI et al., 2000).

Figura 25 – Sintomas observados em raízes de plantas de tangerina Sunki, inoculadas na raiz com zoósporos de *P. nicotianae* e *P. citrophthora* e tratadas com indutor, 24 dias após a inoculação, segundo os tratamentos da tabela 2: **T1**, Tangerina Sunki + água; **T3**, Tangerina Sunki + Phytogard®; **T5**, Tangerina Sunki + Phytogard® + *P. nicotianae*; **T7**, Tangerina Sunki + Phytogard® + *P. citrophthora*; **T9**, Tangerina Sunki + *P. nicotianae*; **T11**, Tangerina Sunki + *P. citrophthora*. Pode se observar diminuição nas raízes secundárias e descortiçamento das raízes nos tratamentos ao lado direito

Figura 26 – Esporângios e clamidósporos de *P. nicotianae* desenvolvendo-se na borda de iscas de folhas de tangerina Sunki após 4 dias. As setas indicam as estruturas observadas

As iscas com tecidos folhares de tangerina Sunki permitiram observar a presença de *P. nicotianae* e *P. citrophthora* nos tecidos macerados das plantas inoculadas que apresentaram sintomas, foi observado crescimento micelial, clamidósporos e esporângios desenvolvendo-se na borda das folhas (Figura 26).

2.3.6.2 Análises bioquímicas e fisiológicas

2.3.6.2.1 Quantificação de proteínas solúveis totais

O teor de proteínas nas plantas inoculadas com *P. citrophthora* e *P. nicotianae* em presença do indutor Phytogard®, na maioria das avaliações, não foi alterado em comparação com as plantas testemunha com e sem patógeno (Figura 27). Foi possível observar diferenças significativas ($p < 0,05$) no teor de proteínas de plantas de tangerina Sunki inoculadas com *P.*

nicotianae e tratadas com o Phytogard®, quando foram comparadas com as plantas de tangerina Sunki e água aos 24 dias após a inoculação (Figura 27).

Nas Plantas de tangerina Sunki, 24 dias após a inoculação com *P. citrophthora* em presença do indutor, foram observadas diferenças significativas na concentração de proteínas quando comparadas com a testemunha com indutor e sem patógeno. É possível que o maior teor de proteínas apresentado pelas plantas mais o indutor, seja o resultado do efeito do indutor na planta.

Dentro dos mecanismos de defesa das plantas quando são atacadas por patógenos, está a produção de proteínas, as quais podem ser estruturais e proteínas relacionadas à patogênese (DIXON; HARRISON; LAMB; 1994, SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008). Incrementos na concentração das proteínas totais já foram relatados por autores como Albrecht e Browman (2007), em plantas de citros inoculadas com *P. palmivora*. No entanto, esses autores sugeriram que aumentos das proteínas solúveis e compostos fenólicos não estão implicados na defesa primária a *Phytophthora*. Por outro lado, em avaliações realizadas em tecidos de folhas e raízes de tangerina Sunki inoculadas como *P. nicotianae*, não foi possível observar alterações na concentração de proteínas (BELTRAME, 2010).

Nos resultados obtidos neste trabalho, somente foi possível observar um incremento na concentração de proteína, possivelmente ocasionada pelo efeito do indutor, nas plantas de tangerina Sunki.

Figura 27 - Concentração de proteína (mg g⁻¹ tecido fresco) em raízes de plantas cítricas com 90 dias após a semeadura, mensurada em plantas inoculadas com *P. citrophthora* e *P. nicotianae* (PP) em presença do indutor PhytoGard® (PIP) (concentração 1ml L⁻¹; pulverização 5 dias antes e 5 dias após a inoculação); plantas pulverizadas com indutor e sem patógeno (PI) e unicamente com água (PA). A seta indica o dia da inoculação. Barras indicam a média $\pm$ erro padrão. *Diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%

2.3.6.2.2 Quantificação de carboidratos totais e açúcares redutores

Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de açúcares totais em plantas de Tangerina Sunki e citrumelo Swingle inoculadas com *P. citrophthora* e *P. nicotianae* em presença do PhytoGard®, quando foram comparadas com as testemunhas sem o patógeno (Figura 28).

