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

Taxtomina A e *Piriformospora indica* no controle de *Phytophthora nicotianae* em citros e *Phytophthora plurivora* em faia (*Fagus sylvatica*)

Simone Cristiane Brand

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

**Piracicaba
2016**

Simone Cristiane Brand
Engenheira Agrônoma

Taxtomina A e *Piriformospora indica* no controle de *Phytophthora nicotianae* em citros e *Phytophthora plurivora* em faia (*Fagus sylvatica*)
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI**

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

Piracicaba
2016

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

Brand, Simone Cristiane

Taxtomina A e *Piriformospora indica* no controle de *Phytophthora nicotianae* em citros e *Phytophthora plurivora* em faia (*Fagus sylvatica*) / Simone Cristiane Brand. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.
136 p. : il.

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

1. Gomose 2. Endofítico radicular 3. Toxina 4. *Citrus sunki* 5. Acibenzolar-S-metilico
6. Suscetibilidade induzida I. Título

CDD 632.452
B817t

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

*Para aqueles que acreditaram em mim
quando eu não mais acreditava em mim mesma.*

*Para aqueles que com seu sorriso
removeram a sombra do meu rosto.*

*Para aqueles que trocaram, sem regatear,
sua alegria sincera pelos meus pesares.*

*Para aqueles cujo amor e cujo riso
me deram asas e um céu azul para voar.*

*Para aqueles por quem minha gratidão será sempre pequena,
nesta vida ou na próxima.*

Bradley Trevor Greive

Aos meus pais,

Guído Afonso Brand e Romana Franke Brand,

E minha irmã,

Sílvane Isabel Brand,

a razão pela qual essa conquista hoje é alcançada!

*pelo exemplo de vida, educação, confiança, amor, caráter e
perseverança em todos os dias de minha vida. Pelo apoio incondicional
em todas as etapas e decisões ao longo desses anos. E pela força para
superar a distância, muitas vezes dolorida.*

DEDICO com todo o meu amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e por todas as alegrias e momentos de superação proporcionados ao longo desses anos. Não há palavras para agradecer a infinidade de bênçãos. Também pelas pessoas que permitiu que cruzassem a minha estrada e auxiliassem na realização de mais este sonho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, junto com a equipe docente, pela oportunidade de realização do curso de Doutorado e pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Sérgio F. Pascholati pelos ensinamentos acadêmicos e de vida ao longo de seis anos, durante a realização do mestrado e doutorado. Agradeço pela orientação, conselhos, paciência e amizade. És um grande mestre!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela concessão da bolsa de estudos. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche.

À Dra. Silvia Blumer e à Dra. Rafaela Roma pela ajuda nas discussões do trabalho, pelo auxílio na condução à distância da parte final do doutorado e, principalmente, pela amizade.

Às queridas amigas e colegas Dalilla Rezende e Caroline Rabelo pela presença em todos os momentos ao longo destes anos. Pelas palavras de apoio, pelo auxílio nos trabalhos, pelos momentos de descontração, o meu agradecimento especial.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica: Carla Pelizari, Cynthia Renata Lima Sá, Dayson Brandão, Luiz Rafael Pinto, Nívea Tonucci, Sara Mondoni e Thiago Anchieta pelos momentos de descontração que partilhamos e pelo aprendizado.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Epidemiologia: Ana Raquel Soares Colletti, Isabela Primiano, Josi Hüffner Arruda, Juliana Baggio, Meyrielle Pires de Camargo, Paula Panosso, Antônio Fernandes Nogueira Júnior, Renan Fernandes, Ricardo Feliciano dos Santos, a técnica Silvia Lourenço e à Dra. Maria Cândida Gasparoto pela troca de ideias, auxílio e amizade.

Aos colegas do doutorado e disciplinas Carla Pelizari, Guilherme Frare, Paulo Sérgio e Thays Benytes pela convivência e estudos conjuntos. Desejo sucesso à vocês.

Ao Prof. Dr. Francisco André Tanaka e o Técnico Renato Salaroli pela ajuda no preparo das amostras para visualização em Microscopia Eletrônica de Varredura.

Ao Prof. Dr. Luiz Eduardo Aranha Camargo e o M.Sc. Raphael Severo Faria do Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Fitopatologia ESALQ/USP, pelo auxílio na análise de expressão gênica. À Mariana Cicarelli Cía pela ajuda nas análises de qPCR.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia e Nematologia pelo auxílio sempre que necessário.

À Fundecitrus e ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira pelo fornecimento das sementes de tangerina 'Sunki' para a condução dos ensaios.

Ao Prof. Dr. Wolfgang Osswald, ao Dr. Frank Fleischmann, a secretária Martina, a técnica de laboratório Tina Schmidt e a técnica Martina da Universidade Técnica de Munique pelo auxílio na condução dos trabalhos durante a realização do doutorado-sanduíche e pelos momentos de convivência e conhecimento da cultura alemã, meu muito obrigada. Aos amigos que fiz na Alemanha: Edson Alves, Eduardo Valim, Gustavo Ferreira, Hudson Eustaquio, Mônica Teixeira e Lia Wentzel pelo convívio, ajuda e amizade que foram essenciais durante esse período. Pelos colegas de república da "Blumenstrasse" pela troca de experiências culturais de diversos países do mundo e convivência agradável. Agradeço a Deus pela oportunidade única de conhecer locais no mundo pelos quais nunca imaginava passar.

À Prof.^a Dra. Elena Blume e Prof.^a Dra. Marlove Muniz pela valiosa contribuição no início da minha vida acadêmica e científica e pela amizade. Aos amigos do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Maria pelo apoio.

Aos demais amigos da ESALQ e aos amigos que mesmo distantes torceram por mim e contribuíram para que hoje eu estivesse aqui.

Às amigas de República ao longo destes seis anos de Piracicaba: Luciane Mendes, Francynes Macedo, Rafaela Santos, Gislaine Reis, Talita Egevardt, Jaislanny Medeiros, Marina Medeiros, Meire Alves, Rafaela Felipe e Vanessa Caron pelos momentos de alegrias e choros compartilhados. Ao nosso cachorrinho Otto que tornou os dias mais alegres.

Ao Matheus Lourenço pelo carinho e cuidado sempre especiais. Suas palavras e sua alegria de viver tornaram a caminhada mais leve e feliz.

Aos colegas da Cooperativa Agroindustrial dos Produtores Rurais do Sudoeste Goiano – COMIGO e do Centro Tecnológico Comigo (CTC) pela oportunidade de início da vida profissional, momentos de descontração, aprendizagem e apoio no término do doutorado.

Aos meus pais Guido e Romana pelo carinho, educação e tudo que me proporcionaram na vida. Pessoas abençoadas que souberam ver a importância da formação acadêmica mesmo não tendo a oportunidade desta. À minha irmã Silvana, pela amizade, conselhos e troca de ideias por compartilharmos a mesma profissão.

Aos familiares que mesmo de longe torceram muito por mim. Um agradecimento especial a minha querida tia, irmã e amiga Bia.

Enfim, a todos que de uma ou outra forma acompanharam essa caminhada e contribuíram na construção deste trabalho.

Todos fazem parte desta conquista. Muito obrigada, de coração!

*“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.
Muito, nos aproxima.”*

Louis Pasteur

*Ante o alvo
Há muito que fazer.
Não te queixes. Trabalha.
Companheiros falharam?
Prossegue e terás outros.
Não queres certo grupo?
Outras áreas te esperam.
Desilusões à vista?
Não pares. Continua.
Buscai a Paz de Deus?
O serviço é o caminho.
Ante o alvo, os que seguem
É que podem chegar.*

Emmanuel

*A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.*

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	17
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	19
Referências.....	20
2 TAXTOMINA A NO CONTROLE DE <i>Phytophthora</i> spp. EM PLÂNTULAS DE FAIA (<i>Fagus sylvatica</i>) E CITROS (<i>Citrus sunki</i>).....	23
Resumo.....	23
Abstract.....	24
2.1 Revisão Bibliográfica.....	24
2.1.1 Citricultura Brasileira.....	24
2.1.2 <i>Phytophthora</i> em citros no Brasil.....	26
2.1.3 <i>Phytophthora</i> em faia (<i>Fagus sylvatica</i>) na Alemanha.....	27
2.1.4 Indução de Resistência no Controle de Fitopatógenos.....	28
2.1.5 Controle Biológico de Fitopatógenos.....	29
2.1.6 Mecanismos de Ataque de Fitopatógenos.....	31
2.1.6.1 Fitotoxinas.....	31
2.1.6.1.1 Fitotoxinas no controle de fitopatógenos.....	31
2.1.6.1.2 Taxtomina A produzida por <i>Streptomyces scabies</i>	32
2.1.7 Objetivos.....	34
2.2 Material e Métodos.....	34
2.2.1 Efeito da taxtomina A produzida por <i>Streptomyces scabies</i> sobre <i>Phytophthora plurivora</i>	34
2.2.1.1 Produção e extração da taxtomina A.....	34
2.2.1.2 Identificação e purificação da fitotoxina taxtomina A.....	35
2.2.1.3 Efeito <i>in vitro</i> da taxtomina A sobre o crescimento micelial de <i>Phytophthora plurivora</i>	36
2.2.1.4 Efeito <i>in vitro</i> de compostos voláteis produzidos por <i>Streptomyces scabies</i> no crescimento micelial de <i>Phytophthora plurivora</i>	36
2.2.1.5 Verificação do efeito de antibiose entre <i>Streptomyces scabies</i> e <i>Phytophthora plurivora</i>	37
2.2.1.6 Efeito da taxtomina sobre a motilidade de zoósporos de <i>Phytophthora plurivora</i>	37

2.2.2 Tratamento de plântulas de faia com taxtomina A via sistema radicular com vistas a indução de resistência.....	37
2.2.2.1 Obtenção das plântulas de faia.....	37
2.2.2.2 Obtenção do inóculo de <i>Phytophthora plurivora</i>	38
2.2.2.3 Toxicidade e efeito indutor de resistência da taxtomina A sobre plântulas de faia.....	39
2.2.2.4 Absorção de água.....	40
2.2.2.5 Fluorescência da clorofila.....	41
2.2.2.6 Mortalidade das plântulas.....	41
2.2.2.7 Quantificação de <i>Phytophthora plurivora</i>	41
2.2.2.7.1 Extração e purificação de DNA.....	41
2.2.2.7.2 Quantificação de <i>Phytophthora plurivora</i>	42
2.2.3 Efeito da taxtomina A produzida por <i>Streptomyces scabies</i> sobre <i>Phytophthora nicotianae</i>	43
2.2.3.1 Efeito <i>in vitro</i> da taxtomina sobre o crescimento micelial e a motilidade de zoósporos de <i>Phytophthora nicotianae</i>	43
2.2.4 Tratamento de plântulas de citros com taxtomina A via sistema radicular com vistas a indução de resistência.....	43
2.2.4.1 Obtenção das plântulas de citros.....	43
2.2.4.2 Obtenção inóculo de <i>Phytophthora nicotianae</i>	44
2.2.4.3 Toxicidade e efeito indutor de resistência da taxtomina A sobre plântulas de citros.....	44
2.2.4.4 Avaliações.....	45
2.2.4.5 Quantificação de <i>Phytophthora nicotianae</i>	45
2.2.4.6 Análises bioquímicas.....	45
2.2.4.6.1 Preparo do extrato proteico	46
2.2.4.6.2 Proteínas totais.....	46
2.2.2.6.3 Atividade da β -1,3-glucanase.....	46
2.3 Resultados.....	47
2.3.1 Efeito da taxtomina A produzida por <i>Streptomyces scabies</i> sobre <i>Phytophthora plurivora</i>	47
2.3.1.1 Efeito <i>in vitro</i> da taxtomina sobre o crescimento micelial de <i>Phytophthora plurivora</i>	47

2.3.1.2 Efeito <i>in vitro</i> de compostos voláteis produzidos por <i>Streptomyces scabies</i> no crescimento micelial de <i>Phytophthora plurivora</i>	47
2.3.1.3 Verificação de antibiose entre <i>Streptomyces scabies</i> e <i>Phytophthora plurivora</i>	48
2.3.1.4 Efeito da taxtomina sobre a motilidade de zoósporos de <i>Phytophthora plurivora</i>	49
2.3.2 Tratamento de plântulas de faia com taxtomina A via sistema radicular com vistas a indução de resistência.....	50
2.3.2.1 Absorção de água.....	50
2.3.2.2 Fluorescência da clorofila.....	51
2.3.2.3 Mortalidade das plântulas.....	52
2.3.2.4 Quantificação de <i>Phytophthora plurivora</i>	54
2.3.3 Efeito da taxtomina A produzida por <i>Streptomyces scabies</i> sobre <i>Phytophthora nicotianae</i>	55
2.3.3.1 Efeito <i>in vitro</i> da taxtomina sobre o crescimento micelial de <i>Phytophthora nicotianae</i>	55
2.3.3.2 Efeito da taxtomina sobre a motilidade de zoósporos de <i>Phytophthora nicotianae</i>	56
2.3.4 Tratamento de plântulas de citros com taxtomina A via sistema radicular com vistas a indução de resistência.....	57
2.3.4.1 Absorção de água.....	57
2.3.4.2 Fluorescência da clorofila.....	58
2.3.4.3 Mortalidade das plântulas.....	59
2.3.4.4 Quantificação de <i>Phytophthora nicotianae</i>	59
2.3.4.5 Análises bioquímicas.....	60
2.4 Discussão.....	63
2.5 Conclusões.....	67
Referências.....	67
Apêndices.....	75
3 <i>Piriformospora indica</i> NO CONTROLE DE <i>Phytophthora</i> spp. EM PLÂNTULAS DE FAIA (<i>Fagus sylvatica</i>) E CITROS (<i>Citrus sunki</i>).....	77
Resumo.....	77
Abstract.....	77

3.1 Revisão Bibliográfica.....	78
3.1.1 <i>Piriformospora indica</i>	78
3.1.1.1 Aspectos gerais	78
3.1.1.2 Colonização do sistema radicular.....	79
3.1.1.3 Potencial indutor de resistência.....	80
3.1.1.4 Promoção de crescimento.....	82
3.1.2 Objetivos.....	83
3.2 Material e Métodos.....	83
3.2.1 Investigações histológicas e moleculares em plantas de faia infectadas com <i>Piriformospora indica</i>	83
3.2.1.1 Inoculação de plântulas de faia com <i>Piriformospora indica</i>	83
3.2.1.2 Confirmação da infecção de <i>Piriformospora indica</i> por microscopia de luz.....	83
3.2.1.3 Extração e purificação de DNA.....	84
3.2.1.4 Confirmação da infecção de <i>Piriformospora indica</i> por PCR em plantas de faia e plântulas de citros.....	85
3.2.1.5 Purificação de DNA usando NAAc/EtOH.....	86
3.2.1.6 Sequenciamento.....	87
3.2.1.7 Obtenção do inóculo de <i>Phytophthora plurivora</i>	87
3.2.1.8 Quantificação de <i>Phytophthora plurivora</i>	88
3.2.2 Inoculação de plântulas de faia com <i>P. indica</i> com vistas a indução de resistência contra <i>Phytophthora plurivora</i>	89
3.2.2.1 Obtenção de plântulas de faia.....	89
3.2.2.2 Inoculação das plântulas de faia com o endofítico radicular <i>Piriformospora indica</i>	89
3.2.2.3 Obtenção do inóculo de <i>Phytophthora plurivora</i>	89
3.2.2.4 Avaliações.....	90
3.2.2.4.1 Mortalidade das plântulas.....	90
3.2.2.4.2 Quantificação de <i>Phytophthora plurivora</i>	90
3.2.3 Efeito direto de <i>Piriformospora indica</i> e inoculação de plântulas de citros com <i>P. indica</i> com vistas a indução de resistência contra <i>Phytophthora nicotianae</i>	90
3.2.3.1 Antagonismo.....	90

3.2.3.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	91
3.2.3.3 Obtenção das plântulas de citros.....	91
3.2.3.4 Obtenção do inóculo de <i>Phytophthora nicotianae</i>	92
3.2.3.5 Inoculação das plântulas de citros com <i>Piriformospora indica</i>	92
3.2.3.6 Avaliações.....	93
3.2.3.6.1 Quantificação de <i>Phytophthora nicotianae</i>	93
3.2.3.6.1.1 Extração e Purificação de DNA.....	93
3.2.3.6.1.2 Quantificação de <i>Phytophthora nicotianae</i>	94
3.2.3.6.2 Análises bioquímicas.....	95
3.2.3.6.2.1 Preparo do extrato proteico	95
3.2.3.6.2.2 Proteínas totais.....	95
3.2.3.6.2.3 Atividade da fenilalanina amônia-liase.....	95
3.2.3.6.2.4 Atividade da β -1,3-glucanase.....	96
3.2.3.6.2.5 Atividade da guaiacol peroxidase	97
3.2.3.6.3 Extração de RNA, síntese de cDNA e análise da expressão de genes relacionados ao processo de defesa.....	97
3.2.3.6.3.1 Extração de RNA utilizando Trizol.....	97
3.2.3.6.3.2 Síntese de cDNA.....	99
3.2.3.6.3.3 Expressão de genes relacionados ao processo de defesa.....	99
3.2.3.6.3.4 Análise dos resultados da expressão gênica por qPCR.....	100
3.3 Resultados.....	101
3.3.1 Investigações histológicas e moleculares de plantas de faia infectadas com <i>Piriformospora indica</i>	101
3.3.1.1 Confirmação da infecção de <i>Piriformospora indica</i> por microscopia de luz.....	101
3.3.1.2 Confirmação da infecção de <i>Piriformospora indica</i> por PCR em plantas de faia e plântulas de citros.....	102
3.3.1.3 Sequenciamento.....	103
3.3.1.4 Quantificação de <i>Phytophthora plurivora</i>	103
3.3.2 Inoculação de plântulas de faia com <i>Piriformospora indica</i> com vistas a indução de resistência contra <i>Phytophthora plurivora</i>	103

3.3.3 Efeito direto de <i>Piriformospora indica</i> e inoculação de plântulas de citros com <i>P. indica</i> com vistas a indução de resistência contra <i>Phytophthora nicotianae</i>	105
3.3.3.1 Antagonismo.....	105
3.3.3.2 Microscopia eletrônica de varredura.....	106
3.3.3.3 Confirmação da infecção de <i>Piriformospora indica</i> por microscopia e PCR.....	107
3.3.3.4 Sintomas de <i>Phytophthora nicotianae</i>	108
3.3.3.5 Quantificação de <i>Phytophthora nicotianae</i>	111
3.3.3.6 Análises bioquímicas.....	112
3.3.3.7 Expressão gênica.....	118
3.3.3.7.1 Análise da estabilidade dos genes endógenos.....	118
3.3.3.7.2 Análise da expressão gênica.....	119
3.4 Discussão.....	120
3.5 Conclusões.....	129
Referências.....	129
Apêndice.....	136

RESUMO

Taxtomina A e *Piriformospora indica* no controle de *Phytophthora nicotianae* em citros e *Phytophthora plurivora* em faia (*Fagus sylvatica*)

Espécies de *Phytophthora* tem se destacado ao longo da história devido ao seu potencial destrutivo, se iniciando com a devastadora *P. infestans* na Irlanda e se estende até os dias de hoje com *P. nicotianae* em citros e *P. plurivora* em faia. Uma característica importante deste grupo de patógenos é que as medidas de controle da doença se baseiam na prevenção da entrada do patógeno na área visto que, uma vez instalado, o produtor precisa conviver com o mesmo, pois não se dispõem de métodos efetivos de controle. Neste sentido, a busca por métodos de controle torna-se primordial. O endofítico radicular *Piriformospora indica*, tem-se destacado em vários patossistemas devido a sua habilidade de induzir resistência contra patógenos, aumentar a tolerância à estresses abióticos e promover o crescimento de plantas. Taxtomina A, produzida por *Streptomyces scabies*, é capaz de ativar mecanismos de defesa de plantas, os quais são efetivos contra agentes patogênicos. Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito de *P. indica* e da taxtomina A sobre *P. nicotianae* em citros e *P. plurivora* em faia. Ambos foram avaliados quanto ao seu efeito direto sobre os patógenos em questão. O indutor de defesa vegetal Bion[®] foi utilizado em alguns ensaios para fins de comparação. Plântulas de citros e faia foram tratadas com concentrações crescentes de taxtomina e parâmetros fisiológicos, bioquímicos e de controle da doença foram avaliados. Taxtomina A não apresenta efeito direto sobre os patógenos avaliados. Os dados de incidência da doença em plântulas de faia tratadas com taxtomina A nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 µg se mostraram consistentes com a quantidade de DNA do patógeno no sistema radicular, demonstrando que, aparentemente, a toxina induziu suscetibilidade nas plântulas de faia. Em citros, para os parâmetros fisiológicos e bioquímicos avaliados, em linhas gerais, a taxtomina A nas concentrações de 50 e 100 µg demonstrou potencial de aplicação no patossistema citros - *P. nicotianae*. Quando avaliada a mortalidade de plantas inoculadas com o patógeno e tratadas com taxtomina, bem como, quando quantificado o DNA do oomiceto no sistema radicular, as referidas concentrações também apresentaram os melhores desempenhos. Plântulas das mesmas espécies foram submetidas a inoculação com *P. indica*, sendo avaliados os efeitos na promoção de crescimento, na atividade de enzimas e de genes relacionados ao processo de defesa, bem como, no controle da doença. Não foi observado efeito direto do endofítico radicular sobre os patógenos avaliados. Quando plântulas de citros foram inoculadas com *P. indica* e depois com *P. nicotianae*, não foi observada promoção de crescimento e controle da doença. As análises histológicas e moleculares demonstraram a presença do endofítico no sistema radicular de plântulas de citros e faia. Análises bioquímicas revelaram apenas aumentos pontuais no teor de proteínas e na atividade da β -1,3-glucanase e da peroxidase no tratamento com *P. indica* + *P. nicotianae*. Os genes *PR-1.4*, *PR-1.8*, *PR- β -glucosidase* e *Hsp70* foram induzidos em plântulas inoculadas com *P. indica* e com o patógeno, bem como no tratamento com Bion[®] e patógeno, porém em menor magnitude. O endofítico *P. indica* ativa o sistema de defesa de plântulas de citros, no entanto, os mecanismos ativados não são efetivos para o controle da doença na interação citros – *P. nicotianae*.

Palavras-chave: Gomose; Endofítico radicular; Toxina; *Citrus sunki*; Acibenzolar-S-metílico; Suscetibilidade induzida

ABSTRACT

Thaxtomin A and *Piriformospora indica* in the control of *Phytophthora nicotianae* in citrus and *Phytophthora plurivora* in beech (*Fagus sylvatica*)

Phytophthora species has been important throughout history because of its destructive potential, starting with the devastating *P. infestans* in potatoes in Ireland and extending to the present day with *Phytophthora nicotianae* on citrus and *Phytophthora plurivora* on beech. An important feature of this group of pathogens is that the disease control measures are based upon prevention of pathogen entry into the area since, once installed, producers have to live with it, because they do not have effective methods of control. Accordingly, the search for control methods becomes essential. The root endophytic fungus *Piriformospora indica* has been shown to induce resistance against pathogens, increase tolerance to abiotic stresses and promote the growth of plants. On the other hand, the phytotoxin thaxtomin A, produced by *Streptomyces scabies*, is able to activate plant defense mechanisms, which are effective against pathogens. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of *P. indica* and thaxtomin A on the control of *P. nicotianae* on citrus and *P. plurivora* on beech. Both were assessed for their direct effect on these pathogens. The plant defense inducer Bion[®] was used in some tests for comparison. Besides that, seedlings of citrus or beech were treated with *P. indica* or increasing concentrations of thaxtomin and physiological / biochemical parameters as well as those related to induction of resistance and disease control were evaluated. The results showed that thaxtomin A did not exhibit any direct effect on the pathogens. The incidence of disease on beech seedlings treated with thaxtomin A, in concentrations of 10, 25, 50 and 100 µg, were consistent with the amount of DNA of the pathogen in the root tissue, demonstrating that, apparently, the toxin induced susceptibility in the seedlings. In citrus, for the physiological and biochemical parameters evaluated, in general, the thaxtomin in the concentrations of 50 and 100 µg showed potential for application in the citrus pathosystem - *P. nicotianae*. When the mortality of the seedlings treated with thaxtomin and inoculated with the pathogen as well as the oomycete DNA amount in the root system were evaluated these concentrations also had the best performances. As mentioned above, seedlings of beech or citrus were also inoculated with the endophyte and its effect on growth promotion, enzyme activities, the expression of genes related to defense process and on disease control was measured. There was no direct effect of the root endophyte on the pathogens. When citrus seedlings were inoculated with *P. indica* and then with *P. nicotianae*, there was no growth promotion or disease control. Histological and molecular analysis showed the presence of the endophytic fungus inside the root system of citrus and beech seedlings. Biochemical analyzes revealed only occasional increases in protein content and the activities of β-1,3-glucanase and peroxidase in the treatment with *P. indica* + *P. nicotianae* in citrus seedlings. The genes *PR-1.4*, *PR-1.8*, *PR-β-glucosidase* and *Hsp70* were induced in seedlings inoculated with *P. indica* and challenged with the pathogen as well as in the treatment with the resistance inducer Bion[®] plus pathogen, but to a lesser magnitude. Finally, the endophytic *P. indica* is able to activate defense system in citrus, however, the activated mechanisms seems not to be effective in controlling the disease in the interaction citrus - *P. nicotianae*.

Keywords: Gummosis; Root endophyte; Phytotoxin; *Citrus sunki*; Acibenzolar-S-methyl; Induced susceptibility

1 INTRODUÇÃO GERAL

As doenças de plantas têm papel importante na história, sendo responsáveis por grandes prejuízos econômicos e sociais à humanidade, como nos casos da requeima da batata (*Phytophthora infestans*) na Irlanda e nas plantações de arroz, dizimadas por *Cochliobolus miyabeanus* (*Helminthosporium oryzae*) em Bengala (BERGAMIN FILHO; AMORIM; REZENDE, 2011). Ainda hoje, apesar dos vultosos investimentos na pesquisa e no desenvolvimento de métodos de controle, as doenças comprometem o rendimento e qualidade de muitos produtos vegetais, sendo escassos dados com relação a perdas causadas por doenças em plantas, em larga escala. Contudo, Orke (2006) aborda em sua revisão dados de perdas potenciais causadas por patógenos (bactérias, fungos e vírus), plantas daninhas e insetos às culturas do trigo, arroz, milho, batata, soja e algodão, bem como o impacto de medidas de controle na redução destes danos, avaliando assim, as perdas reais. Os dados se referem a 19 regiões produtoras no mundo. Estima-se que, a perda atual média, causada por fungos e bactérias, seja de 10,01% quando analisadas apenas as perdas em pré-colheita. Considerando produções mundiais da ordem de bilhões de toneladas, os montantes são bastante expressivos em termos econômicos e sociais.

A cultura dos citros é afetada por inúmeras doenças que comprometem a produção e a longevidade do pomar, resultando em sérios prejuízos para o produtor e o mercado nacional e mundial. Entre essas, pode-se destacar a Gomose ocasionada, dentre outras espécies, por *Phytophthora nicotianae*, um patógeno radicular que uma vez instalado na lavoura torna praticamente impossível sua erradicação, sendo a exclusão considerada o principal método de controle (FEICHTENBERGER et al., 2005). Outro patógeno radicular de destaque é *Phytophthora plurivora*, um danoso oomiceto em florestas de faia (*Fagus sylvatica* L.) em toda a Europa. Faia é a principal espécie em florestas decíduas da Europa Central, sendo a espécie arbórea mais competitiva em solos com moderada umidade e acidez (BOHN et al., 2004).

A indução de resistência, resultado da ativação de mecanismos de defesa da planta através de agentes bióticos ou abióticos, tem se mostrado como uma ferramenta importante no manejo de doenças. Na área científica, relatos são encontrados sobre sua eficiência na redução da incidência e/ou severidade de

doenças em plantas (BONALDO, 2005; CAVALCANTI et al., 2006; KUHN, 2007; WALTERS; RATSEP; HAVIS, 2015; WALLER et al., 2005; SUN et al., 2014), assim como na área comercial, a qual tem investido em produtos como os fosfitos de potássio e outros minerais, produtos à base de algas, à base de hormônios, dentre outros, para o controle de doenças em diferentes patossistemas. Além disso, estão disponíveis apenas estudos fragmentados das interações patógeno-hospedeiro em plantas lenhosas, visto que, a maior parte dos trabalhos é conduzida com espécies herbáceas e anuais. A grande maioria dos estudos envolve patógenos foliares, enquanto que pesquisas com patógenos radiculares são pouco expressivas (SCHLINK, 2010). Diante do exposto, justifica-se o presente trabalho.

Em função da disponibilidade restrita de genótipos resistentes, a baixa eficiência do controle químico e os agravantes que o uso indiscriminado dos produtos químicos tem ocasionado, pesquisadores vem testando métodos alternativos de controle, como o uso de indutores de resistência bióticos ou abióticos e/ou agentes de biocontrole. Dentre estes, estão o endofítico radicular *Piriformospora indica* e a taxtamina A, produzida por *Streptomyces scabies*, os quais se apresentam como agentes potenciais no controle de doenças nos referidos patossistemas. Portanto, objetivou-se verificar o potencial de *P. indica* e taxtamina A como agentes indutores de resistência e/ou de controle biológico nos patossistemas citros - *Phytophthora nicotianae* e faia - *P. plurivora*, bem como avaliar o modo de ação desses agentes de controle nestas duas interações planta - patógeno. Através do estudo de parâmetros fisiológicos, bioquímicos e moleculares buscou-se entender as interações planta - patógeno - agentes potenciais de biocontrole e/ou indução de resistência, a fim de contribuir no desenvolvimento de novos métodos para o controle dessas doenças.

Referências

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M. Importância das doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. cap. 2, p. 19-36.

BOHN, U.; GOLLUB, G.; HETTWER, C.; WEBER, H.; NEUHÄUSLOVÁ, Z.; RAUS, T.; SCHLÜTER, H. **Karte der natürlichen Vegetation Europas/Map of the natural vegetation of Europe**. Bonn: Bundesamt für Naturschutz (BfN)/Federal Agency for Nature Conservation, 2004. 1 CD-ROM.

BONALDO, S.M. **Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na síntese de fitoalexinas em sorgo, na germinação e formação de apressórios por fungos fitopatogênicos e na proteção de pepino a *Colletotrichum lagenarium* e sorgo a *Colletotrichum sublineolum*.** 2005. 150 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

CAVALCANTI, F.R.; RESENDE, M.L.V.; ZACARONI, A.B.; RIBEIRO JÚNIOR, P.M.; COSTA, J.C.B. SOUZA, R.M. Acibenzolar-S-metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 372-380, 2006.

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

KUHN, O.J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção.** 2007. 140 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

OERKE, E.C. Crop losses to pests. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 144, p. 31-43, 2006.

SCHLINK, K. Down-regulation of defense genes and resource allocation into infected roots as factors for compatibility between *Fagus sylvatica* and *Phytophthora citricola*. **Functional & Integrative Genomics**, Berlin, v. 10, p. 253-264, 2010.

SUN, C.; SHAO, Y.; VAHABI, K.; LU, J.; BHATTACHARYA, S.; DONG, S.; YEH, K-W.; SHERAMETI, I.; LOU, B.; BALDWIN, I.T.; OELMÜLLER, R. The beneficial fungus *Piriformospora indica* protects *Arabidopsis* from *Verticillium dahlia* infection by downregulation plant defense responses. **BMC Plant Biology**, London, v. 14, n. 268, p. 1-16, 2014.

WALLER, F.; ACHATZ, B.; BALTRUSCHAT, H.; FODOR, J.; BECKER, K.; FISCHER, M.; HEIER, T.; HÜCKELHOVEN, R.; NEUMANN, C.; VON WETTSTEIN, D.; FRANKEN, P.; KOGEL, K.H. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 102, p. 13386-13391, 2005.

WALTERS, D.R.; RATSEP, J.; HAVIS, N.D. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 64, n. 5, p. 1263-1280, 2015.

2 TAXTOMINA A NO CONTROLE DE *Phytophthora* spp. EM PLÂNTULAS DE FAIA (*Fagus sylvatica*) E CITROS (*Citrus sunki*)

Resumo

Ao longo de décadas a citricultura brasileira tem se destacado no cenário mundial pela participação expressiva, em especial, do suco de laranja. Neste período, a mesma vem enfrentando dificuldades de diferentes ordens, estando entre as mesmas, os problemas fitossanitários, como a gomose, causada por *Phytophthora nicotianae*, principalmente. Faia constitui-se na principal espécie em florestas decíduas da Europa Central sendo também acometida por problemas radiculares causados, principalmente, por *Phytophthora plurivora*. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar se a taxtomina A, produzida por *Streptomyces scabies*, é capaz de induzir resistência contra os patógenos radiculares *P. plurivora* em faia e *P. nicotianae* em citros. Foram conduzidos ensaios a fim de se avaliar o efeito da taxtomina A nas concentrações de 2,5, 10, 25, 50 e 100 µg sobre o micélio e zoósporos de *P. nicotianae* e *P. plurivora*. Posteriormente, plântulas de citros e plântulas de faia foram tratadas com 10, 25, 50 e 100 µg de taxtomina e inoculadas com *P. nicotianae* ou *P. plurivora*, respectivamente, após 3 dias, sendo avaliados parâmetros fisiológicos, bioquímicos e moleculares das interações. O indutor de defesa vegetal Bion[®] foi utilizado em alguns ensaios para fins de comparação. Os resultados evidenciaram que as concentrações de taxtomina de 2,5, 10, 25, 50 e 100 µg não afetaram o crescimento micelial e a motilidade dos zoósporos de nenhum dos patógenos avaliados. Para plântulas de faia, nas concentrações de 10 e 25 µg de taxtomina, foi observado um incremento na incidência da doença e na concentração de DNA do patógeno no sistema radicular. Para 50 e 100 µg, a incidência da doença e quantidade de DNA do patógeno foi levemente superior. Por sua vez, para plântulas de citros, os dados de consumo de água e incidência da doença exibiram uma tendência de resistência induzida em plântulas de citros na concentração de 100 µg de taxtomina. No entanto, analisando os dados de qPCR pode-se observar que o tratamento com 50 µg de taxtomina reduziu a quantidade de DNA em raízes de citros, porém sem diferir da concentração de 100 µg. O teor de proteínas em plantas tratadas com taxtomina A foi incrementado apenas na ausência do patógeno, não sendo o mesmo observado para a atividade da enzima β-1,3-glucanase. A atividade da β-1,3-glucanase em raízes apresentou tendência de incremento com o aumento das concentrações de taxtomina nos tratamentos inoculados com o patógeno, no entanto, sem diferir estatisticamente dos demais tratamentos. O tratamento com o indutor comercial Bion[®] incrementou a atividade da β-1,3-glucanase e o teor de proteínas em plântulas de citros. Pode-se observar indícios de indução de resistência sistêmica quando do tratamento de plântulas de tangerina 'Sunki' com 50 e 100 µg de taxtomina. Finalmente, a taxtomina A não protege plântulas de faia da podridão radicular causada por *P. plurivora*, porém apresenta potencial na proteção de plântulas de citros contra *P. nicotianae*.

Palavras-chave: *Streptomyces scabies*; Gomose; Doenças; Citricultura; Resistência induzida

Abstract

The Brazilian citrus industry has very important role around the world, especially by selling orange juice. For years the citrus producers have been facing different problems, and among of them the occurrence of diseases, such as gummosis caused by *Phytophthora nicotianae*. On its turn, beech is the main plant species in deciduous forests of Central Europe and is affected by root problems caused mainly by *Phytophthora plurivora*. Thus, the objective of the present work was to investigate whether the phytotoxin thaxtomin A, produced by *Streptomyces scabies*, is able to induce resistance against the root pathogen *P. plurivora* in beech, and *P. nicotianae* in citrus. Assays were carried out to evaluate the direct effect of 2.5, 10, 25, 50 and 100 μg of thaxtomin on mycelium and zoospores of *P. nicotianae* and *P. plurivora*. Subsequently, citrus and beech seedlings were also treated with 10, 25, 50 and 100 μg of thaxtomin and inoculated with *P. nicotianae* or *P. plurivora*, respectively. Three days after pathogen inoculation, physiological, biochemical and molecular parameters were evaluated. The plant defense inducer Bion[®] was used in some tests for comparison. The concentrations of 2.5, 10, 25, 50 and 100 μg of thaxtomin did not have effects on mycelial growth and zoospore motility of both pathogens. In beech plants, treated with 10 and 25 μg of thaxtomin it was observed an increase in the incidence of disease and in the DNA amount in roots, detected by qPCR. For 50 and 100 μg of thaxtomin, the incidence and the amount of DNA were slightly higher. For citrus seedlings, the data on water uptake and disease incidence suggested the occurrence of induced resistance in the plants treated with 100 μg of thaxtomin. However, based upon the data of qPCR it can be seen that the treatment with 50 μg of thaxtomin reduced the amount of DNA in citrus roots, without differing from the 100 μg concentration. The protein content in seedlings treated with thaxtomin increased only in the absence of the pathogen, different from the activity of β -1,3-glucanase. The β -1,3-glucanase activity in the roots showed an increase with increasing concentrations of thaxtomin in treatments inoculated with the pathogen, however, without statistical differences. Treatment with the commercial resistance inducer Bion[®] increased the activity of β -1,3-glucanase and the protein content in citrus seedlings. It could be observed induction of resistance when tangerine 'Sunki' seedlings were treated with 50 and 100 μg of thaxtomin. Finally, it can be concluded that thaxtomin A does not protect beech seedlings from root rot caused by *P. plurivora* but has potential to protect citrus from *P. nicotianae*.

Keywords: *Streptomyces scabies*; Gummosis; Diseases; Citrus; Induced resistance

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Citricultura Brasileira

Trazidas do continente asiático pelas primeiras expedições colonizadoras, as plantas cítricas foram introduzidas no Brasil, possivelmente na Bahia. Encontrando em nosso país melhores condições para se desenvolver do que nas regiões de origem, a citricultura brasileira se expandiu e detém hoje grande espaço no cenário mundial contribuindo com a balança comercial nacional e, como importante geradora

direta e indireta de empregos, gerando crescimento social e econômico para o país (ALVES; MELO, 2010).