Figura 28 - Concentração de açúcares totais (mg g⁻¹ tecido fresco) em raízes de plantas cítricas de 90 dias após a semeadura, mensurada em plantas inoculadas com *P. citrophthora* e *P. nicotianae* (PP) em presença do indutor Phytogard® (PIP) (concentração 1ml L⁻¹; pulverização 5 dias antes e 5 dias após a inoculação); plantas pulverizadas com indutor e sem patógeno (PI) e unicamente com água (PA). A seta indica o dia da inoculação. Barras indicam a média ± erro padrão. *Diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%

Somente foi possível observar diferenças significativas na concentração de açúcares totais em alguns casos, como nas plantas de tangerina Sunki, após sete dias da inoculação com *P. nicotianae*, em presença do indutor quando foram comparadas com plantas com patógeno e sem indutor; bem como em plantas de citrumelo Swingle, após sete dias da inoculação com *P. nicotianae* em presença do indutor, quando foram comparadas com plantas somente com patógeno.

Plantas de tangerina Sunki inoculadas com *P. citrophthora* e sem o Phytogard[®], apresentaram diferenças aos 14 dias após a inoculação, quando foram comparadas com plantas com aplicação do indutor e sem patógeno ($p < 0,05$). Plantas de citrumelo Swingle inoculadas com *P. citrophthora* apresentaram teor mais alto de proteínas totais ($p < 0,05$), 24 dias após a inoculação, em relação às plantas inoculadas com o patógeno em presença do Phytogard[®] (Figura 28).

A concentração dos açúcares redutores não foi alterada em nenhum dos tratamentos que envolveram a tangerina Sunki. No entanto, foi possível observar um incremento significativo ($p < 0,05$) no teor de açúcares redutores, em plantas de citrumelo Swingle após 7 dias da inoculação com *P. nicotianae* na ausência do indutor, quando foram comparadas com plantas de citrumelo Swingle sem e com Phytogard[®] na ausência do patógeno. Este patossistema também apresentou diferenças significativas aos 14 dias após da inoculação, quando foi comparado com as plantas de citrumelo Swingle mais água (Figura 29).

Sete dias depois da inoculação de *P. citrophthora* em citrumelo Swingle, foram observadas alterações significativas na concentração de açúcares redutores, em relação a seus controles com e sem o indutor. O mesmo comportamento foi observado aos 14 dias após a inoculação, em plantas de citrumelo Swingle – *P. citrophthora* em relação às plantas tratadas com água (Figura 29).

Figura 29 - Concentração de açúcares redutores (mg g⁻¹ tecido fresco) em raízes de plantas cítricas de 90 dias após a semeadura, mensurada em plantas inoculadas com *P. citrophthora* e *P. nicotianae* (PP) em presença do indutor Phytogard® (PIP) (concentração 1ml L⁻¹; pulverização 5 dias antes e 5 dias após a inoculação); plantas pulverizadas com indutor e sem patógeno (PI) e unicamente com água (PA). A seta indica o dia da inoculação. Barras indicam a média ± erro padrão

Uma vez que as plantas são infectadas pelos patógenos, ocorre um aumento na respiração, visto que os tecidos doentes passam a utilizar as reservas de carboidratos para a produção de energia, com objetivo de proteger e regenerar os tecidos injuriados pelo patógeno invasor (LEITE; PASCHOLATI, 1995). As diversas interações patógeno-planta indicam uma enorme complexidade química envolvida. Desse grupo de substâncias químicas, as proteínas e os carboidratos mostram-se como os candidatos mais envolvidos no reconhecimento hospedeiro-patógeno (PASCHOLATI; LEITE, 1994).

No processo de colonização tem sido demonstrado que aminoácidos e açúcares atravessam as membranas que separam os microrganismos. A atividade do ATPases foi demonstrada tanto do lado do patógeno, como do lado da hospedeira, mostrando que a atividade ocorre graças a um investimento metabólico, não se tratando por tanto de um simples processo passivo (LEITE; STANGARLIN, 2008).