Segundo relatório do USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos), o país perdeu o posto de maior produtor mundial de citros, sendo este ocupado hoje pela China, quando somadas todas as frutas cítricas. No entanto, na produção de laranja fresca e suco de laranja, o Brasil ainda ocupa a primeira posição no mercado mundial (USDA, 2016). De cada cinco copos de suco de laranja consumidos no mundo, aproximadamente, três são produzidos no país.

Como vem sendo observado para outras “commodities”, condições climáticas desfavoráveis, binômio custo de produção elevado e preço final baixo e problemas fitossanitários, também tem sido entraves enfrentados na citricultura. Em edição da Hortifruti Brasil foi realizado um balanço da citricultura brasileira nos últimos anos, bem como projeções para a próxima safra (CEPEA, 2015). Nos últimos três anos, o cenário com estoques em alta, preços abaixo do preço mínimo, baixa rentabilidade, redução nos tratos culturais, saída de produtores da atividade, redução da área ou mesmo custeio da atividade citrícola com a renda de outras culturas e acúmulo de dívidas tem preocupado o setor, em especial, no caso de produtores independentes. Segundo dados da Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo (CDA), o balanço da crise citrícola revela que 5,25 mil propriedades deixaram de produzir citros em três anos, ou seja, uma em cada três propriedades citrícolas. A redução no número de árvores chegou a 55,5 milhões de plantas, se feita a retrospectiva de 2011 até final de 2014, atingindo, praticamente, o número de árvores em produção na Flórida em 2014.

Segundo o relatório do CEPEA, para a safra 2015/2016, o cenário atenta para possibilidades de melhores resultados que nos anos anteriores, pelos primeiros contratos firmados por duas das três grandes indústrias. No entanto, os custos de produção também estão em alta. Apesar de o panorama para a laranja destinada à indústria paulista acenar para preços mais elevados (em moeda nacional), a retomada da rentabilidade dos produtores irá depender do grau de endividamento e da produtividade na safra 2015/16, sendo assim, algo incerto. A expectativa de redução de safra na Flórida também pode favorecer a citricultura brasileira, assim como, se as projeções se confirmarem, os estoques nacionais de suco de laranja fecharão abaixo do nível estratégico de 300 mil toneladas, o que pode dar sustentação aos preços. A primeira estimativa para a safra 2015/2016 do

Fundecitrus (2015), aponta para uma produção de 278.993 milhões de caixas. O parque citrícola é composto por 197.859 milhões de árvores, sendo 174.125 milhões de árvores produtivas com produtividade média estimada de 1,6 caixas de 40,8 kg planta⁻¹.

Por outro lado, a redução no consumo de suco de laranja pelos principais compradores do produto brasileiro (Estados Unidos e União Européia), a queda do preço em dólar, custo de produção em alta, dentre outros fatores, pesam contra o cenário positivo para 2015/2016 (CEPEA, 2015). Ainda assim, mesmo com a recuperação dos preços, os custos de produção em alta e a incidência de doenças e pragas, exigem do produtor um trabalho árduo para que, ao final de uma safra, a atividade seja animadora em longo prazo.

2.1.2 *Phytophthora* em citros no Brasil

Um dos principais problemas da cultura dos citros é a gomose, sendo os oomicetos *Phytophthora nicotianae* e *Phytophthora citrophthora* os principais agentes causais da doença, onde *P. nicotianae* Breda de Haan é a espécie predominante nas principais regiões produtoras (FEICHTENBERGER et al., 2005). A doença apresenta várias manifestações, sendo as mais comuns a podridão do pé e a podridão de raízes e radículas. O sintoma característico da doença é a exsudação de goma em lesões de tronco e colo da planta. A gomose compromete o desenvolvimento da planta podendo levá-la a morte (FEICHTENBERGER et al., 2005).

No Brasil, devido a predominância na utilização do limão 'Cravo' (menos tolerante à infecção por *Phytophthora* spp.), em substituição a laranja 'Azeda' (intolerante ao vírus da Tristeza, mas resistente a *Phytophthora* spp.), tem se observado um aumento considerável na incidência da gomose e na severidade dos danos causados por esse patógeno (MEDINA FILHO et al., 2003).

Uma característica do gênero *Phytophthora*, que torna o manejo particularmente difícil, é a produção de estruturas de resistência, fazendo com que a supressão desses patógenos dos solos seja uma tarefa praticamente impossível. Sendo assim, a exclusão constitui-se no principal método de controle de doenças provocadas por espécies desse gênero (FEICHTENBERGER et al., 2005). Além desse método, o controle tem como medidas preventivas: o uso de porta-enxertos resistentes, escolha do local para plantio, evitando solos com problemas de excesso

de umidade, utilização de mudas saudáveis e evitar ferimentos no tronco e raízes principais. Como medidas curativas, pode-se realizar a remoção das plantas severamente atacadas e controle químico com produtos sistêmicos (FUNDECITRUS, 2008). Dos fungicidas disponíveis atualmente, apenas os grupos químicos dos cúpricos e fosfonatos são registrados para o controle de *Phytophthora* spp. em citros (AGROFIT, 2015). Dessa forma, a busca por métodos alternativos de controle é de extrema necessidade.

2.1.3 *Phytophthora* em faia (*Fagus sylvatica*) na Alemanha

Faia europeia é uma espécie dominante ou co-dominante na maioria das florestas na Europa temperada, possuindo importante valor econômico para a produção de madeira e é frequentemente utilizada como árvore ornamental em parques (SCHLINK, 2010).

Phytophthora plurivora, juntamente com *Phytophthora cambivora*, são possivelmente hoje as espécies de *Phytophthora* de maior ameaça e, um dos mais importantes patógenos de florestas e ecossistemas seminaturais da Europa (JUNG; BURGESS, 2009). Estudos indicam que a principal razão para o declínio geral das florestas de faia em toda a Europa são as interações sinérgicas entre danos ao sistema radicular ocasionados por espécies de *Phytophthora*, habitantes do solo, e condições climáticas extremas (JUNG, 2009).

Outro agravante desta doença refere-se ao fato de que o “Problema *Phytophthora*”, na maioria dos casos, começa nos viveiros. Estudos conduzidos por Jung e Blaschke (2004), Ivors et al. (2006) e Dart e Chastanger (2007) confirmaram que várias espécies de *Phytophthora* já estavam presentes em plantas mantidas em condições de viveiro, as quais eram, posteriormente, levadas a campo. Portanto, conceitos de gerenciamento para a produção de mudas não infestadas em viveiro, além de regulamentos e procedimentos para prevenir a introdução de espécies quarentenárias de *Phytophthora* potencialmente invasoras, são urgentemente necessários em escala europeia (BRASIER, 2008). Além disso, seria um grande avanço, a indução de resistência em plantas e/ou controle biológico de espécies de *Phytophthora* em condições de viveiros, através do uso de endofíticos, como *Piriformospora indica* e/ou a fitotoxina taxtomina A.

2.1.4 Indução de Resistência no Controle de Fitopatógenos

O processo de desenvolvimento da doença constitui-se em uma verdadeira batalha a nível estrutural, fisiológico e bioquímico, estando de um lado o patógeno com seu arsenal enzimático, fitotoxinas e hormônios e, do outro, a planta com seus mecanismos de resistência. A própria interação do patógeno com a planta ou de outros microrganismos como fungos e bactérias, metabólitos presentes em plantas e microrganismos e produtos comerciais de base mineral, hormonal ou biológica são capazes de atuar nesses mecanismos de resistência, resultando na sua ativação (MAZARO et al., 2008; REZENDE, 2014; ROMA, 2013; GARCIA; PASCHOLATI; ALMEIDA, 2007; WALLER et al., 2006; SUN et al., 2014).

A sequência de eventos que desencadeia a resistência em plantas pelos agentes bióticos ou abióticos acima mencionados envolve, de maneira geral, processos semelhantes aos observados durante a interação com agentes patogênicos. O passo inicial é o reconhecimento do agente indutor de resistência ou eliciação, a sinalização através de hormônios, a ativação de genes e a produção de respostas bioquímicas e estruturais que podem resultar em resistência por parte da planta (HEIL; BOSTOCK, 2002).

A resistência é resultante da presença ou ativação de mecanismos de defesa os quais podem ser divididos em estruturais e bioquímicos e estes, por sua vez, em pré e pós-formados. Os estruturais pré-formados, são os que pertencem a própria constituição da planta, estando neste grupo, por exemplo, a cutícula, tricomas, estômatos e fibras/vasos condutores. Dentre os bioquímicos pré-existentes na planta estão os fenóis, alcalóides, lactonas insaturadas, glicosídeos cianogênicos e sulfurados, fototoxinas e proteínas/peptídeos. Dentre os mecanismos pós-formados ou induzíveis, os estruturais compreendem, por exemplo, papilas, halos, lignificação, camadas de cortiça, tiloses e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina. Por sua vez, os bioquímicos induzíveis abrangem as espécies reativas de oxigênio, fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas). Dentre estes mecanismos, cada interação planta-patógeno apresenta maior ou menor envolvimento de algumas destas respostas de defesa, além destas variarem com a idade e a condição de desenvolvimento da planta (PASCHOLATI, 2011).

Essa ativação de resistência pode ser, principalmente, de dois tipos: “Resistência Sistêmica Adquirida” (SAR) ou “Resistência Sistêmica Induzida” (ISR), as quais se diferenciam, basicamente, pela natureza do agente eliciador, sítio de

atuação (sinalização) e as respostas bioquímicas desencadeadas, apresentando, contudo, respostas fenotípicas semelhantes (PASCHOLATI et al., 2010; VALLAD; GOODMAN, 2004). A SAR é induzida por eliciadores abióticos (acibenzolar-S-metílico, ácido 2,6 dicloro-isonicotínico) ou bióticos (patógenos virulentos, avirulentos e não-patógenos) envolvendo a via do ácido salicílico, levando ao acúmulo de PR-proteínas (STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997). Por outro lado, a ISR é desencadeada por agentes bióticos, especificamente, rizobactérias promotoras de crescimento (PGPRs, como espécies de *Pseudomonas*) (VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998), sendo dependente da via do ácido jasmônico e etileno, não estando associada ao acúmulo de PR-proteínas e ácido salicílico (PIETERSE et al., 1996; PIETERSE et al., 1998). No entanto, hoje sabe-se que estas vias se comunicam, ou seja, há um “cross-talk”, envolvendo o gene *NPR-1* (PIETERSE et al., 1998). Por exemplo, algumas PGPRs podem induzir resistência através da via do ácido salicílico (VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998), com consequente produção de PR-proteínas (MAURHOFER et al., 1994).

Um aspecto importante relacionado a indução de resistência é que a mesma apresenta amplo espectro e pode ser de longa duração, mas raramente é completa, apresentando níveis de controle que variam de 20 a 85% (WALTERS; RATSEP; HAVIS, 2015), portanto, devendo ser utilizada dentro do “Manejo Integrado de Doenças” como uma ferramenta adicional. Como a indução de resistência envolve uma resposta da planta, ela é fortemente influenciada pelas condições as quais a planta está exposta, como condições de cultivo, genótipo e tipo de solo (WALTERS; RATSEP; HAVIS, 2015).

2.1.5 Controle Biológico de Fitopatógenos

Além de microrganismos, tais como fungos e bactérias, atuarem como ativadores de mecanismos de resistência da planta, os mesmos podem atuar diretamente sobre o patógeno, ou seja, como agentes de controle biológico. O controle biológico de doenças de plantas pode ser definido como a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por ou através de um ou mais organismos que não o homem (COOK; BAKER, 1983), ou de forma mais simples, o controle de um microrganismo através de outro microrganismo.

O controle biológico pode ocorrer através de antibiose, competição, parasitismo, predação e hipovirulência (BETTIOL, 1991; BEDENDO; MASSOLA; AMORIM, 2011). A antibiose refere-se à inibição ou impedimento do desenvolvimento de indivíduos através de metabólitos secretados por outros microrganismos, sendo estes, usualmente, antibióticos. Como exemplos, temos a gliotoxina e a gliovirina produzidas por *Trichoderma virens* e a agrocina produzida por *Agrobacterium radiobacter*. Segundo Bedendo, Massola e Amorim (2011), a competição possibilita o estabelecimento do microrganismo de controle biológico de maneira mais eficiente e rápida no local da infecção, quando comparado ao agente patogênico. Já no parasitismo, o parasita obtém parte ou todo o seu alimento a partir do microrganismo causador da doença. Por fim, a hipovirulência consiste na introdução de uma linhagem do patógeno menos agressiva ou avirulenta, que pode transmitir estas características para o fitopatógeno virulento. Agentes de controle biológico também podem atuar na promoção de crescimento das plantas (COMPANT et al., 2005) ou interferindo com fatores de patogenicidade do patógeno e induzindo resistência sistêmica (HAAS; DÉFAGO, 2005) resultando assim, em aumento na resistência a doenças, não sendo, nestes casos, formas de controle biológico clássico.

O controle biológico, assim como a indução de resistência, tem sido amplamente pesquisados no controle de fungos (KUPPER; GIMENES-FERNANDES; GOES, 2003; HAAS; DÉFAGO, 2005), bactérias (KERR; HTAY, 1974; YULIAR; NION; TOYOTA, 2015) e nematoides (SAYRE et al., 1991; TIAN; YANG; ZHANG, 2007) ao longo de décadas. No entanto, no banco de dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil o número de produtos registrados é restrito: apenas seis produtos registrados como fungicidas microbiológicos versus 439 registros de fungicidas químicos (AGROFIT, 2015). Esse número pouco expressivo é resultado, em parte, dos efeitos oriundos da aplicação de agentes biológicos a campo não serem positivos como os observados em condições de laboratório (BEDENDO; MASSOLA; AMORIM, 2011). Além disso, em geral, esses microrganismos necessitam de um período de tempo para o seu estabelecimento sob condições de campo e expressão do potencial no controle de determinada doença.

2.1.6 Mecanismos de Ataque de Fitopatógenos

Microrganismos causadores de doenças em plantas precisam utilizar artifícios que os auxiliam no estabelecimento nos tecidos do hospedeiro, na obtenção de nutrientes e no desenvolvimento de sintomas, estando entre os mesmos, enzimas, hormônios e toxinas. Para isso, lançam mão de um arsenal, contando com a presença, por exemplo, de enzimas envolvidas na degradação da cutícula (cutinases), suberina (suberinases), parede celular (pectinases, hemicelulases, celulasas, ligninases e proteases) e membrana plasmática (proteases, fosfolipases, lipases, amilases) (PASCHOLATI, 2011). Microrganismos fitopatogênicos também podem sintetizar hormônios, induzindo a um desequilíbrio hormonal no hospedeiro, ocasionando alterações no crescimento e/ou “aceleração” da senescência em órgãos de plantas (PASCHOLATI, 2011). As toxinas são produzidas por agentes patogênicos, causando danos aos tecidos vegetais e são reconhecidamente envolvidas no desenvolvimento da doença (SCHEFFER, 1983). As mesmas podem atuar alterando a permeabilidade e/ou o potencial de membranas, levando, por exemplo, a mudanças no equilíbrio iônico, perda de eletrólitos, inibição ou estimulação de enzimas específicas, aumentos na respiração e na biossíntese de etileno. Outra forma de atuação das fitotoxinas é através de antimetabólitos, induzindo deficiências nutricionais nas plantas (PASCHOLATI, 2011). Além das enzimas, hormônios e fitotoxinas, patógenos podem fazer uso de outros fatores envolvidos na patogenicidade e na supressão da ativação dos mecanismos de defesa da planta (MEDEIROS; FERREIRA; DIANESE, 2003).

2.1.6.1 Fitotoxinas

2.1.6.1.1 Fitotoxinas no controle de fitopatógenos

Como comentado acima, as fitotoxinas são importantes metabólitos produzidos por fungos e bactérias, as quais auxiliam esses patógenos na colonização do hospedeiro (AGRIOS, 2005). Por outro lado, diferentes toxinas são descritas na literatura devido a seus feitos no controle de doenças. Aver'yanov, Lapikova e Lebrun (2007) observaram que o ácido tenuazônico (TA), uma toxina produzida por *Magnaporthe grisea*, quando aplicado em folhas de arroz induziu necrose local, de maneira similar a produzida por esporos de *M. grisea* em cultivares resistentes. Contudo, a aplicação exógena do TA, antes ou no momento da infecção, protegeu plantas de arroz do patógeno, mostrando que o referido ácido pode atuar

como um eliciador, induzindo resistência local. Portanto, o ácido tenuazônico potencializa a resposta de uma planta suscetível à infecção, tornando-a similar a uma planta resistente. Os autores sugerem que, pelo menos em parte, o efeito indutor de resistência promovido pelo TA é devido a geração de espécies reativas de oxigênio, que inibem o desenvolvimento do fungo direta ou indiretamente. O ácido α -picolinico, outra toxina produzida por *M. grisea*, também é relatado induzindo resistência (ZHANG et al., 2004).

O efeito das toxinas não fica restrito ao controle de doenças podendo, esta classe de compostos, também apresentar efeito sobre insetos. Uma toxina produzida por *Alternaria* induziu resistência contra o pulgão *Macrosiphum rosivorum*, através de mudanças relacionadas a voláteis em plantas de *Rosa chinensis* (YANG; LI; YANG, 2012).

Gupta et al. (2013) conduziram um estudo com o objetivo de elucidar se a toxina produzida por *Alternaria alternata* induz a atividade de enzimas de defesa e o acúmulo de fenóis e se está correlacionada com a via do óxido nítrico (NO). Os autores observaram que o tratamento *in vitro* de calos de *Rauvolfia serpentina* com uma toxina produzida por *A. alternata* induziu uma rápida produção de NO em 50 mg L⁻¹ da toxina. Paralelamente, a mesma concentração de toxina também induziu a atividade das enzimas peroxidase, polifenol oxidase, fenilalanina amônia-liase e β -1,3-glucanase e o acúmulo de compostos fenólicos no tecido de calo de *R. serpentina*.

Dessa forma, está claro o papel que diferentes toxinas têm em diferentes patossistemas, induzindo a atividade de enzimas relacionadas ao sistema de defesa da planta e incrementando os níveis de controle de doenças.

2.1.6.1.2 Taxtamina A produzida por *Streptomyces scabies*

A produção de fitotoxinas como mecanismos de patogenicidade de *Streptomyces*, já vinha sendo considerada no início do século passado (FELLOWS, 1926). Contudo, apenas mais tarde essa hipótese se confirmou com o isolamento e caracterização de uma fitotoxina responsável pela necrose de tecidos de tubérculos de batata (KING et al., 1989). A fitotoxina teve a sua estrutura definida e caracterizada como sendo uma molécula de 4-nitroindol-3-il contendo 2,5-dioxopiperazina, um dipeptídeo derivado da fenilalanina e um aminoácido triptofano com radical nitrato (KING et al., 1989). Em homenagem ao pesquisador Roland

Thaxter, o primeiro a estabelecer a relação entre *Streptomyces scabies* e a sarna da batata, essa fitotoxina passou a ser chamada de “Taxtomina” (KING; LAWRENCE, 1996).

Membros do gênero *Streptomyces* são actinobactérias gram-positivas com alta proporção de guanina e citosina no DNA. Mais de uma dezena de espécies são relatadas produzindo sintomas do tipo sarna em tecidos vegetais subterrâneos, sendo as mais estudadas *S. scabies*, *S. acidiscabies* e *S. turgidiscabies*. Todas as espécies de *Streptomyces* que causam sintomas típicos de sarna produzem a fitotoxina taxtomina A ou outra fitotoxina que faz parte da família das taxtominas (LORIA; KERS; JOSHI, 2006). A taxtomina A pode ser considerada uma toxina de amplo espectro, capaz de interferir no crescimento de plantas de diferentes famílias botânicas (LEINER et al., 1996).

Streptomyces scabies, principal agente causal da sarna comum da batata, produz dois tipos de fitotoxinas, denominadas concanamicinas e taxtomina (NATSUNAME et al., 2005). Estes autores também isolaram uma nova toxina, a FD-891, em lesões de sarna ferruginosa em tubérculos de batata, produzida por *Streptomyces* spp. e *S. chelloniomii*. Esta toxina induz necrose em discos de tubérculos de batata em concentrações de 50 µg disco⁻¹, o que é equivalente a 1/100 da concentração ativa de taxtomina A. Loria et al. (2008) mencionam que a taxtomina é vital para a patogenicidade do gênero *Streptomyces* mas não é suficiente para expressão completa da virulência, sendo outros fatores de virulência como o Nec1, um supressor de defesas da planta, necessários.

Estudos conduzidos por Garcia e colaboradores tiveram como objetivo elucidar o modo de ação da toxina taxtomina A em plantas de sorgo e a importância das concanamicinas na agressividade de *S. scabies* em batata (GARCIA, 2008; GARCIA et al., 2007a, 2007b; GARCIA; PASCHOLATI; ALMEIDA, 2007; GARCIA; PASCHOLATI, 2008). Durante esses estudos, os autores encontraram na literatura que algumas fitotoxinas, como o ácido oxálico produzido por *Sclerotinia sclerotiorum* (DOUBRAVA; DEAN; KUC, 1988; TOAL; JONES, 1999) e a coronatina de *Pseudomonas syringae* (FLIEGMANN et al., 2003) podiam ativar os mecanismos de defesa e induzir resistência em plantas. Nesse sentido, estudos posteriores foram conduzidos buscando verificar se a taxtomina A era apta a atuar como um indutor de resistência em plantas. Os resultados mostraram que a toxina era capaz de induzir resistência local e sistêmica em sorgo contra *Colletotrichum sublineolum* (GARCIA et

al., 2008) e em pepineiro contra *Colletotrichum lagenarium* (GARCIA; BIAZOTTO; PASCHOLATI, 2008), bem como em fumo contra o Vírus do Mosaico (TMV). Além disso, a atividade das enzimas peroxidase, quitinase e β -1,3-glucanase foi superior em plantas de sorgo após o tratamento com a taxtomina (GARCIA et al., 2008). A toxina também induziu o acúmulo de fitoalexinas em sorgo (GARCIA, 2008). Visto que essa foi a primeira vez que se demonstrou que a taxtomina A podia agir como um indutor de resistência, com base nos resultados descritos, um pedido de patente foi solicitado através do Governo Brasileiro (USP, 2010).

2.1.7 Objetivos

O objetivo geral foi avaliar o potencial da fitotoxina Taxtomina A, produzida por *Streptomyces scabies*, no controle de podridões radiculares ocasionadas por *Phytophthora nicotianae* em citros e *P. plurivora* em faia.

Os objetivos específicos envolveram a avaliação do efeito da taxtomina A na fisiologia das plantas cítricas e de faia. Posteriormente, buscou-se avaliar mecanismos bioquímicos e fisiológicos alterados em plantas através do tratamento com a referida toxina e seu efeito no controle ou aumento na suscetibilidade a podridões causadas por *Phytophthora* spp. nos referidos patossistemas.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Efeito da taxtomina A produzida por *Streptomyces scabies* sobre *Phytophthora plurivora*

Os testes envolvendo taxtomina A foram conduzidos, na maior parte, durante o doutorado sanduíche na Universidade Técnica de Munique (TUM), sob supervisão do Prof. Dr. Wolfgang Osswald e Dr. Frank Fleischmann, com recursos financeiros do Projeto PROBRAL (CAPES/DAAD).

2.2.1.1 Produção e extração da taxtomina A

Para a produção e extração da taxtomina A, foi adotado o método proposto por Loria et al. (2001). O isolado 18 de *Streptomyces scabies* (isolado do cultivar de batata Ágata e originário da Holanda), proveniente da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico de São Paulo (IBSBF), Campinas – SP, foi semeado na superfície de meio de cultivo aveia-ágar, sendo as placas mantidas por 20 dias à 28 °C, no escuro.

Para a caracterização da produção da fitotoxina, este foi cultivado em meio de cultivo de extrato de aveia líquido (40 g de aveia em 1 L de água, batidos em liquidificador) contido em Erlenmeyers de 250 mL. Cada Erlenmeyer recebeu 100 mL de meio de aveia líquido e três discos de micélio, obtidos com furador de rolha, de regiões uniformes e intensamente esporuladas de colônias em meio de cultivo aveia-ágar. O material foi mantido sob agitação orbital (150 rpm) em temperatura ambiente por quatro dias, sob luz ambiente, quando o conteúdo de cada frasco foi coado com auxílio de gaze. Posteriormente, em funil de separação, procedeu-se a extração da toxina na proporção de 25 mL de acetato de etila para 15 mL do filtrado, sendo em seguida coletada a fração referente ao acetato de etila, de cor amarela. A fase de acetato de etila, contendo a taxtomina A, foi desidratada com sulfato de sódio anidro, e o solvente evaporado em capela. O pó resultante foi suspenso em metanol P.A., sendo realizada a purificação de acordo com item 2.2.1.2 e posterior armazenamento em refrigerador. Para utilização nos experimentos, o volume necessário foi retirado e submetido à evaporação do metanol em capela. Em seguida, o mesmo volume de água destilada esterilizada foi adicionado para preparação da concentração desejada da toxina.

2.2.1.2 Identificação e purificação da fitotoxina taxtomina A

A taxtomina A foi identificada por cromatografia de camada delgada (TLC: “Thin Layer Chromatography”), conforme a técnica usada por Goyer; Vachon; Beaulieu (1998). Para tanto, os extratos foram aplicados em placas de TLC, contendo sílica gel 60 em espessura de 250 µm. O solvente utilizado foi clorofórmio/metanol na proporção de 9:1 (v/v). A taxtomina A foi identificada com base no coeficiente relativo de retenção (Rf: “Retention Factor”) do material obtido à partir da extração, o qual contém outros compostos produzidos por *S. scabies*. Para o cálculo do Rf foi utilizada a seguinte fórmula:

$$R_f = D_t/D_s$$

Em que:

D_t = distância percorrida pela banda de taxtomina

D_s = distância percorrida pelo solvente

Para purificação da toxina, foi realizada a raspagem da banda referente à taxtomina. Em tubo para microcentrífuga, para cada 0,6 g do pó obtido na raspagem foi adicionado 1 mL de metanol P.A.. Posteriormente, o tubo foi agitado e procedeu-

se a centrifugação à 12.500 rpm por 2 min. Em seguida, apenas o sobrenadante foi recuperado, o qual foi armazenado à 4 °C, sendo a concentração da taxtomina determinada em espectrofotômetro a 410 nm.

2.2.1.3 Efeito *in vitro* da taxtomina A sobre o crescimento micelial de *Phytophthora plurivora*

Para condução deste experimento utilizou-se meio de cultivo V8 (Apêndice A), ao qual foi adicionado o volume de taxtomina A necessário para a obtenção das seguintes concentrações: 2,5, 10, 25, 50 e 100 µg mL⁻¹. Como controle, placas de Petri contendo apenas o meio de cultivo foram utilizadas. Foi depositado no centro de cada placa um disco de 5 mm do patógeno. As placas foram incubadas à 20 °C por quatro dias, no escuro, sendo realizadas, ao final do experimento, duas medições perpendiculares do diâmetro da colônia. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições, e as médias analisadas pelo teste de Tukey a 5%.

2.2.1.4 Efeito *in vitro* de compostos voláteis produzidos por *Streptomyces scabies* sobre o crescimento micelial de *Phytophthora plurivora*

Foram utilizadas placas de poliestireno divididas ao meio. De um lado da placa, foi utilizado meio aveia (cocção de 40 g de farinha de aveia, 16 g de ágar completados até 1 L de água) e, do lado oposto, utilizou-se meio V8. A suspensão de bactérias foi preparada a partir de uma placa com 20 dias de idade. A mesma foi calibrada em espectrofotômetro (Abs 540 nm = 0,1) e 50 µL foram semeados no lado da placa contendo meio aveia, com o auxílio de uma alça de Drigalski. Como tratamento controle foram utilizadas placas com a presença do patógeno em meio V8 e a ausência da bactéria em meio aveia. Decorridos sete dias do crescimento da bactéria no escuro à 28 °C, foi realizada a transferência de um disco de 5 mm de micélio de *P. plurivora* na região central do lado da placa contendo meio V8. Posteriormente, as placas foram mantidas em sala climatizada, sob temperatura ambiente e escuro.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com oito repetições e, diariamente, foi realizada a medição do diâmetro da colônia, através de duas medidas perpendiculares opostas, sendo utilizada a média na análise dos resultados, através do teste de Tukey a 5%.

2.2.1.5 Verificação do efeito de antibiose entre *Streptomyces scabies* e *Phytophthora plurivora*

Foram utilizadas placas de poliestireno de 90 mm contendo 20 mL de meio V8. Uma suspensão bacteriana foi preparada (Abs 540 nm = 0,1) e 10 µL foram depositados em quatro pontos equidistantes próximo aos bordos das placas. Para evitar o esparramamento das gotas, as placas foram mantidas em câmara de fluxo por uma noite. Posteriormente, as placas contendo a bactéria foram transferidas para câmara de crescimento à 28 °C e escuro. Após sete dias, foi depositado no centro da placa um disco de micélio do patógeno de 5 mm de diâmetro e, em seguida, as placas foram transferidas para sala com temperatura ambiente (25 °C) e escuro. O tratamento controle foi composto de placas contendo apenas o patógeno e o ensaio foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições.

2.2.1.6 Efeito da taxtomina sobre a motilidade de zoósporos de *Phytophthora plurivora*

Neste ensaio, foram utilizadas lâminas escavadas contendo duas cavidades. Em uma das cavidades da lâmina foi adicionada uma suspensão de zoósporos de *P. plurivora* cuja concentração foi de 6×10^5 zoósporos mL⁻¹. A toxina foi adicionada à suspensão, de forma que, a concentração final fosse de 0, 2,5, 10, 25, 50 e 100 µg mL⁻¹. Em seguida, a toxina foi gentilmente homogeneizada à suspensão. Como controle negativo, na outra cavidade da mesma lâmina, o mesmo procedimento foi realizado, exceto a adição da toxina, a qual foi substituída por água destilada esterilizada. Como controle positivo, utilizou-se sulfato de cobre, fungicida utilizado no controle de oomicetos. Posteriormente, foi observado o comportamento dos zoósporos quanto a motilidade, sendo realizados registros por meio de vídeo.

2.2.2 Tratamento de plântulas de faia com taxtomina via sistema radicular com vistas a indução de resistência

2.2.2.1 Obtenção das plântulas de faia

Sementes de faia foram semeadas em bandejas plásticas contendo vermiculita e mantidas em geladeira à 4 °C por, aproximadamente, duas semanas. Quando as sementes apresentaram protrusão radicular, as mesmas foram transferidas para bandejas plásticas contendo vermiculita, onde se desenvolveram

em sala climatizada à 25 °C sob luz ambiente. Para condução dos experimentos, foram utilizadas plântulas com, aproximadamente, três meses de idade.

2.2.2.2 Obtenção do inóculo de *Phytophthora plurivora*

Com o objetivo de recuperar a agressividade de *P. plurivora* procedeu-se a infecção e reisolamento do patógeno a partir de plântulas de faia. Para tanto, cinco discos do patógeno, obtidos a partir de placas de *P. plurivora* crescendo em meio V8, foram adicionados em tubos tipo Falcon, de 15 mL, contendo água. Em seguida, plântulas de faia com, aproximadamente, três meses de idade foram colocadas nos tubos e estes vedados com filme plástico (“parafilme”). Após, aproximadamente, sete dias as plântulas de faia começaram a apresentar sintomas de murcha. Estas foram retiradas dos tubos, as raízes secas em papel e, cortadas em fragmentos de 1 a 2 cm, os quais foram submetidos a assepsia por 30 s em etanol 70%, secos e dispostos (10 a 15 fragmentos placa⁻¹) em meio de cultivo PRNAH – V8 ágar. O meio de cultivo PRNAH – V8 ágar contém fungicidas e antibióticos de modo a facilitar o isolamento do patógeno em questão (JUNG; BLASCHKE; NEUMANN, 1996; Apêndice B). Os fungicidas e antibióticos foram adicionados ao meio após a autoclavagem. Placas foram incubadas a 20 °C, no escuro, sendo analisadas diariamente e, após dois a três dias, micélio característico do patógeno foi observado e esse foi transferido para novas placas com meio de cultivo PRNAH – V8 ágar para obtenção de colônia pura. Após cinco dias o fungo foi repicado para meio de cultivo V8-ágar.

Para a produção de zoósporos foram utilizadas placas de *P. plurivora* crescidas em meio V8-ágar por cinco dias à 20 °C e escuro. Após esse período foi adicionado um volume de água destilada suficiente para cobrir a colônia, sendo este removido e substituído a cada 24 h. A troca de água foi paralisada no momento em que foi possível visualizar a presença de esporângios por toda a placa. Para a liberação dos zoósporos, a placa foi mantida com água e aberta por 1,5 h à 4 °C. Após este período foi possível visualizar intensa mobilidade destas estruturas, sendo efetuada a calibração da concentração (6×10^5 zoósporos mL⁻¹) com auxílio de hemocítmetro, e a suspensão utilizada nos diferentes experimentos.

2.2.2.3 Toxicidade e efeito indutor de resistência da taxtomina A em plântulas de faia

Segundo Roma (2012), em trabalho prévio, quando da aplicação radicular de taxtomina na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, houve 40% de mortalidade das plântulas de faia no tratamento em que foi aplicada somente a taxtomina. Isto pode ser visto como um indício de que o emprego da taxtomina via sistema radicular, na concentração usada, seja tóxica para as plântulas de faia. Dessa forma, com vistas a encontrar uma concentração de taxtomina que não fosse fitotóxica para as plântulas e que poderia afetar o desenvolvimento do patógeno, foram conduzidos os testes a seguir.

Plântulas de faia com, aproximadamente, três meses foram acondicionadas em tubos tipo Falcon de 15 mL contendo soluções de taxtomina nas concentrações de 0, 2,5, 10, 25, 50 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Estas permaneceram por 10 dias em sala climatizada a 25°C e luz ambiente. Durante esse tempo, realizou-se avaliações visuais periódicas para se detectar sintomas de fitotoxidez, como amarelecimento, murcha e/ou morte das plântulas. Avaliou-se também o consumo de água, de acordo com método descrito no item 2.2.2.4.

Posteriormente a estes testes, conduziu-se experimento com vistas a se avaliar o efeito da taxtomina A no controle da podridão radicular causada por *P. plurivora*. Para tanto, plântulas de faia foram transferidas para tubos tipo Falcon contendo a taxtomina nas concentrações de 10, 25, 50 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. As plântulas permaneceram em contato com a fitotoxina por três dias em sala climatizada a 25°C e luz ambiente. Após esse período, a taxtomina foi removida e as raízes gentilmente lavadas com água destilada. Dessa forma, apenas o efeito indutor de resistência da taxtomina, caso presente, seria observado. Os tratamentos foram organizados de acordo com a Tabela 1. O número de plantas por tratamento variou entre cinco e 10 plantas, em função do ensaio.

Tabela 1 - Tratamentos de plântulas de faia com diferentes concentrações de taxtomina A, proveniente de *Streptomyces scabies*, com vistas a indução de resistência contra *Phytophthora plurivora*

Tratamentos	
Experimento 2.1	Tratamento sem taxtomina e sem patógeno (- PLU)
	Tratamento sem taxtomina e com patógeno (+ PLU)
	10 µg de taxtomina e sem o patógeno (10 µg - PLU)
	10 µg de taxtomina e com o patógeno (10 µg + PLU)
	25 µg de taxtomina e sem o patógeno (25 µg - PLU)
	25 µg de taxtomina e com o patógeno (25 µg + PLU)
Experimento 2.2	Tratamento sem taxtomina e sem patógeno (- PLU)
	Tratamento sem taxtomina e com patógeno (+ PLU)
	50 µg de taxtomina e sem o patógeno (50 µg - PLU)
	50 µg de taxtomina e com o patógeno (50 µg + PLU)
	100 µg de taxtomina e sem o patógeno (100 µg - PLU)
	100 µg de taxtomina e com o patógeno (100 µg + PLU)

2.2.2.4 Absorção de água

Diariamente, os tubos plásticos, contendo as plântulas de faia, foram pesados em balança de precisão, sempre no mesmo horário. Os dados obtidos foram submetidos à seguinte fórmula:

$$Ab = P - Pa$$

Onde:

Ab = absorção de água, em gramas

P = peso do conjunto tubo plástico + planta + volume de água dentro do tubo no dia anterior, em gramas

Pa = peso do conjunto tubo plástico + planta + volume de água atual dentro do tubo, em gramas

A avaliação foi realizada por 14 dias (experimento 2.1; Tabela 1) e 10 dias (experimento 2.2; Tabela 1) a partir do dia da inoculação com o patógeno. Os dados obtidos diariamente (Ab) foram transformados em porcentagem de forma que, o valor de Ab obtido para cada tratamento na primeira avaliação foi transformado para 100%. Nas demais avaliações, os dados foram transformados proporcionalmente à esta transformação inicial. Ao final do experimento, determinou-se a área foliar de cada plântula e os valores de absorção de água foram corrigidos, sendo expressos em % de absorção de água por cm⁻² de área foliar.

2.2.2.5 Fluorescência da clorofila

Utilizou-se o fluorômetro MINI-PAM (Heinz Walz, Effeltrich, GmbH, Alemanha) para se determinar a eficiência quântica do fotossistema II (PSII) (F_v/F_m). A produtividade efetiva do fotossistema II (FS II) infere na capacidade efetiva da planta em converter energia luminosa em química. Um pulso de saturação intensa (F'), com duração de 0,8 s, foi aplicado à plântula, o qual leva à completa saturação do FS II. Assim, a fluorescência máxima (F_m') é emitida desde que a energia excessiva não possa ser utilizada pela fotossíntese. A produtividade do FS II pode ser calculada através da fórmula proposta por Genty; Briantais; Baker (1989). Os dados de rendimento (Y) foram automaticamente fornecidos pelo equipamento, os quais foram submetidos à análise de variância à 5% de probabilidade.

2.2.2.6 Mortalidade das plântulas

As plântulas foram observadas diariamente e aquelas que se apresentavam murchas e secas foram consideradas mortas. Os dados foram expressos em porcentagem.

2.2.2.7 Quantificação de *Phytophthora plurivora*

2.2.2.7.1 Extração e purificação de DNA

O DNA total foi obtido a partir da extração de amostras de raízes utilizando-se o “DNeasy® Plant Mini Kit” (Qiagen®), conforme as recomendações do fabricante. O sistema radicular das plântulas foi liofilizado e, em seguida, apenas as raízes finas foram transferidas para tubo de microcentrífuga, juntamente com duas pequenas bolas de inox de 4 mm de diâmetro. Posteriormente, em um equipamento denominado de “Ball-mill”, as raízes foram trituradas por meio de intensa agitação por 10 min, de forma que estas se tornassem apenas pó.