2.3.6.2.3 Atividade de β -1,3 glucanase

Nas plantas de tangerina Sunki e citrumelo Swingle, inoculadas com isolados de *P. nicotianae* e *P. citrophthora* em presença ou não do indutor Phytogard[®], não foi possível observar alterações significativas na maioria das amostragens realizadas. Porém, foi possível observar diferença significativa em plantas de tangerina Sunki inoculadas com *P. nicotianae* em presença do indutor, as quais apresentaram uma maior atividade da β -1,3-glucanase 24 dias após a inoculação, em relação às plantas de tangerina Sunki tratadas com ou sem indutor na ausência do patógeno (Figura 30).

Somente foram encontradas diferenças significativas na atividade da β -1,3-glucanase nos tecidos da raiz no patossistema Sunki – *P. nicotianae* ($p < 0,05$). Este comportamento, possivelmente não seja resultado das reações de defesa, pois diferenças significativas foram observadas somente aos 24 dias após a inoculação, quando as plantas já apresentavam sintomas avançados da doença. Esta resposta tardia no processo de defesa, corrobora com as informações de suscetibilidade dos tecidos da tangerina Sunki a estes patógenos (MEDINA FILHO et al, 2004).

Figura 30 - Atividade da β -1,3-glucanase em raízes de plantas cítricas de 90 dias após a semeadura, mensurada em plantas inoculadas com *P. citrophthora* e *P. nicotianae* (PP) em presença do indutor Phytogard® (PIP) (concentração 1ml L⁻¹; pulverização 5 dias antes e 5 dias após a inoculação); plantas pulverizadas com indutor e sem patógeno (PI) e unicamente com água (PA). A seta indica o dia da inoculação. Barras indicam a média $\pm$ erro padrão. *Diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%

2.3.6.2.4 Atividade de catalase

Não foram observadas diferenças significativas na atividade da catalase nas plantas de tangerina Sunki e citrumelo Swingle inoculadas com isolados de *P. nicotianae* e *P. citrophthora* em presença ou não do indutor Phytogard®. Somente foi possível observar que em todos os casos a atividade da catalase aumentou a partir dos sete dias após a inoculação (Figura 31).

Figura 31 - Atividade da catalase (CAT) em raízes de plantas cítricas de 90 dias após a semeadura, mensurada em plantas inoculadas com *P. citrophthora* e *P. nicotianae* (PP) em presença do indutor Phytogard® (PIP) (concentração 1ml L^{-1} ; pulverização 5 dias antes e 5 dias após a inoculação); plantas pulverizadas com indutor e sem patógeno (PI) e unicamente com água (PA). A seta indica o dia da inoculação. Barras indicam a média $\pm$ erro padrão. *Diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%

2.3.6.2.5 Atividade de guaiacol peroxidase

Figura 32 - Atividade da guaiacol peroxidase em raízes de plantas cítricas de 90 dias após a semeadura, mensurada em plantas inoculadas com *P. citrophthora* e *P. nicotianae* (PP) em presença do indutor Phytogard® (PIP) (concentração 1ml L⁻¹—Pulverização 5 dias antes e 5 dias após a inoculação); plantas pulverizadas com indutor e sem patógeno (PI) e unicamente com água (PA). A seta indica o dia da inoculação. Barras indicam a média $\pm$ erro padrão. *Diferença estatística pelo teste de Tuckey a 5%

Plantas de tangerina Sunki e citrumelo Swingle inoculadas com isolados de *P. nicotianae* em presença ou não do indutor Phytogard®, não apresentaram alterações significativas na atividade da guaiacol peroxidase nos tratamentos avaliados (Figura 32). Nos trabalhos conduzidos por Teixeira, 2005, não foram observadas diferenças significativas na expressão de genes do tipo GPOX que codificam as enzimas peroxidases, em plantas de *P. trifoliata* e tangerina Sunki quando inoculadas com *P. parasitica*.

Plantas de tangerina Sunki inoculadas com *P. citrophthora*, 24 h após a inoculação, apresentaram alterações significativas ($p < 0,05$) em relação às plantas deste mesmo genótipo na ausência do patógeno e tratadas com água. Apesar de não ter sido possível detectar alterações na guaiacol peroxidase nos outros tratamentos testados, o fato de se observar uma alteração desta enzima 24 h após a inoculação, isso pode estar associado aos mecanismos de resposta da planta, chamado por muitos autores como explosão oxidativa (OKEY et al., 1997; REZENDE et al., 2003; ULBRECHT; BOWMAN, 2007).

Não foram encontradas alterações na atividade das enzimas β -1,3- glucanase, catalase, peroxidase e o teor de proteínas, açúcares totais e redutores que explicassem a indução nas plantas tratadas com fosfitos. Diversos trabalhos têm mostrado que o fosfito pode ser translocado na planta e induzir os mecanismos de defesa das mesmas (DANIEL; GUEST, 2006; SMILLIE; GRANT; GUEST, 1989).

3 CONCLUSÕES

Nas condições deste trabalho, o melhor método de inoculação de plantas tangerina Sunki e citrumelo Swingle com 90 dias após a semeadura, foi a inoculação de *P. nicotianae* e *P. citrophthora* por imersão das raízes em suspensão de zoósporos;

As substâncias Phytogard[®], fosfito de potássio e silicato de potássio apresentaram um efeito significativo na inibição do crescimento *in vitro* de *P. nicotianae* e *P. citrophthora*;

O Phytogard[®] diminuiu a incidência de *P. nicotianae* e *P. citrophthora* em plantas de tangerina Sunki e citrumelo Swingle;

REFERÊNCIAS

- AFEK, U.; SZTEJNBERG, A. Effects of fosetyl-Al and phosphorous acid on scoparone, a phytoalexin associated with resistance of citrus to *Phytophthora citrophthora*. **Phytopathology**, Lancaster, v.79, n. 7, p. 736-739, 1989.
- ALI, Z.; SMITH, I.; GUEST, D.A. Combinations of potassium phosphonate and Bion (acibenzolar-S-methyl) reduce root infection and dieback of *Pinnus radiata*, *Banksia integrifolia* and *Isopogon cuneatus* caused by *Phytophthora cinnamomi*. **Australasian Plant Pathology**, v. 29, p. 59-63, 2000.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, 2004.
- ARAÚJO, J.R.G. **Caracterização química, bioquímica e horticultural de microtangerinas (Citrus spp.), de valor potencial como porta-enxertos**. 1998. 155p. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 1998.
- ASADA, K. Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 85, p. 235-241, 1992.
- ATTARD, A.; GOURGUES, M.; GALIANA, E.; PANABIÈRES, F.; PONCHET, M.; KELLER, H. Strategies of attack and defense in plant – oomycete interactions, accentuated for *Phytophthora parasitica* Dastur (Syn. *P. nicotianae* Breda de Hann). **Journal of Plant Physiology**, New York, v. 165, p. 83-94, 2008.
- BANCI, L. Structural properties of peroxidases. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 53, n.1, p. 253- 263, 1997.
- BARCELÓ, A.R.; POMAR, F.; SERRANO, M.L.; PEDREÑO, M. A. Peroxidase: a multifunctional enzyme in grapevines. **Funct. Plant Biology**, Malden, v. 30, p. 577-591, 2003.
- BELTRAME, A.B. **Efeito das cianobacterias e algas eucarióticas na resistência de plantas de fumo contra o Tobacco Mosaic Virus (TMV)**. 2005. 87 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2005.
- BELTRAME, A.B.; FLEISCHMANN, F.; KOEHL, J.; OSSWALD, W.; PASCHOLATI, S.F. Alterações fisiológicas e no metabolismo primário em plântulas de citros inoculadas com *Phytophthora nicotianae*. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 32. 2009, **Anais....**São Pedro, 2009. Resumo: 062.

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

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**, Rockville, Maryland, p. 1406, 2000.

CAVALCANTI, L.S.; RESENDE, M.L.V. Efeito da época de aplicação e dosagem do acibenzolar-S-metil na indução de resistência à murcha-de-verticillium em cacauzeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 67-71, 2005.