Em seguida, cerca de 20 mg deste pó foram transferidos para um novo tubo de microcentrífuga, ao qual foram adicionados 400 μ L do tampão AP1 (“Lysis buffer”) e 4 μ L de RNase. O material foi mantido em “banho-maria” por 10 min a 65 °C, sendo os tubos agitados manualmente duas a três vezes durante este período. Posteriormente, foram adicionados 130 μ L do tampão P3 (“Neutralization buffer”) e, depois, os tubos foram incubados em gelo por 5 min. Em seguida, o material foi centrifugado a 14.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi recuperado e adicionado a outro microtubo que possui um filtro em seu interior (“QIA shredder Mini Spin

Columnm”). Novamente foi realizada centrifugação a 14.000 rpm por 2 min e o material filtrado foi recolhido em um novo microtubo e foram adicionados 600 µL de tampão AW1 (“Wash buffer”). Uma alíquota de 650 µL foi adicionada a um microtubo contendo outro filtro (“DNeasy Mini Spin Columnm”), sendo em seguida centrifugada a 8.000 rpm por 1 min. O mesmo procedimento foi realizado com o restante do material presente no microtubo onde foi adicionado o tampão AW1.

Descartou-se o material filtrado, sendo o filtro transferido para novo tubo tipo Eppendorf. Adicionou-se 500 µL de AW2 (“Wash buffer”) e realizou-se a centrifugação a 8.000 rpm por 1 min, sendo que, esta etapa foi realizada duas vezes, porém, na segunda vez a centrifugação foi a 14.000 rpm por 2 min. A coluna, contendo DNA, foi transferida para outro microtubo e 100 µL do tampão AE (“Elution buffer”) foram adicionados no centro da coluna. Esta foi incubada por 5 min a temperatura ambiente e centrifugada a 8.000 rpm por 1 min para lavagem do DNA. Esta etapa também foi realizada duas vezes. O DNA obtido foi armazenado a - 80 °C.

Para purificação do extrato de DNA utilizou-se o kit “Wizard DNA clean up System”, da Promega seguindo as recomendações do fabricante. Em tubo para microcentrífuga foram transferidos 100 µL do extrato de DNA e 1 mL da resina “Clean up” e, posteriormente, o tubo foi gentilmente agitado para homogeneização. Em seguida, uma seringa foi instalada à uma coluna Wizard, à qual foi adaptada à um tubo de 2 mL. A mistura extrato de DNA + resina foi passada pela coluna através da pressão no embolo da seringa. Após esta etapa, 2 mL de isopropanol (80%) foram adicionados e pressionados contra a coluna para lavagem do DNA. Para secagem, o embolo da seringa foi pressionado apenas com ar. A coluna foi transferida para um novo tubo e centrifugada por 2 min à 14.000 rpm. Posteriormente, 50 µL de água à 65 °C foram adicionados à coluna e incubados por 1 minuto e, logo após procedeu-se a centrifugação. Esta última etapa foi realizada duas vezes e, em seguida, o material foi armazenado à - 80 °C.

2.2.2.7.2 Quantificação de *Phytophthora plurivora*

O PCR quantitativo foi realizado de acordo com o método proposto por Böhm et al. (1999). Como reagentes foram utilizados o “Master-mix universal 23” para PCR, o qual continha tampão 10X, cloreto de magnésio (25 mM), dNTP-mix (5 mM) e Taq polimerase (5 U µL⁻¹).

As sequências de iniciadores utilizadas foram:

P5 – 5´ TCAACCCTTTTAGTTGGGGGTC 3´

P6 – 5´TTTAAACAAAAAGCTACTAGCCCAGAC 3´

Já a sequência da sonda fluorogênica fosforilada foi:

F3 – 5´CTTTTTTTGCGAGCCCTATCATGGCG 3´

As reações foram realizadas em placas com 96 cavidades, específicas para este tipo de análise. Em cada cavidade foram depositados 12,5 µL do “Master-mix universal”, 0,5 µL do fluoróforo, 0,75 µL de cada um dos iniciadores, 5,5 µL de água e 5 µL do DNA da amostra, a qual foi diluído 10 vezes em água. Assim, o volume total utilizado por reação foi de 25 µL.

Para realização da curva padrão, uma amostra de DNA de *P. plurivora*, com concentração de DNA previamente conhecida, foi diluída de forma seriada nas seguintes proporções: 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000, 1:100.000 (v/v). As condições de PCR empregadas foram 15 min à 95 °C para uma desnaturação inicial, seguido por 40 ciclos de 15 s à 95 °C, 1 min à 62 °C e 5 min à 72 °C.

2.2.3 Efeito da taxtomina A produzida por *Streptomyces scabies* sobre *Phytophthora nicotianae*

2.2.3.1 Efeito *in vitro* da taxtomina sobre o crescimento micelial e motilidade de zoósporos de *Phytophthora nicotianae*

Os testes para avaliar se a taxtomina A possui efeito direto sobre o micélio e zoósporos de *P. nicotianae* foram conduzidos conforme descrito nos itens 2.2.1.3 e 2.2.1.6, respectivamente.

2.2.4 Tratamento de plântulas de citros com taxtomina A via sistema radicular com vistas a indução de resistência

2.2.4.1 Obtenção das plântulas de citros

Plântulas de tangerina ‘Sunki’, suscetível a gomose, foram obtidas através de sementes fornecidas pela Fundecitrus e pelo Centro de Citricultura Sylvio Moreira, as quais foram removidas de frutos de laranja e retirada a película que as recobre. As mesmas foram semeadas em bandejas plásticas contendo substrato autoclavado e mantidas em casa de vegetação. Após atingirem duas a três folhas, as plântulas foram utilizadas nos experimentos envolvendo taxtomina A no controle da gomose.

2.2.4.2 Obtenção do inóculo de *Phytophthora nicotianae*

O isolado de *P. nicotianae* foi cedido pelo Dr. Ronaldo J. D. Dalio (APTA/IAC). Este isolado foi mantido em meio de cultivo cenoura-ágar a 28 °C, no escuro. Periodicamente, para reativação do patógeno, procedeu-se o reisolamento em frutos de laranja, conforme descrito por Rezende (2014).

Para a produção de zoósporos de *P. nicotianae*, 10 discos de micélio do patógeno foram retirados da borda da colônia com sete dias de crescimento em meio de cultivo cenoura-ágar e, transferidos para placas de poliestireno contendo 10 mL de meio de cultivo cenoura-líquido diluído (2 mL de meio de cultivo cenoura-líquido e 8 mL de água destilada autoclavada) e mantidas a 24 °C sob luz fluorescente constante. Após 24 h, para proporcionar estresse nutricional e 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. Em seguida, as mesmas foram colocadas na geladeira (4 °C) por 20 min e, a seguir, em temperatura ambiente por 20 min para promover a liberação dos zoósporos (ARAÚJO, 1998), sendo assim obtida a suspensão de zoósporos para a inoculação. A concentração foi ajustada para 2×10^5 zoósporos mL⁻¹ com auxílio de hemocitômetro.

2.2.4.3 Toxicidade e efeito indutor de resistência da taxtomina A sobre plântulas de citros

Os testes com citros foram conduzidos conforme descrito para faia no item 2.2.2.3. Plântulas de citros com, aproximadamente, um mês de idade (duas a três folhas) foram acondicionadas em tubos tipo Falcon de 15 mL contendo soluções de taxtomina nas concentrações de 0, 2,5, 10, 25, 50 e 100 µg mL⁻¹, a fim de avaliar se havia efeito fitotóxico da toxina sobre as plântulas.

Posteriormente a estes testes, conduziu-se experimento com vistas a se avaliar o efeito da taxtomina A no controle da podridão radicular causada por *P. nicotianae* em citros. Os tratamentos foram organizados de acordo com a Tabela 2, utilizando-se apenas as concentrações de 50 e 100 µg mL⁻¹.

Tabela 2 – Tratamentos de plântulas de citros com diferentes concentrações de taxtomina A, proveniente de *Streptomyces scabies*, com vistas a indução de resistência contra *Phytophthora nicotianae*

Tratamentos
Tratamento sem taxtomina e sem patógeno (- PN)
Tratamento sem taxtomina e com patógeno (+ PN)
50 µg de taxtomina e sem o patógeno (50 µg - PN)
50 µg de taxtomina e com o patógeno (50 µg + PN)
100 µg de taxtomina e sem o patógeno (100 µg - PN)
100 µg de taxtomina e com o patógeno (100 µg + PN)

2.2.4.4 Avaliações

Avaliou-se a absorção de água (item 2.2.2.4), fluorescência da clorofila (item 2.2.2.5) e mortalidade das plântulas (item 2.2.2.6).

2.2.4.5 Quantificação de *Phytophthora nicotianae*

O PCR quantitativo foi realizado de acordo com o método proposto por Ippolito; Schena; Nigro (2002). Como reagentes foram utilizados o “SyBr master-mix universal” para PCR, o qual continha tampão 10X, cloreto de magnésio (25 mM), dNTP-mix (5 mM) e Taq polimerase (5 U µL⁻¹). As sequências de iniciadores utilizadas foram:

Pn5B: GAACAATGCAACTTATTGGACGTTT

Pn6: AACCGAAGCTGCCACCCTAC

As reações foram realizadas em placas com 96 cavidades, específicas para este tipo de análise. Em cada cavidade foram depositados 12,5 µL do “Master-mix universal, 1,0 µL de cada um dos iniciadores, 5,5 µL de água e 5 µL do DNA da amostra, o qual foi diluído 10 vezes em água. Assim, o volume total utilizado por reação foi de 25 µL.

Para realização da curva padrão, uma amostra de DNA de *P. nicotianae*, com concentração de DNA previamente conhecida, foi diluída de forma seriada nas seguintes proporções: 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000, 1:100.000 (v/v). As condições de PCR empregadas foram 15 min à 95 °C para uma desnaturação inicial, seguido por 40 ciclos de 15 s à 95 °C, 30 s à 60 °C e 15 min à 72 °C.

2.2.4.6 Análises bioquímicas

No Brasil, alguns testes com a taxtomina foram conduzidos visando um maior entendimento dos resultados obtidos anteriormente durante o doutorado sanduíche.

As análises bioquímicas foram realizadas apenas em ensaios desenvolvidos no Brasil.

2.2.4.6.1 Preparo do extrato proteico

As amostras de raízes e folhas frescas foram pesadas e maceradas em nitrogênio líquido, com auxílio de almofariz e pistilo. Após, foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), na proporção 1:6 (p/v) acrescido de polivinilpirrolidona (PVPP). O homogenato foi centrifugado a 10.000 rpm durante 30 min a 4 °C, sendo o sobrenadante obtido considerado como extrato enzimático, para a determinação da atividade da enzima β -1,3-glucanase, bem como o teor de proteínas totais.

2.2.4.6.2 Proteínas totais

O teor total de proteínas foi determinado de acordo com o método de Bradford (1976). Para tanto, foram adicionados a cada 20 μ L do sobrenadante do extrato proteico, 1.000 μ L do reagente de Bradford (diluído em água destilada na proporção de 1:4). Após 5 min, foi efetuada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 595 nm. A concentração de proteínas foi expressa em termos de equivalentes μ g de albumina de soro bovino g^{-1} de tecido fresco.

2.2.4.6.3 Atividade da β -1,3-glucanase

A determinação da atividade da β -1,3-glucanase foi realizada de acordo com Kombrink e Hahlbrock (1986). Para isso, a partir do extrato proteico obtido anteriormente, as reações foram conduzidas da seguinte forma:

- reação (1): 150 μ L de laminarina 0,2%, previamente dissolvida no tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) e 100 μ L de extrato proteico;
- controle da reação (2): 150 μ L de laminarina 0,2 %, previamente dissolvida no tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0), 100 μ L de extrato proteico e 125 μ L de ADNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico);
- branco: 150 μ L de laminarina 0,2 %.

As amostras foram incubadas a 40 °C por 4 h. Após esse período, adicionou-se 125 μ L de ADNS aos tubos da reação e branco, sendo as amostras incubadas a 95 °C por 5min, seguidas de resfriamento em gelo. O volume das amostras foi completado para 1,5 mL com a adição de água. A absorbância da glicose liberada

pela laminarina foi determinada em espectrofotômetro a 410 nm, sendo obtida com base na subtração da reação (1) (glucanases hidrolisam laminarina liberando glicose) com o controle da reação (2) (glucanases tratadas com ADNS não hidrolisam laminarina). Os resultados foram expressos em μg de glicose⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

2.3 Resultados

2.3.1 Efeito da taxtomina A produzida por *Streptomyces scabies* sobre *Phytophthora plurivora*

2.3.1.1 Efeito *in vitro* da taxtomina sobre o crescimento micelial de *Phytophthora plurivora*

Após a adição de diferentes concentrações da fitotoxina ao meio de cultivo, não foi observado efeito significativo, pelo teste de Tukey a 5%, da taxtomina no crescimento micelial de *P. plurivora* (dados não mostrados), comparando-se com o tratamento controle (Figura 1).

Figura 1 – Crescimento micelial de *Phytophthora plurivora* após quatro dias de crescimento em meio de cultivo V8, contendo diferentes concentrações de taxtomina A, proveniente de *Streptomyces scabies*

2.3.1.2 Efeito *in vitro* de compostos voláteis produzidos por *Streptomyces scabies* sobre o crescimento micelial de *Phytophthora plurivora*

Observa-se na Figura 2 que não houve diferença no diâmetro da colônia do patógeno *P. plurivora* entre os tratamentos. O crescimento da colônia foi mensurado

e analisado pelo teste de Tukey a 5% (dados não mostrados). Isto evidencia que os compostos voláteis produzidos pela bactéria, ao crescer em meio de aveia, não possuem efeito indireto sobre este oomiceto.

Figura 2 - Efeito de compostos voláteis produzidos por *Streptomyces scabies* sobre o crescimento micelial de *Phytophthora plurivora* após quatro dias. Em (A), tratamento controle e em (B), tratamento com a bactéria. No lado esquerdo da placa, há meio aveia para o crescimento da bactéria e, no lado direito, há meio V8 para o crescimento de *P. plurivora*. A suspensão bacteriana foi semeada e, após sete dias, o disco do patógeno foi transferido

2.3.1.3 Verificação de antibiose entre *Streptomyces scabies* e *Phytophthora plurivora*

Foi observado efeito inibitório de *S. scabies* sobre o crescimento micelial de *P. plurivora* (Figuras 3 e 4). Devido à presença de um halo de inibição, o qual não foi quantificado, pode-se dizer que *S. scabies* produz antibióticos quando em meio de cultura (Figura 3 e 4). No entanto, neste estudo, avaliou-se apenas o efeito indutor de resistência, não sendo conduzidos testes em que a toxina e o patógeno permaneceram em contato direto com as plantas. Testes futuros podem ser conduzidos buscando explorar o potencial de antibiose de *S. scabies*.

Figura 3 - Antagonismo direto entre *Streptomyces scabies* e *Phytophthora plurivora* após sete dias do crescimento do patógeno. As quatro colônias esbranquiçadas evidenciam o crescimento bacteriano e, no centro, a colônia de *P. plurivora*. A suspensão bacteriana (Abs 540 nm = 0,1) foi semeada sete dias antes da transferência do disco do patógeno

Figura 4 - Antagonismo direto entre *Streptomyces scabies* (Ss) e *Phytophthora plurivora* (PLU) após sete dias. A suspensão bacteriana (Abs 540 nm = 0,1) foi semeada sete dias antes da transferência do disco do patógeno. Em (A) visualização a olho nu e em (B) visualização em lupa com aumento de 10 vezes. As setas indicam os bordos da colônia do patógeno e a zona de inibição

2.3.1.4 Efeito da taxtomina sobre a motilidade de zoósporos de *Phytophthora plurivora*

A taxtomina A não afetou a motilidade dos zoósporos de *P. plurivora* (Tabela 3). Mesmo após uma hora de observação, os zoósporos submetidos ao tratamento com taxtomina apresentavam motilidade semelhante ao controle (concentração de 0 µg). No tratamento com sulfato de cobre, os zoósporos foram paralisados imediatamente após a adição do mesmo, conforme esperado, visto que este composto é tóxico à essas estruturas. Assim, após estes ensaios, pode-se afirmar que a taxtomina não apresenta efeito direto significativo sobre *P. plurivora*.

Tabela 3 – Motilidade de zoósporos de *Phytophthora plurivora*, após uma hora em contato com diferentes concentrações de taxtomina A e fungicida a base de sulfato de cobre

Tratamentos	Motilidade de <i>P. plurivora</i>
100 µg	-*
50 µg	-
25 µg	-
10 µg	-
2,5 µg	-
0 µg	-
Sulfato de cobre	+

* (-) O tratamento não afetou a motilidade dos zoósporos

2.3.2 Tratamento de plântulas de faia com taxtomina A via sistema radicular com vistas a indução de resistência

2.3.2.1 Absorção de água

Na Figura 5 podemos observar a absorção de água por plântulas de faia, quando submetidas ao crescimento em tubos contendo solução de taxtomina em diferentes concentrações. Através dos dados pode-se observar que houve efeito fitotóxico da toxina sobre as plântulas na concentração de 50 μg , visto que, houve efeito sobre a absorção de água e, por conseguinte, sobre a fisiologia da planta. Nas demais concentrações foi observada redução na absorção de água, mas não diferindo do controle (0 μg).

Figura 5 - Absorção de água por plântulas de faia tratadas com diferentes concentrações de taxtomina A. Linhas com a mesma letra, na última avaliação, não diferem estatisticamente, de acordo com o teste de Tukey a 5%. As barras indicam o erro padrão da média (n=5)

As concentrações de taxtomina acima também foram testadas com vistas a se avaliar o potencial efeito indutor de resistência em plântulas de faia. Na Figura 6, observa-se que plântulas de faia tratadas com 10 ou 25 μg de taxtomina e inoculadas com *P. plurivora* exibiram uma redução na absorção de água, quando comparadas com o tratamento apenas com *P. plurivora*, no entanto, sem diferir estatisticamente. As plântulas tratadas com 50 ou 100 μg de taxtomina e inoculadas com *P. plurivora* exibiram absorção de água similar ao tratamento inoculado somente com o patógeno (Figura 7).

Figura 6 - Absorção de água em plântulas de faia tratadas com 10 ou 25 µg de taxtomina A e inoculadas ou não com *Phytophthora plurivora* (PLU). Linhas com a mesma letra, na última avaliação, não diferem estatisticamente, de acordo com o teste de Tukey a 5%. As barras indicam o erro padrão da média (n=10)

Figura 7 - Absorção de água em plântulas de faia tratadas com 50 ou 100 µg de taxtomina A e inoculadas ou não com *Phytophthora plurivora* (PLU). Linhas com a mesma letra, na última avaliação, não diferem estatisticamente, de acordo com o teste de Tukey a 5%. As barras indicam o erro padrão da média (n=10)

2.3.2.2 Fluorescência da clorofila

O tratamento com 10 µg de taxtomina e inoculação com o agente patogênico reduziu a fluorescência da clorofila (Figura 8). Os valores de fluorescência da clorofila das plântulas de faia não diferiram entre os tratamentos com 50 e 100 µg de taxtomina e o controle, tanto em plântulas inoculadas e não inoculadas com o patógeno (Figura 9).