CIA, P. **Avaliação de agentes bióticos e abióticos na indução de resistência e no controle pós-colheita de antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em mamão (*Carica papaya*).** 2005. 197 p. Tese. (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

DANIEL, R.; GUEST, D.I. Defence responses induced by potassium phosphonate in *Phytophthora palmivora*-challenged *Arabidopsis thaliana*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.67, p. 194–201, 2006.

DAT, J.; VANDENABEELE, S.; VRANOVÁ, E.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; VAN BREUSEGEM, F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Science**, London, v. 55, p. 779-795, 2000.

DEL RIO, L.A.; PASTORI, G.M.; PALMA, J.M.; SANDALIO, L.M.; SEVILLA, F.; CORPAS, F.J.; JIMÉNES, A.; LÓPES-HUERTAS, E.; HERNÁNDEZ, J.A. The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, p.1195-1200, 1998.

DI PIERO, R.M. **Potencial dos cogumelos *Lentinula edodes* (Shiitake) e *Agaricus blazei* (Cogumelo do sol) no controle de doenças em plantas de pepino, maracujá e tomate, e a purificação parcial de compostos biologicamente ativos.** 2003. 157 p. Tese. (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2003.

DIRAC, M.F.; MENGE, J.A.; MADORE, M. Comparison of seasonal infection of citrus roots by *Phytophthora citrophthora* and *P. nicotianae* var. parasitica. **Plant Diseases**, Sant Paul, v.87, n.5, p. 493-501, 2003.

DIXON, R.A.; HARRISON, M.J.; LAMB, C.J. Early events in the activation of plant defense responses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.32, p. 479-501, 1994.

DUNSTAN, R.H.; SMILLIE, R.H.; GRANT, B.R. The effects of sub-toxic levels of phosphonate on the metabolism and potential virulence factors of *Phytophthora palmivora*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.36, p. 205-220, 1990.

ERWIN, D.C.; RIBEIRO, O.K. **Phytophthora Diseases Worldwide**. Sant Paul, Minnesota, American Phytopathological Society, 1996. 562p.

FEICHTENBERGER, E. Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros. In LUZ, E.D.M.N.; MATSUOKA, K.; SANTOS, A.F.(Ed.). **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Piracicaba; Livraria Rural, 2001. cap. 10, p. 283-342.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.M.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE JUNIOR, J. Doenças dos citros. IN: KIMATI, H.; AMORIM, L.; RESENDE, J.A.M.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2005. cap. 28, v.2, p. 239- 269.

FEIRABEND, J. Catalases in plants: molecular and functional properties and role in stress defense. IN: SMIRNOFF, N. (Ed.) **Antioxidants and reactive oxygen species in plant**. Editora Blackwell Publishing, 2005. p.101- 130.

FENN, M.E.; COFFEY, M.D. Studies on the *in vitro* and *in vivo* antigungal activity of Fosetyl-Al and Phosphorous acid. **Phytopathology**, Lancaster, v.74, n. 5, p. 606-611, 1984.

FNP Consultoria e Informações em Agronegocio 20/10/2010 – Citros
<http://www.fnp.com.br/noticia/865>

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiology Plant**. St Paul, v. 119, p. 355-364, 2003.

FRUGOLI, J.A.; ZHONG, H.H.;NUCCIO, M.L.; McCOURT, P.;McPEEK, M.A.; THOMAS, T. L.;McCLUNG, C.R. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 112, p. 327-336, 1996.

Fundecitrus. 2009. **Gomose de *Phytophthora***. Disponível em:
<http://fundecitrus.com.br/doencas/gomose.html>. acesso em: 20 fev.2009.

GALEANO, D.M.; GUZZO, S.D.; ALVES PATRICIO, F.R. HAKAKAWA, R. Proteção do cafeeiro contra cercosporiose por acibenzolar-S-metil e proteína harpina. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 45, n.7, p.686-692, 2010.

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

GRAHAM, J.H, CASTLE, W.S. Screening citrus genotypes for tolerance to *Phytophthora* root rot in chlamydospore – infested soil. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRUS, 6., 1993. Nurserymen. **Proceedings...** Nurserymen, 1993. p. 1 – 13.