Figura 8 - Fluorescência da clorofila (medida pelo rendimento quântico do fotossistema II) de plântulas de faia tratadas com 10 ou 25 µg taxtomina A e inoculadas ou não com *Phytophthora plurivora* (PLU). Barras com a mesma letra não diferem estatisticamente, de acordo com o teste de Tukey a 5%. As barras indicam o erro padrão da média (n=10). Avaliação realizada no 14º dia

Figura 9 - Fluorescência da clorofila (medida pelo rendimento quântico do fotossistema II) de plântulas de faia tratadas com 50 ou 100 µg de taxtomina A e inoculadas ou não com *Phytophthora plurivora* (PLU). Linhas com a mesma letra, na última avaliação, não diferem estatisticamente, de acordo com o teste de Tukey a 5%. As barras indicam o erro padrão da média (n=10)

2.3.2.3 Mortalidade das plântulas

Observou-se uma baixa mortalidade de plântulas mesmo com a inoculação do patógeno reisolado no experimento com 10 e 25 µg de taxtomina. Possivelmente, algum fator, como temperatura ambiente muito alta, afetou a motilidade dos zoósporos fazendo com que estes não infectassem as plântulas de faia. Apesar disso, pode-se observar que os tratamentos com taxtomina, aparentemente,

induziram suscetibilidade nas plântulas de faia resultando em maior incidência da doença (Tabela 4; Figura 10).

Tabela 4 – Mortalidade de plântulas de faia tratadas ou não com taxtomina A, nas doses de 10 ou 25 µg, e inoculadas (+ PLU) ou não (- PLU) com *Phytophthora plurivora*. A avaliação foi realizada 14 dias após a inoculação. Foram utilizadas 10 plantas por tratamento

Tratamentos	Incidência (%)
- Plu	0
+ Plu	20
10 µg – Plu	0
10 µg + Plu	50
25 µg – Plu	0
25 µg + Plu	30

Figura 10 - Efeito do tratamento radicular com taxtomina (10 ou 25 µg) sobre a incidência de podridão radicular causada por *Phytophthora plurivora* em plântulas de faia 14 dias após a inoculação. A aplicação da fitotoxina foi realizada três dias antes da inoculação do patógeno. Legenda: PLU = *P. plurivora*; THAX = taxtomina. Círculos vermelhos evidenciam plântulas mortas no ensaio. As plântulas de faia apresentavam-se com três meses no início do experimento

Plântulas de faia tratadas com 50 ou 100 µg de taxtomina e inoculadas com *P. plurivora* apresentaram incidência da doença levemente superior ao tratamento apenas com a inoculação com *P. plurivora* (Tabela 5; Figura 11).

Tabela 5 – Mortalidade de plântulas de faia tratadas ou não com taxtomina A, nas doses de 50 ou 100 µg, e inoculadas (+ PLU) ou não (- PLU) com *Phytophthora plurivora*. A avaliação foi realizada 10 dias após a inoculação. Foram utilizadas 10 plantas nos tratamentos com inoculação do patógeno e cinco nos tratamentos apenas com a toxina

Tratamentos	Incidência (%)
- Plu	0
+ Plu	80
50 µg - Plu	0
50 µg + Plu	100
100 µg - Plu	0
100 µg +Plu	90

Figura 11 - Efeito do tratamento radicular com taxtomina (50 ou 100 µg) sobre a incidência de podridão radicular causada por *Phytophthora plurivora* em plântulas de faia 10 dias após a inoculação. A aplicação da fitotoxina foi realizada três dias antes da inoculação do patógeno. Legenda: PLU = *P. plurivora*; THAX = taxtomina. Setas vermelhas evidenciam plântulas mortas no ensaio. As plântulas de faia apresentavam-se com três meses no início do experimento

2.3.2.4 Quantificação de *Phytophthora plurivora*

Na Figura 12A, pode-se observar que nos tratamentos com 10 e 25 µg de taxtomina, houve um aumento na concentração de DNA do patógeno nas raízes, o

que se mostra consistente com os dados de incidência da doença. Na figura 12B, observa-se que plântulas de faia tratadas com 50 e 100 μg de taxtomina apresentaram quantidade de DNA de *P. plurivora*, detectado por qPCR, levemente superior ao tratamento inoculado apenas com o patógeno, mas sem diferir estatisticamente.

Figura 12 – Concentração de *Phytophthora plurivora* (ng DNA g^{-1} de tecido seco) em raízes de faia tratadas ou não com taxtomina (10 ou 25 μg – A; 50 ou 100 μg - B) e inoculadas ou não com *P. plurivora*. A análise estatística, por meio de teste de Tukey a 5 % de probabilidade, distingue apenas os tratamentos em que a inoculação do patógeno foi realizada. As barras indicam o erro padrão da média (n=10)

2.3.3 Efeito da taxtomina A produzida por *Streptomyces scabies* sobre *Phytophthora nicotianae*

2.3.3.1 Efeito *in vitro* da taxtomina A sobre o crescimento micelial de *Phytophthora nicotianae*

Não foi observado efeito da taxtomina A, proveniente de *S. scabies*, sobre o crescimento micelial de *P. nicotianae* (Figura 13).

Figura 13 – Crescimento micelial de *Phytophthora nicotianae* após cinco dias em meio de cultivo cenoura-ágar contendo diferentes concentrações de taxtomina A, proveniente de *Streptomyces scabies*

2.3.3.2 Efeito da taxtomina A sobre a motilidade de zoósporos de *Phytophthora nicotianae*

Assim como observado para *P. plurivora*, não se detectou efeito da taxtomina sobre a motilidade de zoósporos de *P. nicotianae* (Tabela 6). Mesmo após 3h, a motilidade dos zoósporos da concentração de 100 µg foi semelhante a motilidade observada no controle (0 µg).

Tabela 6 – Motilidade de zoósporos de *Phytophthora nicotianae* após três horas em contato com diferentes concentrações de taxtomina A e fungicida a base de sulfato de cobre

Tratamentos	Motilidade de <i>P. nicotianae</i>
100 µg	-*
50 µg	-
25 µg	-
10 µg	-
2,5 µg	-
0 µg	-
Sulfato de cobre	+

* (-) O tratamento não afetou a motilidade dos zoósporos

2.3.4 Tratamento de plântulas de citros com taxtomina A via sistema radicular com vistas a indução de resistência

2.3.4.1 Absorção de água

Não se observou efeito fitotóxico quando do tratamento radicular de plântulas de citros com taxtomina (Figura 14).

Figura 14 - Absorção de água em plântulas de citros tratadas com diferentes concentrações de taxtomina. As barras indicam o erro padrão da média (n=10). ns: sem diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%

Os dados de absorção de água (Figura 15) e a incidência da doença (Tabela 7 e Figura 17) mostram uma tendência de resistência induzida em plântulas cítricas tratadas com 100 µg de taxtomina. Para os dados de fluorescência da clorofila não houve diferença entre os tratamentos (Figura 16). Através da análise dos dados via qPCR, observa-se que o tratamento com 50 µg de taxtomina reduziu a quantidade de DNA nas raízes de citros, sem diferir da concentração de 100 µg (Figura 18).

Figura 15 - Absorção de água em plântulas de citros tratadas ou não com diferentes concentrações de taxtomina e inoculadas ou não com *Phytophthora nicotianae* (PN). Linhas com a mesma letra, na última avaliação, não diferem estatisticamente, de acordo com o teste de Tukey a 5%. As barras indicam o erro padrão da média (n=10)

2.3.4.2 Fluorescência da clorofila

Para os dados de fluorescência da clorofila não houve diferença entre os tratamentos (Figura 16).

Figura 16 - Fluorescência da clorofila (medida pelo rendimento quântico do fotossistema II) de plântulas de citros tratadas ou não com taxtomina e inoculadas ou não com *Phytophthora nicotianae* (PN). As barras indicam o erro padrão da média (n=10). ns: sem diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%.

2.3.43 Mortalidade das plântulas

Os dados de incidência da doença (Tabela 7 e a Figura 17) mostram uma tendência de resistência induzida em plântulas cítricas tratadas com 100 µg de taxtomina, uma vez que não foram observadas plântulas mortas neste tratamento.

Tabela 7 – Mortalidade de plântulas de citros tratadas ou não com taxtomina A, nas doses de 50 ou 100 µg, e inoculadas (+PN) ou não (-PN) com *Phytophthora nicotianae*. A avaliação foi realizada 14 dias após a inoculação. Foram utilizadas 10 plantas por tratamento

Tratamentos	Incidência (%)
- PN	0
+ PN	20
50 µg - PN	0
50 µg + PN	20
100 µg - PN	0
100 µg + PN	0

Figura 17 - Efeito do tratamento radicular de taxtomina (50 ou 100 µg) sobre a incidência de podridão radicular causada por *Phytophthora nicotianae* em plântulas de citros 14 dias após a inoculação. A aplicação da fitotoxina foi realizada três dias antes da inoculação do patógeno. Legenda: PN = *P. nicotianae*; THAX = taxtomina. Círculos vermelhos evidenciam plântulas mortas no ensaio. As plântulas de citros apresentavam-se com, aproximadamente, 45 dias no início do experimento

2.3.4.4 Quantificação de *Phytophthora nicotianae*

Através da análise dos dados, via qPCR, observa-se que o tratamento com 50 µg de taxtomina reduziu a quantidade de DNA nas raízes de citros, no entanto, não diferindo da concentração de 100 µg (Figura 18).

Figura 18 - Concentração de DNA de *Phytophthora nicotianae* (ng DNA g⁻¹ de tecido seco) em raízes de citros tratadas ou não com taxtamina (50 ou 100 µg) e inoculadas ou não com o patógeno. A análise estatística distingue, por meio de teste de Tukey a 5 % de probabilidade, apenas os tratamentos com a inoculação do patógeno. As barras indicam o erro padrão da média (n=10)

2.3.4.5 Análises bioquímicas

Os dados apresentados anteriormente, para a interação plântulas cítricas e taxtamina A, foram conduzidos durante o doutorado sanduíche na TUM, em Freising na Alemanha. Estes dados mostram uma tendência de resistência induzida em plântulas cítricas tratadas com 100 µg de taxtamina. No entanto, através da análise dos dados via qPCR, observa-se que o tratamento com 50 µg de taxtamina reduziu a quantidade de DNA nas raízes de citros, no entanto, sem diferir estatisticamente da concentração de 100 µg.

Com base nestes dados, não foi possível definir com clareza a melhor concentração a ser utilizada para conduzir os experimentos envolvendo respostas bioquímicas da interação taxtamina A x *P. nicotianae*. Assim, dois experimentos foram conduzidos com vistas a buscar a concentração de taxtamina com melhor resposta sobre o patógeno. No primeiro, realizado para seleção da melhor concentração de taxtamina, observou-se uma baixa incidência da doença (Tabela 8). Os dados de absorção de água não mostraram diferença significativa entre os tratamentos (dados não mostrados).

A análise estatística comparou os tratamentos apenas com a taxtamina, separadamente, dos tratamentos com a toxina e inoculados com o patógeno. Quando se avaliou o teor de proteínas, tanto para raízes quanto para folhas (Figura

19), observou-se um incremento com o aumento das concentrações de taxtomina, sendo o maior valor observado na concentração de 50 µg, não diferindo das concentrações de 10, 25 e 100 µg e do tratamento com Bion[®]. No entanto, quando as plantas tratadas com taxtomina foram submetidas a inoculação com o patógeno, não se observou diferença no teor de proteínas entre os tratamentos, tanto em raízes quanto em folhas.

A atividade da enzima β -1,3-glucanase em raízes (Figura 20) apresentou tendência de incremento com o aumento das concentrações de taxtomina nos tratamentos inoculados com o patógeno, no entanto, sem diferir estatisticamente, assim como o tratamento com o indutor comercial Bion[®]. Somente o tratamento com taxtomina não incrementou a atividade da enzima. Em folhas de plantas tratadas com taxtomina e desafiadas com o patógeno, não se observou diferença na atividade da β -1,3-glucanase. A concentração de 100 µg de taxtomina e o tratamento com Bion[®], na ausência do patógeno, incrementaram a atividade da enzima nas folhas, indicando potencial de ativação sistêmica do sistema de defesa da planta pela taxtomina A e pelo indutor comercial.

Tabela 8 – Incidência de podridão radicular em plântulas de citros tratadas com taxtomina A, nas doses de 2,5, 10, 25, 50 ou 100 µg, e inoculadas com *Phytophthora nicotianae* (+PN). A avaliação foi realizada 14 dias após a inoculação

Tratamentos	Incidência (%)
0µg + PN	33
2,5 µg + PN	16
10 µg + PN	33
25 µg + PN	16
50 µg + PN	16
100 µg + PN	16

Figura 19 - Teor de proteínas em raízes e folhas oriundas de plântulas de citros tratadas com taxtomina A, nas concentrações de 2,5, 10, 25, 50 ou 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, seguidas de inoculação com *Phytophthora nicotianae* (PN). Barras com a mesma letra não diferem estatisticamente, de acordo com o teste de Tukey a 5%. A análise estatística distingue os tratamentos apenas com a taxtomina A, separadamente, dos tratamentos com taxtomina A e inoculados com o patógeno. As barras indicam o erro padrão da média ($n=3$), sendo cada repetição composta por três plantas

Figura 20 - Atividade da β -1,3-glucanase em raízes e folhas de plântulas de citros tratadas com taxtomina A, nas concentrações de 2,5, 10, 25, 50 ou 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, seguidas de inoculação com *Phytophthora nicotianae* (PN). Barras com a mesma letra não diferem estatisticamente, de acordo com o teste de Tukey a 5%. A análise estatística distingue os tratamentos apenas com a taxtomina A, separadamente, dos tratamentos com taxtomina A e inoculados com o patógeno. As barras indicam o erro padrão da média ($n=3$), sendo cada repetição composta por três plantas

Outro teste, utilizando apenas o tratamento com as concentrações de taxtomina e inoculação com o patógeno foi conduzido. Neste ensaio, utilizou-se o dobro da concentração de zoósporos quando comparado aos ensaios anteriores (4×10^5 zoósporos), com vistas a incrementar a incidência da doença. Este fato talvez explique a incidência superior da doença em todas as concentrações de taxtomina, exceto na concentração de 50 μg , quando comparadas ao controle (0 μg) (Figura 21). Uma hipótese é que a taxtomina A não tenha efeito indutor de resistência sob altas pressões do patógeno. No entanto, nas concentrações de 2,5, 25 e 50 μg houve um atraso no desenvolvimento da doença (dados não mostrados).

Figura 21 - Efeito do tratamento radicular com taxtomina A em diferentes concentrações sobre a incidência de podridão radicular causada por *Phytophthora nicotianae* em plântulas de citros 14 dias após a inoculação. A aplicação da fitotoxina foi realizada dois dias antes da inoculação do patógeno. Neste experimento a inoculação com o oomiceto foi realizada utilizando-se a concentração de zoósporos de 4×10^5 zoósporos, o dobro da utilizada nos experimentos anteriores

2.4 Discussão

Toxinas produzidas por fitopatógenos podem causar danos aos tecidos vegetais e são reconhecidamente envolvidas no desenvolvimento de doenças (SCHEFFER, 1983), podendo, por outro lado, dependendo das concentrações, ativar mecanismos de defesa das plantas (GARCIA et al., 2008).

Garcia (2008) em seu estudo visando a compreensão do mecanismo de ação da taxtomina A observou que, em plântulas de sorgo, a referida toxina atuava, principalmente, sobre a membrana plasmática e organelas membranosas, ocasionando desorganização em todas as células dos tecidos tratados. A membrana plasmática das células do mesófilo contraiu-se e destacou-se da parede celular em vários pontos, sendo que o plasmalema não pareceu rompido. Observou-se ainda efeito sobre a permeabilidade seletiva da membrana plasmática através de aumentos na saída de eletrólitos. Os cloroplastos apresentaram deformações na superfície e perda de turgidez, o que, possivelmente, contribuiu para a redução do teor de clorofila *a* e *b*. Fry e Loria (2002) e Scheible et al. (2003) observaram que a

taxtomina inibe também a síntese de celulose, sugerindo que a parede celular é um dos alvos da toxina.

Leiner et al. (1996) também observaram uma série de alterações produzidas pela taxtomina A em raízes e hastes de diferentes espécies de plantas, incluindo hipertrofia de células, resultando em engrossamento de hastes e raízes. A toxina também reduziu a altura de hastes e comprimento de raízes, além de causar necrose nestas. No presente estudo não foram observados sintomas visuais da ação da taxtomina em plântulas de faia e nem foram realizados estudos histológicos. Contudo, observou-se efeito sobre a absorção de água e fluorescência da clorofila em plântulas de faia tratadas com taxtomina A, indicando ação da toxina nos tecidos da planta, possivelmente, na permeabilidade da membrana e nos cloroplastos como observado por Garcia (2008). Devido a ação da taxtomina A na permeabilidade da membrana e/ou parede celular, *Phytophthora plurivora* pode ter seu crescimento nos tecidos radiculares facilitado, resultando assim em maiores níveis de doença nas plantas de faia tratadas com a toxina. Diferentemente do observado em plântulas de faia, em citros a toxina não afetou a absorção de água e a fluorescência da clorofila nas mesmas concentrações. Isso demonstra diferença na sensibilidade de diferentes espécies vegetais a taxtomina A, assim como observado por Leiner et al. (1996).

Por outro lado, Garcia (2008) também observou que plântulas de sorgo apresentaram elevado acúmulo de fitoalexinas do tipo deoxiantocianidinas, nas concentrações de 50, 100 e 150 µg de taxtomina, evidenciando que concentrações mínimas desta toxina podem ser exploradas como eliciador da resposta de defesa em plantas.

Em outro estudo, Garcia et al. (2008) avaliou as concentrações de 5, 50 e 100 µg de taxtomina em plantas de sorgo. O autor observou incrementos nos teores das enzimas quitinase, β -1,3-glucanase e peroxidase e redução de 80% na severidade da antracnose, causada por *Colletotrichum sublineolum*, em plantas de sorgo. *In vitro*, a toxina reduziu o crescimento micelial, germinação e formação de apressórios e aumentou a esporulação. Estes resultados diferem dos obtidos no presente trabalho, quando não se observou efeito da taxtomina A sobre o crescimento micelial e motilidade de zoósporos de *P. nicotianae* e *P. plurivora*, demonstrando haver uma diferença na sensibilidade de diferentes patógenos a taxtomina A.

Em citros, apesar dos dados não serem conclusivos, pode-se observar que a taxtomina A apresentou indícios de controle da doença e potencial na ativação do

status de defesa da planta. Com base nos parâmetros fisiológicos e bioquímicos, em linhas gerais, a taxtomina nas concentrações de 50 e 100 µg demonstrou potencial de aplicação no patossistema citros - *P. nicotianae*. Quando avaliada a mortalidade de plantas inoculadas com o patógeno e tratadas com a taxtomina A, bem como, quando quantificado o DNA do oomiceto no sistema radicular, as referidas concentrações também apresentaram os melhores desempenhos.