GRAHAM, J.H., TIMMER, L.W. Phytophthora diseases of Citrus. **Soil and Science Department**, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. SL 127. Original publication date January 1994. Visit the EDIS Web Site at <http://edis.ifas.ufl.edu>.

GOLBERG, R., CATESSON, A.M. ;CZANINSKI, Y. Some properties of syringaldazine oxidase, a peroxidase specifically involved in the lignification processes. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v.110, p.267-279, 1983.

GUPTA, A.S.; WEBB, R.P.;HOLADAY, A.S.; ALLEN, R.D. Overexpression of speroxide dismutase protects plants from oxidative stress. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 103, p. 1067-1073, 1993.

GUZZO, S.D. Proteínas relacionadas a patogênese. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Porto Alegre, v. 11, p. 283-332, 2003.

HAMMERSCHMIDT, R. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens?. **Physiological and molecular Plant Pathology**, London, v. 55, p. 77 - 84, 1999.

HAVIR, E.A.; McHALE, N.A. Enhanced-peroxidatic activity in specific catalase isozymes of tobacco, barley, and maize. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 91, p. 812-815, 1989.

HEISER, I.; OSSWALD, W.F. Formação e função das espécies reativas de oxigênio nas interações planta-patógeno. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R. ; CIA, P. (Ed.). **Interação planta-patógeno: Fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 249-282.

HIRAGA, S., SASAKI, K., ITO, H., OHASHI, Y. & MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidases. **Plant Cell Physiology**, London, v. 42, n. 5, p. 462-468, 2001.

IAC, 2009. Citros: principais informações e recomendações de cultivo. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/Tecnologias/Citros/Citros.htm>. acesso em: 06 out. 2010.

KUNH, O. Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por Acinbenzolar – S-metil e *Bacillus cereus*: Aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção. 2007. 140 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

LAMOTTE, O.; LA CAMERA, S.; MÉTRAUX, J.P. Innate immunity in plantas and how virulent pathogens cope-with – Studies on the Interaction of *Arabidopsis thaliana* and *Botrytis cinerea*. In: Indução de resistência novos conceitos e aplicações. In: REUNIÃO BRASILEIRA DOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A PATÓGENOS, 5.,2010.Lavras. **Anais...** Lavras, 2010. p. 17-28.

LAWTON, K.A.; FRIEDRICH, L.; HUNT, M.; WEYMANN, K.; DELANEY, T.; KESSMANN, H.; STAUB, T. ; RYALS, J. Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. **Plant Journal for Cell and Molecular Biology**, Oxford, v.10, p.61-70, 1996.

LEITE, B.; STANGARLIN, J.R. Fisiologia e bioquímica de doenças fungicas. IN: PASCHOLATI, S.F.; LEITE., B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação planta-patógeno**: Fisiologia, bioquímica e biologia molecular. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 115-152.

MARTINS, E.M.F. Proteínas relacionadas à patogênese. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE. B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação planta-patógeno**: Fisiologia, bioquímica e biologia molecular. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 387- 410.

MATHERON, M.E.; WRIGHT, G.C.; PORCHAS, M. Resistance to *Phytophthora citrophthora* and *P. parasitica* and nursery characteristics of several citrus rootstocks. **Plant Diseases**, Sant Paul, v. 82, p. 1217-1225, 1998.

MEDEIROS, F.C.L.; MEDEIROS, F.H.V.; RESENDE, M.L.V.; PARE, P.W. Expressão gênica comparativa: O caso Fitoforce®. In: Indução de resistência novos conceitos e aplicações. In: REUNIÃO BRASILEIRA DOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A PATÓGENOS, 5.,2010.Lavras. **Anais...** Lavras, 2010. p. 161-170.

MEDINA FILHO, H.P.; BORDIGON, R.; SIQUEIRA, W.J.; FEICHTENBERGER, E.; CARVALHO, M.R.T.; SOBRINHO, J.T. 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. 169-178, 2003.

MEDINA FILHO, H.P.; BORDIGON, R.; SIQUEIRA, W.J.; FEICHTENBERGER, E.; CARVALHO, M.R.T.; SOBRINHO, J.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.

MÉTRAUX, J.P. Induced defenses in plants. In: RODRIGUEZ, F.; ROMEIRO, R. Indução de resistência em plantas a patógenos. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A PATÓGENOS, 3., 2007. VIÇOSA. **Anais...** Viçosa, 2007. p. 7-24.

MIKA, A.; LUTHJE, S. Properties of guaiacol peroxidase activities isolated from corn root plasma membranes. **Plant Physiology**, Washington, v.132, p. 1489-1498, 2003.
MITLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Science**, London, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

NAVROT, N.; ROUHIER, N.; GELHAYE, E.; JACQUOT, J. P. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. **Physiology Plant**, Berne, v. 129, p. 253-266, 2007.

NEILL, S.J.; DESIKAN, R.; CLARKE, A.; HURST, R.D.; HANCOCK, J. T. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. **Journal experimental of Botany**, Oxford, v. 53, p. 1237-1247, 2002a.

NEILL, S.J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J.T. Hydrogen peroxide signaling. **Current Opinion Plant Biology**, Stuttgart, v. 5, p. 388-395, 2002b.

OLSON, P.D.; VARNER, J.E. Hydrogen peroxide and lignification. **Plant Journal**, Oxford, v. 4, n. 5, p. 887-892, 1993.

OKEY, N.E.; DUNCAN, E.J.; SIRJU-CHARRAN.; SREENIVASAN, T.N. *Phytophthora* canker resistance in cacao: Role of peroxidase, polyphenoloxidase and phenylalanine ammonia-lyase. **Journal Phytopathology**, Berlin, v. 145, p. 295-299, 1997.

PASCHOLATI, S.F., BLUMER, S., REZENDE, D.C., BRAND, S.C. Resistência sistêmica adquirida (SAR) x Resistência sistêmica induzida (ISR). In: Indução de resistência novos conceitos e aplicações. REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A PATÓGENOS, 5., 2010. Lavras. **Anais...** Lavras, 2010. p. 29-40.

PACHOLATI, S.F.; LEITE, B. Mecanismos de resistência às doenças. In: WILMAR C da LUZ. (Org.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, RS: v. 2, p. 1-51, 1994.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência: In: BERGAMIN, F.A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed) **Manual de Fitopatologia**: Princípios e conceitos. São Paulo: Ed. Agrônoma Ceres, 1995. v.1. p. 193-217.

PASCHOLATI, S.F.; TOFFANO, L. Indução de resistência contra fitopatógenos em espécies arbóreas. In: RODRIGUEZ, F.; ROMEIRO, R. Indução de resistência em plantas a patógenos. REUNIÃO BRASILEIRA DOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A PATÓGENOS, 3., 2007. Viçosa, **Anais...** Viçosa, 2007. p.59-66.

PASCHOLATI, S.F.; VILLA, G.A.S. Induction of resistance in plants against *Phytophthora spp.* **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.35, p. 75, 2010. (Suplemento).

POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: DE MATTOS-JUNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M. POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). Campinas: **Citros**, 2005. p.63-104.

QUAN, L.J.; ZHANG, B.; SHI, W.W. ; LI, H.Y. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. **Journal of Integrative Plant Biology**, China, v.50, n.1, p. 2-18, 2008.

RAPPUSI-DA-SILVA, M. C.C. **Efeito da quitosana e da radiação UV-C no controle de *Guinardia citricarpa* em laranja pós-colheita**. 2006. 82 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2006.

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.

RESENDE, M.L.V.; BARRETTI, P.B.; MEDEIROS, F.C.L.; SILVA, D.D.; PEREIRA, R.B.; LINS, S.R.O.; PEREIRA, L.M.; CAMPOS, M.A. Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra patógenos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 15, p. 173-242, 2007.

REZENDE, D., RODRIGUES, F.A., CARRIE-MISSIO, C.V., SCHURT, D.A, KAWAMURA, I.K, KONGDORFER, G.H. Effect of root and foliar applications of silicon on Brown spot development in Rice. **Australasian Plant Pathology**, Sidney, v. 38, n. 1, p. 67–73, 2009.