Como avaliou-se apenas os teores de proteínas e a atividade da β -1,3-glucanase quando do tratamento de plantas de tangerina 'Sunki' com taxtomina A e inoculação com o patógeno, outras enzimas podem ter apresentado incrementos na atividade, devendo ser objeto de estudos mais detalhados, especialmente, nas concentrações de 50 e 100 µg de taxtomina. Outro indício de que taxtomina ativa o sistema de defesa da planta, refere-se ao incremento nos teores de proteínas em plantas tratadas com taxtomina e não inoculadas com o oomiceto, tanto em raízes quanto em folhas. Outro aspecto a ser considerado, possivelmente, seja a necessidade de algum ajuste na forma de aplicação e/ou, no caso de uso comercial, o uso de substâncias inertes que potencializem a atividade indutora de resistência da taxtomina em citros.

Wilson et al. (2009) buscaram investigar o uso da taxtomina A como agente para a seleção de células somáticas de batata com aumento nos níveis de resistência a sarna comum da batata. Os autores observaram expressão diferencial da tolerância a taxtomina A nos diferentes tecidos, uma vez que foram observadas variações nos níveis de necrose em folíolos e tubérculos. Quando utilizados tubérculos nos ensaios de patogenicidade em casa de vegetação, 13 das 39 variantes regeneradas exibiram resistência significativamente maior à sarna comum quando comparadas às cultivares parentais não selecionadas. A resistência foi expressa tanto na superfície média do tubérculo coberta com lesões quanto na proporção de tubérculos livres de doença. A melhor variante apresentou, em média, 85 a 86% menor nível de doença e 71 a 69% menos proporção de tubérculos infectados do que o cultivar parental não selecionada. Por outro lado, no ensaio com folíolos apenas quatro das 13 variantes testadas apresentaram, significativamente, menos necrose do que o parental, enquanto que no ensaio com fatias de tubérculo, apenas uma. Segundo os autores, a tolerância a taxtomina A não é necessariamente o fator determinante para a indução de resistência a doenças.

Por sua vez, estimativas de rendimento de batatas cultivadas em casa de vegetação demonstraram que a seleção para resistência a doenças não foi associada a atributos negativos de produção dos tubérculos. Oito das 13 variantes resistentes a doenças tiveram rendimentos de tubérculos equivalentes ao cultivar parental. Assim, as variantes selecionadas podem apresentar potencial para testes futuros e uso comercial (WILSON et al., 2009).

Contudo, o papel que a taxtomina possui na expressão da resistência nas variantes regeneradas selecionadas não é claro. Scheible et al. (2003) observaram que, em concentrações de nmols, taxtomina causou intumescimento celular, reduziu o crescimento de plântulas e afetou a síntese de celulose em *Arabidopsis*. Neste processo, um mutante identificado como *txr1* demonstrou aumento na resistência a taxtomina devido à redução na absorção da toxina. Segundo os autores, o gene *txr1* codifica para uma pequena proteína de função desconhecida, possivelmente, sendo o gene regulador de algum mecanismo de transporte. Os autores ainda mencionam a possibilidade de determinar se a resistência genética a sarna comum da batata é relacionada a atividade do gene *txr1*.

Além da taxtomina A, *Streptomyces* spp. é capaz de produzir outros metabólitos com efeitos benéficos no controle de patógenos. Vernekar, Ghatge e Deshpande (1999) observaram que uma espécie de *Streptomyces*, produtora de um inibidor de protease alcalino, exibiu atividade antifúngica *in vitro* contra *Fusarium*, *Alternaria*, *Rhizoctonia* e *Trichoderma*, estando essa inibição, aparentemente, associada com a habilidade de inibir serino proteases alcalinas dos fungos, indispensáveis para seu crescimento. Os autores também observaram atraso na germinação e no crescimento de hifas na presença do inibidor de proteases alcalino, evidenciando o potencial do mesmo como agente de controle biológico contra fungos fitopatogênicos.

O indutor de defesa vegetal Bion[®] incrementou a atividade da β -1,3-glucanase, na ausência do patógeno, em folhas de tangerina 'Sunki'. Apesar de não haver diferença estatística, o indutor demonstrou ainda tendência de aumento no teor de proteínas na raiz, na ausência do patógeno, e na atividade da β -1,3-glucanase na raiz, na presença no patógeno. Apesar de atualmente o indutor comercial Bion[®] ter sua comercialização reduzida e seu uso como indutor em questionamento por alguns pesquisadores, a literatura demonstra exemplos de

potencial de uso do mesmo no controle de doenças (SILVA et al., 2002; AGNELLI, 2011; SANTOS, 2013).

Outro ponto que merece destaque refere-se a baixa mortalidade de plântulas nos ensaios. Os dados obtidos pelo grupo de pesquisa alemão demonstram mortalidade das plântulas de faia infectadas com *Phytophthora* sp. entre seis e 10 dias após a inoculação (FLEISCHMANN et al., 2005; WATTHANAKARNKITIKUN, 2012; DALIO et al., 2014). No entanto, no presente trabalho a mortalidade não foi elevada, possivelmente, em função da influência de algum fator externo na infecção do patógeno, visto que foi realizado o reisolamento de *P. plurivora* no início dos ensaios. No caso de *P. nicotianae*, realizou-se periodicamente o reisolamento do patógeno em frutos de laranja. No entanto, conforme observado também por Rezende (2014), a mortalidade foi baixa nos ensaios. Possivelmente, o isolado não seja o mais agressivo ou, haja alguma variação genética dentro das plântulas de tangerina ‘Sunki’, apesar da espécie ser suscetível.

2.5 Conclusões

Taxtomina A, produzida por *Streptomyces scabies*, não exibe efeito direto sobre o micélio e zoósporos de *Phytophthora plurivora* e *P. nicotianae*.

Em plântulas de faia, a taxtomina A, aplicada via sistema radicular nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 µg, induz suscetibilidade à podridão radicular causada por *Phytophthora plurivora*.

Em plântulas de citros, a taxtomina A, aplicada via sistema radicular nas concentrações de 50 e 100 µg apresenta potencial para a proteção de plântulas de citros da podridão radicular causada por *Phytophthora nicotianae*.

O indutor comercial Bion[®] incrementa o teor de proteínas e a atividade da enzima β-1,3-glucanase em plântulas de tangerina ‘Sunki’, apresentando potencial em estudos futuros no patossistema *Phytophthora nicotianae* – citros.

Referências

AGRIOS, G. **Plant pathology**. San Diego: Elsevier; Academic Press, 2005. 922 p.

AGNELLI, A.R. **Potencial de agentes indutores de resistência para o controle da bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* em plantas cítricas**. 44 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Fundo de Defesa da Citricultura, Araraquara, 2011.

AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 21 out. 2015.

ALVES, P.R.B.; MELO, B. **Cultura dos citros**. Disponível em: <<http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/citros>>. Acesso em: 23 jul. 2010.

ARAÚJO, J.R.G. **Caracterização química, bioquímica e horticultural de microtangerinas (*Citrus spp.*), de valor potencial como porta-enxertos**. 1998. 155 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 1998.

AVER'YANOV, A.A.; LAPIKOVA, V.P.; LEBRUN, M.-H. Tenuazonic acid, toxin of rice blast fungus, induces disease resistance and reactive oxygen production in plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 54, n. 6, p. 749–754, 2007.

BEDENDO, I.P.; MASSOJA JR, N.S.; AMORIM, L. Controles cultural, físico e biológico de doenças de plantas. AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. cap. 17, p. 367-388.

BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: _____. (Org.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa, Centro Nacional de Pesquisa de Defesa da Agricultura, 1991. cap. 1, p. 1-3.

BÖHM, J.; HAHN, A.; SCHUBERT, R.; BAHNWEG, G.; ADLER, N.; NECHWATAL, J.; OEHLMANN, R.; OSSZWALD, W. Real-time quantitative PCR: DNA determination in isolated spores of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and monitoring of *Phytophthora infestans* and *Phytophthora citricola* in their respective host plants. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 147, p. 409–416, 1999.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

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

CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA - CEPEA. **Hortifruti Brasil: especial citros**. Piracicaba: USP, CEPEA, 2015. Disponível em: <http://cepea.esalq.usp.br/hfbrasil/edicoes/145/mat_capa.pdf>. Acesso em: 08 ago. 2015.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C.; BARKA, E.A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 9, p. 4951–4959, 2005.

COOK, R.J.; BAKKER, K.F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1983. 615 p.

DART, N.L.; CHASTANGER, G.A. **High recovery rate of *Phytophthora* from containerized nursery stock pots at a retail nursery highlights potential for spreading exotic Oomycetes**. 2007. Disponível em: <<https://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/brief/2007/pots/>>. Acesso em: 15 dez. 2014.

DALIO, R.J.D.; FLEISCHMANN, F.; HUMEZ, M.; OSSWALD, W. Phosphite protects *Fagus sylvatica* seedlings towards *Phytophthora plurivora* via local toxicity, priming and facilitation of pathogen recognition. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2014.

DOUBRAVA, N.S.; DEAN, R.A.; KUC J. Induction of systemic resistance to anthracnose caused by *Colletotrichum lagenarium* in cucumber by oxalate and extracts from spinach and rhubarb leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 33, p. 69-79, 1988.

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

FELLOWS, H. Relation of growth in the potato tuber to the potato scab disease. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 32, p. 757-781, 1926.

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

FLIEGMANN, J.; SCHULER, G.; BOLAND, W.; EBEL, J.; MITHOFER, A. The role of octadecanoids and functional mimics in soybean defense responses. **Biological Chemistry**, Berlin, v. 384, p. 437-446, 2003.

FRY, B.A.; LORIA, R. Thaxtomin A: evidence for a plant cell wall target. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 60, p. 1-8, 2002.

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA - FUNDECITRUS. Araraquara, 2008. Disponível em: <<http://fundecitrus.com.br/doencas>>. Acesso em: 20 mar. 2009.

_____. Araraquara, 2015. Disponível em: <<http://www.canalrural.com.br/noticias/citrus/fundecitrus-estima-safra-278993-milhoes-caixas-laranja-cinturao-citricola-56544>>. Acesso em: 31 ago. 2015.

GARCIA E.O. **Resistência de cultivares de batata (*Solanum tuberosum*) à sarna comum (*Streptomyces* spp.) e mecanismo de ação da fitotoxina taxtamina A em sorgo (*Sorghum bicolor*): aspectos bioquímicos e ultraestruturais**. 2008. 92 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

GARCIA, E.O.; PASCHOLATI, S.F. Efeitos ultraestruturais e bioquímicos da taxtamina A em sorgo. **Summa Phytopatologica**, Jaguariúna, v. 34, p. 56, 2008.

- GARCIA, E.O.; BIAZOTTO, F.O.; PASCHOLATI, S.F. Taxtomina A: efeito protetor em plantas de pepino contra antracnose. **Summa Phytopatologica**, Jaguariúna, v. 34. p. 56, 2008.
- GARCIA, E.O.; PASCHOLATI, S.F.; ALMEIDA, M. Potencial eliciador de fitoalexinas e mecanismos de ação da fitotoxina taxtomina A em sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 246, 2007.
- GARCIA, E.O.; PASCHOLATI, S.F.; CASELA, C.R.; FIALHO, M.B. Fitotoxina taxtomina A (*Streptomyces* spp): efeito *in vitro* e indução de resistência em plantas de sorgo contra *Colletotrichum sublineolum*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, p. 191, 2008.
- GARCIA, E.O.; PASCHOLATI, S.F.; MACAGNAN, D.; FISCHER, I.H. Reação de cultivares de batata a fitotoxina Taxtomina A. **Summa Phytopatologica**, Jaguariúna, v. 33, p. 56, 2007a.
- GARCIA, E.O.; FISCHER, I.H.; MACAGNAN, D.; PASCHOLATI, S.F.; ALMEIDA, I.M.G.; BERIAM, L.O.S. Resistência de cultivares de batata a isolados de *Streptomyces* com diferentes níveis de produção de taxtomina A. **Summa Phytopatologica**, Jaguariúna, v. 33, p. 56, 2007b.
- GENTY, B.; BRIANTAIS, J.M.; BAKER, N.R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 990, p. 87-92, 1989.
- GOYER, C.; VACHON, J.; BEAULIEU, C. Pathogenicity of *Streptomyces scabies* mutants altered in thaxtomin A production. **Phytopathology**, Lancaster, v. 88, p. 442-445, 1998.
- GUPTA, N.S.; BANERJEE, M.; BASU, S.K.; ACHARYA, K. Involvement of nitric oxide signal in *Alternaria alternata* toxin induced defense response in *Rauvolfia serpentina* Benth. ex Kurz Calli. **Plant Omics**, Lismore, v. 6, n. 3, p. 157-164, 2013.
- HAAS, D.; DÉFAGO, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, p. 307-319, 2005.
- HEIL, M.; BOSTOCK, R.M. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defenses. **Annals of Botany**, London, v. 89, p. 503-512, 2002.
- IPPOLITO, A.; SCHENA, L.; NIGRO, F. Detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. citrophthora* in citrus roots and soils by nested PCR. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, p. 855-868, 2002.
- IVORS, K.; GARBELOTTO, M.; VRIES, D.E.; RUYTER-SPIRA, C.; HEKKERT, B.; ROSENZWEIG, N.; BONANTS, P. Microsatellite markers identify three lineages of *Phytophthora ramorum* in US nurseries, yet single lineages in US forest and European nursery populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 15, p. 1493-1505, 2006.

JUNG, T. Beech decline in Central Europe driven by the interaction between *Phytophthora* infections and climatic extremes. **Forest Pathology**, Hamburg, v. 39, n. 2, p. 73–94, 2009.

JUNG, T.; BURGESS, T.I. Re-evaluation of *Phytophthora citricola* isolates from multiple woody hosts in Europe and North America reveals a new species, *Phytophthora plurivora* sp. nov. **Persoonia**, Leiden, v. 22, p. 95-110, 2009.

JUNG, T.; BLASCHKE, M. *Phytophthora* root and collar rot of alders in Bavaria: distribution, modes of spread and possible management strategies. **Plant Pathology**, London, v. 53, p. 197-208, 2004.

JUNG, T.; BLASCHKE, H.; NEUMANN, P. Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. **European Journal of Forest Pathology**, Hamburg, v. 26, p. 253-272, 1996.

KERR, A.; HTAY, K. Biological control of crown gall through bacteriocin production. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 4, n. 1, p. 37-44, 1974.

KING, R.R.; LAWRENCE, C.H. Characterization of new thaxtomin A analogues generated *in vitro* by *Streptomyces scabies*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 44, p. 1108-1110, 1996.

KING, R.R.; LAWRENCE, C.H.; CLARK, M.C.; CALHOUN, L.A. isolation and characterization of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies*. **Chemical Community**, Ottawa, v. 13, p. 849-850, 1989.

KOMBRINK, E.; HAHLBROCK, K. Response of cultured parsley cells to elicitors from phytopathogenic fungi: timing and dose dependency of elicitor-induced reactions. **Plant Physiology**, Washington, v. 81, n. 1, p. 216-221, 1986.

KUPPER, K.C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 251-257, 2003.

LEINER, R.H.; FRY, B.A.; CARLING, D.E.; LORIA, R. Probable involvement of thaxtomin A in pathogenicity of *Streptomyces scabies* on seedlings. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, p. 709-713, 1996.

LORIA, R.; KERS, J.; JOSHI, M. Evolution of plant pathogenicity in *Streptomyces*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p. 469–487, 2006.

LORIA, R.; CLARK, C.A.; BUKHALID, R.A.; FRY, B.A. Gram-positive bacteria: *Streptomyces*. In: SCHAAD, N.W.; JONES, J.B.; CHUN, W. (Ed.). **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 2001. p. 236-249.

LORIA, R.; BIGNELL, D.R.D.; MOLL, S.; HUGUET-TAPIA, J.C.; JOSHI, M.V.; JOHNSON, E.G.; SEIPKE, R.F.; GIBSON, D.M. Thaxtomin biosynthesis: the path to plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Netherlands, v. 94, p. 3–10, 2008.

MAURHOFER, M.; HASE, C.; MEUWLY, P.; MÉTRAUX, J.-P.; DÉFAGO, G. Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: Influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, p. 139-146, 1994.

MAZARO, S.M.; CITADIN, I.; GOUVÊA, A.; LUCKMANN, D.; GUIMARÃES, S.S. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de Pitangueira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, p.1824-1829, 2008.

MEDEIROS, R.B.; FERREIRA, M.A.S.V.; DIANESE, J.C. **Mecanismos de agressão e defesa nas interações planta-patógeno**. Brasília: Editora UNB, 2003. 289 p.

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

NATSUNAME, M.; KOMIYA, M.; KOYANAGI, F.; TASHIRO, N.; KAWAIDE, H.; ABE, H. Phytotoxin produced by *Streptomyces* spp. causing potato russet scab in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, Berlin, v. 71, p. 364-369, 2005.

PASCHOLATI, S.F.; BLUMER, S.; REZENDE, D.C.; BRAND, S.C. Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) x Resistência Sistêmica Induzida (ISR). In: UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. Núcleo de Estudos em Fitopatologia (Org.). **Indução de resistência: novos conceitos e aplicações**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2010. p. 29-40.

PASCHOLATI, S.F. Fisiologia do Parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. cap. 35, p. 593-636.

PIETERSE, C.M.; VAN WEES, S.C.; HOFFLAND, E.; VAN PELT, J.A.; VAN LOON, L.C. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 8, p. 1225-37, 1996.

PIETERSE, C.M.; VAN WEES, S.C.; VAN PELT, J.A.; KNOESTER, M.; LAAN, R.; GERRITS, H.; WEISBEEK, P.J.; VAN LOON, L.C. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, Rockville, v. 10, n. 9, p.1571-80, 1998.

REZENDE, D.C. **Fosfito de potássio no controle de *Phytophthora* spp. em citros e faia e seu modo de ação**. 2014. 108 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

ROMA, R.C.C. **Uso de taxtamina A produzida por *Streptomyces scabies* e *Piriformospora indica* para controle de *Phytophthora plurivora* em faia (*Fagus sylvatica*)**. Piracicaba: ESALQ, 2012. 64 p. Relatório enviado à Capes referente a bolsa de Doutorado Sanduíche CAPES/DAAD - PROBRAL 373/12.

_____. **Fosfito de potássio no controle de doenças pós-colheita em bagas de uva 'Itália' e possíveis mecanismos de ação à *Rhizopus stolonifer***. 2013. 117 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

SANTOS, P.H.D. **Produtos alternativos no controle de doenças fúngicas em folha e fruto de mamoeiro**. 76f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2013.

SAYRE, R.M.; WERGIN, W.P.; SCHMIDT, J.M.; STARR, M.P. *Pasteuria nishizawae* sp. nov., a mycelial and endospore-forming bacterium parasitic on cyst nematodes of genera *Heterodera* and *Globodera*. **Research in Microbiology**, Paris, v. 142, n. 5, p. 551–564, 1991.

SCHEFFER, R.P. Toxins as chemical determinants of plant disease. In: DALY, J.M.; DEVERALL, B.J. (Ed.). **Toxins and plant pathogenesis**. Sidney: Academic Press, 1983. chap. 1, p. 1-40.