RIBEIRO, P.M. **Fosfitos na proteção e na indução de resistência do cafeeiro contra *Hemilia vastatrix* e *Cercospora coffeicola***. 2008. 105 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

ROMEIRO, R.S. Indução de resistência em plantas a patógenos. IN: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; Cia, P. (Ed.) **Interação planta - patógeno**: Fisiologia, bioquímica e biologia molecular. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 411-431.

SIVIERO, A.; FURTADO, E.L.; BOAVA, L.P.; BARBASSO, D.V.; MACHADO, M.A. Avaliação de métodos de inoculação de *Phytophthora parasitica* em plântulas e plantas jovens de citros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 6, p. 574-580, 2002.

SCHWAN-ESTRADA, K.; STANGARLIN, R.; PASCHOLATI, S.F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.) **Interação planta - patógeno**: Fisiologia, bioquímica e biologia molecular. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 227-283.

SMILLIE, R.; GRANT, B.R.; GUEST, D. The mode of action of phosphite; Evidence for both direct and indirect modes of action on three *Phytophthora sp.* in plants. **Phytopathology**, Lancaster, v.79, n.9, p. 921-926, 1989.

TEXEIRA, J.E. de C. **Genes de defesa de *Citros Sunki* e *Poncirus trifoliata*. Expressão constitutiva e induzida por *Phytophthora nicotianae***. 2005. 105p. Dissertação (Mestrado em fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

TIMMER, L.W.; MENGE, J.A. *Phytophthora* induced diseases. In: TIMMER, L.W.; GARNSEY, J.S.M.; GRAHAM, J.H. **Compendium of citrus diseases**. Sant Paul: Minnesota: APS Press, 1993. 80 p.

TYLER, B.M. Molecular basis of recognition between *Phytophthora* pathogens and their hosts. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 137–67, 2002.

TOFFANO, L. Doenças pós-colheita em citros: potencial do *Lentinula edodes*, *Agaricus blazei*, ácido jasmônico, albedo (*Citrus sinensis* var Valência) e flavedo (*Citrus aurantifolia* var Tahiti) no controle na indução de resistência. 2005. 86 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2005.

TONUCCI, N. Efeito de extratos aquosos do basidiocarpo e micélio de *Lentinula edodes* (Shiitake) sobre *Colletotrichum sublineolum*, *Alternaria solani*, *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae* e *Tobacco Mosaic Virus* TMV. 2004. 87 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

ULBRECHT, U.; BOWMAN, K.D. Growth comparison of citrus rootstocks after artificial infection with *Phytophthora*. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Florida, v.117, p. 156-160, 2004.

ULBRECHT, 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, p. 6060-615, 2007.

VAN LOON, L.C.; VAN STRIEN, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, p. 85 - 97, 1999.

VAN LOON, L. C.; REP. M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.44, p. 135-162, 2006.

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**, Lancaster, v. 88, n. 5, p. 389-395, 1998.

WILLEKENS, H.; VILLARROEL, R.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; VAN CAMP, W. Molecular identification of catalases from *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). **FEBS Letters**, Amsterdam, v.352, p. 79-83, 1994.

WILLEKENS, H.; CHAMNONGPOL, S.; DAVEY, M.; SCHRAUDNER, M.; LANGEBAEELS, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; VAN CAMP, W. Catalase is a sink for H₂O₂ and indispensable for stress defense in C₃ plants. **Embo Journal**, Oxford, v.16, p. 4806-4816, 1997.

YANG, T.; POOVAIAH, B. W. Hydrogen peroxide homeostasis activation of plant catalase by calcium/calmodulin. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 99, p. 4097-4102, 2002.

YOSHIDA, K., KAOTHIE, P., MATSUI, T.; SHINMYO, A. Molecular biology and application of plant peroxidase genes. **Current advances In Applied Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 60, p. 665-670, 2003.

ZITCO, S.E.; TIMMER, L.W. Competitive parasitic abilities of *Phytophthora parasitica* and *P. palmivora* on fibrous roots of citrus. **Phytopathology**, Lancaster, v. 84, n. 10, p. 1000-1004, 1994.