SCHEIBLE, W.R.; FRY, B.; KOCHVENKO, A.; SCHINDELASCH, D.; ZIMMERLI, L.; SOMERVILLE, S.; LORIA, R.; SOMERVILLE, C.R. An *Arabidopsis* mutant resistant to thaxtomin A, a cellulose synthesis inhibitor from *Streptomyces species*. **Plant Cell**, Rockville, v. 15, p. 1781-1794, 2003.

SCHLINK, K. Down-regulation of defense genes and resource allocation into infected roots as factors for compatibility between *Fagus sylvatica* and *Phytophthora citricola*. **Functional & Integrative Genomics**, Berlin, v. 10, p. 253-264, 2010.

SILVA, E.C.; MARACAJÁ, R.S.JR.; MARACAJÁ, P.B.; SILVA, G.F.; COSTA, F.M.; MARINHO, R.E.M. Utilização de indutor de resistência à mancha aquosa em plantas de meloeiro. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.15, p. 39-42, 2002.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 235-70, 1997.

SUN, C.; SHAO, Y.; VAHABI, K.; LU, J.; BHATTACHARYA, S.; DONG, S.; YEH, K-W.; SHERAMETI, I.; LOU, B.; BALDWIN, I.T.; OELMÜLLER, R. The beneficial fungus *Piriformospora indica* protects *Arabidopsis* from *Verticillium dahlia* infection by downregulation plant defense responses. **BMC Plant Biology**, London, v. 14, n. 268, p. 1-16, 2014.

TIAN, B.; YANG, J.; ZHANG, K.Q. Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 61, n. 2, p. 197-213, 2007.

TOAL, E.S.; JONES, P.W. Induction of systemic resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* by oxalic acid in oilseed rape. **Plant Pathology**, London, v. 48, p. 759–767, 1999.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (São Paulo). Garcia, E.O.; Pascholati, S.F. **Composição contendo fitotoxinas obtidas a partir de *Streptomyces* spp. e seu uso como eliciador na indução de resistência em plantas**. PI0802664-5 A2. 13 ago. 2008. Revista da Propriedade Industrial. São Paulo, n. 2053, p. 65, 2010.

USDA - United States Department of Agriculture. Citrus: World Markets and Trade. 2006. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2016.

VALLAD, G.E.; GOODMAN, R.M. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. **Crop Science**, Madison, v. 44, p. 1920-1934, 2004.

VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.A.; PIETERSE, C.M. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 453-83, 1998.

VERNEKAR, J.V.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Alkaline protease inhibitor: a novel class of antifungal proteins against phytopathogenic fungi. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 262, n. 3, p. 702-707.1999.

WALLER, F.; ACHATZ, B.; DESHMUKH, S.; BALTRUSCHAT, H.; KOHEL, K.H. Induction of systemic resistance by the root endophytic fungus *Piriformospora indica* in barley. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 47, p. 48, 2006.

WALTERS, D.R.; RATSEP, J.; HAVIS, N.D. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 64, n. 5, p. 1263-1280, 2015.

WATTHANAKARNKITIKUN, A. **Effects of the endophytic fungus *Piriformospora indica* on the susceptible interaction between Beech (*Fungus sylvatica*) and *Phytophthora plurivora***. 2012. 71 p. Thesis (Master) - Technische Universität München, Freising, 2012.

WILSON, C.R.; LUCKMAN, G.A.; TEGG, R.S.; YUAN, Z.Q.; WILSON, A.J.; EYLES, A.; CONNER, A.J. Enhanced resistance to common scab of potato through somatic cell selection in cv. Iwa with the phytotoxin thaxtomin A. **Plant Pathology**, London, v. 58, p. 137-144, 2009.

YANG, F-Z.; LI, L.; YANG, B. *Alternaria* toxin-induced resistance against rose aphids and olfactory response of aphids to toxin-induced volatiles of rose plants. **Journal of Zhejiang University**, Hangzhou, v. 13, n. 2, p. 126-135, 2012.

YULIAR; NION, Y.A.; TOYOTA, K. Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. **Microbes and Environments**, Tokyo, v. 30, n. 1, p. 1-11, 2015.

ZHANG, H.; ZHANG, X.; MAO, B.; LI, Q.; HE, Z. Alpha-picolinic acid, a fungal toxin and mammal apoptosis-inducing agent, elicits hypersensitive-like response and enhances disease resistance in rice. **Cell Research**, New York, v. 14, p. 27-33, 2004.

Apêndices

Apêndice A – Meio V8-ágar para isolamento de *Phytophthora plurivora*

Ingrediente	Quantidade
Ágar	16 g
Carbonato de Cálcio	3 g
Suco de vegetais	100 mL
Água destilada	Até completar 1.000 mL

Apêndice B - Meio PRNAH – V8 ágar para isolamento de *Phytophthora plurivora* (JUNG; BLASCHKE; NEUMANN, 1996)

Ingrediente	Quantidade	Procedimento
Ágar	16 g	Autoclavar separadamente
Carbonato de Cálcio	3 g	
Suco de vegetais	100 mL	
Água destilada	650 mL	
PCNB	0,01g	Diluir em pequena quantidade de etanol 80% e, em seguida, adicionar 100 mL de água destilada autoclavada
Piramicina	0,50 mL	
Ampicilina	0,25 g	
Rifampicina	0,10 g	
Hymexazol	0,05 g	100 mL de água destilada autoclavada
Nistatina	0,05 mL	50 mL de água destilada autoclavada

3 *Piriformospora indica* NO CONTROLE DE *Phytophthora* spp. EM PLÂNTULAS DE FAIA (*Fagus sylvatica*) E CITROS (*Citrus sunki*)

Resumo

Espécies de *Phytophthora* tem sido problema crescente em plantas anuais e perenes, sendo seu controle difícil após a instalação da doença no campo. A produção de mudas cujo sistema radicular seja colonizado por um agente de controle biológico ou indutor de resistência pode se apresentar como uma alternativa no manejo de doenças causadas por este grupo de patógenos radiculares. *Piriformospora indica*, um endofítico radicular apresenta potencial para emprego nesta situação. Dessa forma, objetivou-se investigar se o fungo endofítico *P. indica* é capaz de controlar os patógenos radiculares *Phytophthora plurivora* em plântulas de faia e *P. nicotianae* em plântulas de citros. O indutor de defesa vegetal Bion[®] foi utilizado em alguns ensaios para fins de comparação. No primeiro experimento, plântulas de faia inoculadas com *P. indica* há um ano, foram analisadas por PCR e microscopia de luz para se detectar a presença do endofítico radicular. *P. indica* não foi detectada por PCR em plântulas de faia, porém as análises histológicas mostraram estruturas semelhantes às descritas para *P. indica* na literatura, o que não foi confirmado por sequenciamento genético. Em outro ensaio, plântulas de faia inoculadas com *P. indica* apresentaram sintomas nas folhas antes da inoculação com *P. plurivora*, podendo os sintomas estarem relacionados à deficiência e/ou toxidez nutricional ou ao fato de *P. indica* atuar como parasita em determinadas situações. Quando plântulas de citros foram inoculadas com *P. indica* e depois com *P. nicotianae*, não foi observada promoção de crescimento e nem redução na quantidade de DNA do patógeno no sistema radicular. As análises histológicas e moleculares permitiram a detecção do endofítico no sistema radicular de plântulas cítricas. Análises bioquímicas revelaram apenas aumentos pontuais no teor de proteínas e na atividade das enzimas β -1,3-glucanase e guaiacol peroxidase no tratamento com *P. indica* + *P. nicotianae*, enquanto os genes *PR-1.4*, *PR-1.8*, *PR- β -glucosidase* e *Hsp70* foram induzidos em plântulas inoculadas com *P. indica* e desafiadas com o patógeno. Os referidos genes também tiveram sua expressão aumentada em plantas tratadas com o indutor comercial Bion[®] e inoculadas com *P. nicotianae*, porém em menor magnitude. *P. indica* não apresentou efeito direto sobre *P. nicotianae*. O endofítico *P. indica* apresenta potencial de uso para o controle de doenças não sendo, no entanto, efetivo na interação citros - *Phytophthora nicotianae*.

Palavras-chave: Endofítico; Controle biológico; Podridão radicular; Acibenzolar-S-metílico

Abstract

Phytophthora species are problems in annual and perennial plants, and it is very difficult to control them after the onset of the disease in the field. Thus, the production of seedlings whose root systems can be colonized by a biological control agent or a biotic resistance inducer may be an alternative in the management of diseases caused by this group of root pathogens. The fungus *Piriformospora indica*, a root endophyte, has potential for use in this situation. The present work aimed to investigate whether *P. indica* is able of inducing resistance against the root pathogen

Phytophthora plurivora on beech seedlings and *Phytophthora nicotianae* on citrus seedlings. The plant defense inducer Bion[®] was used in some tests for comparison. In the first experiment, beech seedlings inoculated with *P. indica* a year ago were analyzed by PCR and microscopy to detect the presence of the root endophyte. The fungus was not detected by PCR in beech plants but histological analysis showed structures similar to those described for *P. indica* in literature, which was not confirmed by genetic sequencing. In another assay, beech seedlings inoculated with *P. indica* exhibited symptoms on the leaves prior to inoculation with *P. plurivora*. These symptoms could be related to nutritional deficiency and/or toxicity or because *P. indica* can act as parasite in certain situations. When citrus seedlings were inoculated with *P. indica* and then with *P. nicotianae*, no growth promotion and reduction in the quantities of pathogen DNA in the root system were observed. Histological and molecular analyzes allowed the detection of the endophyte in the root of citrus seedlings. Biochemical analyzes revealed only occasional increases in protein content and the activities of β -1,3-glucanase and peroxidase in the treatment with *P. indica* + *P. nicotianae* while the genes *PR-1.4*, *PR 1.8*, *PR- β -glucosidase* and *Hsp70* were induced in those plants. These genes also increased in plants treated with the commercial resistance inducer Bion[®] and inoculated with *P. nicotianae*, but at a lower magnitude. *P. indica* showed no direct effect on *P. nicotianae*. Finally, the endophyte *P. indica* presents potential for disease control, however it is not effective in the interaction citrus – *P. nicotianae*.

Keywords: Endophyte; Biological control; Root rot; Acibenzolar-S-methyl

3.1 Revisão Bibliográfica

Os itens Citricultura Brasileira (2.1.1), *Phytophthora* em citros no Brasil (2.1.2), *Phytophthora* em faia na Alemanha (2.1.3), Indução de Resistência (2.1.4), e Controle Biológico (2.1.5) foram abordados na revisão bibliográfica do capítulo 2, envolvendo Taxtomina A. A revisão do item 3.1 irá abordar apenas *Piriformospora indica*.

3.1.1 *Piriformospora indica*

3.1.1.1 Aspectos gerais

Microrganismos presentes na rizosfera de plantas podem atuar tanto como parasitas, causando doenças, quanto benéficamente, melhorando o desempenho fisiológico das plantas. *Piriformospora indica* é um basidiomiceto pertencente à ordem Sebaciales relatado pela primeira vez em 1997 no deserto de Thar na Índia, como contaminante de *Glomus mosseae* isolado de algaroba (*Prosopis juliflora*) e *Zizyphus nummularia* (VERMA et al., 1998). O termo “*Piriformospora*” é originário do latim *Piriformis* (em forma de pera) e *spora* (esporo), fazendo menção ao clamidósporo, estrutura reprodutiva produzida no ápice das hifas de *Piriformospora indica* (VERMA et al., 1998).

Piriformospora indica pode ser facilmente propagada em larga escala em cultura pura na ausência de planta hospedeira, além de exibir propriedades biológicas peculiares quando em associação com plantas, o que torna este endofítico interessante como ferramenta para a agricultura sustentável (WALLER et al., 2005).

3.1.1.2 Colonização do sistema radicular

O processo de colonização do sistema radicular por *P. indica* envolve um “antagonismo balanceado”, ou seja, um equilíbrio entre os fatores de virulência do endofítico e as respostas de defesa da planta (SCHULZ, BOYLE, 2005).

Jacobs e colaboradores (2011) descrevem com detalhes a colonização do tecido vegetal pelo endofítico demonstrando um processo semelhante ao que ocorre em fitopatógenos, com o envolvimento de jasmonato, giberelina e proteínas DELLA. Proteínas DELLA são repressoras da ação da giberelina (PARK et al., 2013). O modelo de colonização por *P. indica*, proposto por Jacobs et al. (2011), é constituído de quatro fases consecutivas (Figura 1): (1) colonização extracelular da superfície da raiz (aproximadamente 1 dia após a inoculação - dai); (2) fase biotrófica (menos de 3 dai), quando hifas colonizam células vivas da rizoderme e córtex; (3) fase de colonização associada a morte celular (mais de 3 dai); (4) reprodução fúngica através da esporulação extracelular (cerca de 7 dai) e intracelular (cerca de 14 dai). Em cevada, Deshmukh et al. (2006) observaram a necessidade de morte celular para a colonização de raízes por *P. indica*. A partir de DNA de raízes de trigo inoculadas, *P. indica* foi identificada sete dias após a inoculação permanecendo detectável por um período superior a três meses (SERFLING et al., 2007).

Com relação aos eventos bioquímicos e fisiológicos, Jacobs et al. (2011) descrevem que a imunidade desencadeada por MAMPs - Padrões Moleculares Associados a Microrganismos - (MTI – Imunidade desencadeada por MAMPs) restringe a colonização da raiz por *P. indica* desde o início até os estádios de interação mais avançados. O fungo realiza a colonização biotrófica das raízes pela supressão da MTI inicial. A defesa mediada via ácido salicílico (SA) e glucosinolatos indólicos antimicrobianos (IGS) participam da MTI. *P. indica* recruta jasmonato (JA) para suprimir a explosão oxidativa na raiz. Como indicado por estudos com mutantes e perfis de expressão de genes, SA e IGS podem desempenhar papel dominante em fases posteriores de colonização, em que *P. indica* pode recrutar a via de sinalização

do JA e outras vias ainda não definidas para combater a MTI suportada via SA. *P. indica* ainda pode induzir sinalização via giberelina (GA), visando à degradação de proteínas DELLA, elevando os limites pró-apoptóticos nas células das raízes e iniciando a colonização associada à morte celular.

Figura 1 - Modelo do padrão de colonização espaço-temporal de raízes de *Arabidopsis*. A colonização de raízes por *P. indica* pode ser dividida em quatro fases. Após a germinação dos esporos e crescimento extracelular, hifas penetram nas células epidérmicas ou corticais e estabelecem uma fase inicial de colonização biotrófica. O estágio biotrófico pode ser precedido por colonização intercelular. As fases biotróficas inicial e tardia são caracterizadas por completa integridade das organelas celulares (por exemplo, núcleo – em cor azul) e invaginação da membrana plasmática (linhas cinza escuras no interior das células). Células colonizadas biotróficamente morrem (preenchimento cinza claro de células) durante subsequente colonização associada à morte celular. A morte da célula hospedeira é indicada por ruptura das organelas, enquanto que a membrana plasmática (linhas cinza escuras no interior das células) ainda circunda hifas intracelulares. A esporulação intracelular ocorre em células epidérmicas e corticais, aproximadamente, 14 dias após a inoculação (dai). As células da endoderme (em cor marrom) não são colonizadas. CC - Cilindro central; E - endoderme; C - córtex; RC - células da rizoderme; ROS - espécies reativas de oxigênio; MTI - imunidade desencadeada por MAMPs; AS – ácido salicílico; JA - ácido jasmônico; GA – giberelina; IGS - glucosinolatos indólicos antimicrobianos; DELLA – proteínas DELLA. Modificado de Jacobs et al. (2011)

3.1.1.3 Potencial indutor de resistência

A capacidade de controle de doenças por esse fungo endofítico radicular já foi descrita em diferentes patossistemas como cevada – *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*,

Fusarium culmorum e *Cochliobolus sativus* (WALLER et al., 2005), milho – *F. verticillioides* (KUMAR et al., 2009), Arabidopsis - *Golovinomyces orontii* (STEIN et al., 2008), trigo - *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, *Fusarium culmorum* e *Pseudocercospora herpotrichoides* (SERFLING et al., 2007), tomateiro - *Pepino mosaic virus* e *Verticillium dahliae* (FAKHRO et al., 2010), dentre outros.

A proteção contra doenças resultante da colonização por *P. indica* parece estar primariamente relacionada ao aumento na capacidade antioxidante, bem como à ativação de genes relacionados a processos de defesa, culminando na Resistência Sistêmica Induzida (ISR). Enzimas antioxidantes são relatadas como associadas à redução do desenvolvimento de *Fusarium verticillioides* em plantas de milho inoculadas com o endofítico (KUMAR et al., 2009) e de *Fusarium culmorum* e *Cochliobolus sativus* em plantas de trigo inoculadas com *P. indica* (WALLER et al., 2005). Além disso, vários genes relacionados à respostas de defesa foram ativados, como a proteína relacionada a patogênese de cevada (*Hordeum vulgare*) *HvPR-17b* e a chaperona molecular *HvHsp70* contra *B. graminis* f. sp. *hordei* (WALLER et al., 2008), bem como *PR-1*, *PR-2*, *PR-5*, *BCI-7* (“Barley chemically induced 7”) e *Hsp70* (“Heat shock protein 70”) nesse mesmo patossistema (MOLITOR et al., 2011) e *PR-1*, *PR-5*, *ERF1* (“Ethylene response factor 1”), *PDF1.2* (“Plant defensin 1.2”) e *LOX2* (“lipoxigenase 2”) em *Arabidopsis* contra *Golovinomyces orontii* (STEIN et al., 2008). A maior parte dos trabalhos foi conduzida com *Arabidopsis* e cevada, duas plantas modelo no estudo com o endofítico.

Apesar da produção de PR-proteínas não ser característica da ISR (PASCHOLATI et al., 2010; PIETERSE et al., 1996), em alguns casos, a ISR desencadeada por raças de PGPRs, está ligada a produção de sideróforos ou ácido salicílico por essas rizobactérias apresentando, portanto, características em comum com a SAR (DE MEYER; HOFTE, 1997). Maurhofer e colaboradores (1994), por exemplo, descrevem o acúmulo de PR-proteínas em resposta a colonização de plantas de fumo por *Pseudomonas fluorescens*, uma PGPR.

O efeito benéfico no status de defesa da planta é detectado em folhas, demonstrando a indução de resistência sistêmica por este fungo endofítico de raízes (WALLER et al., 2005). O endofítico radicular *P. indica* não coloniza folhas, requerendo, portanto, uma resposta sistêmica para proteção contra um patógeno foliar. No patossistema *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (*Bgh*) - cevada, os autores verificaram redução na infecção em plantas colonizadas com *P. indica*. Através de

análises de microscopia, verificaram alta frequência de reação de hipersensibilidade, bem como defesa associada a parede celular, confirmando que *Bgh* foi inibida por uma resposta ativa da planta, impedindo o estabelecimento dos seus órgãos de nutrição, os haustórios. Estes dados, aliados ao aumento na capacidade antioxidante, demonstram que a redução na doença é resultado da indução de resistência sistêmica (WALLER et al., 2005).

3.1.1.4 Promoção de crescimento

O endofítico radicular *P. indica* apresenta atividade promotora de crescimento, aumento da biomassa e/ou produtividade (WALLER et al., 2005; KUMAR et al., 2011; BAGDE; PRASAD; VARMA, 2011; FAKHRO et al., 2010; SHERAMETI et al., 2008) e promove tolerância a estresse salino (WALLER et al., 2005; BALTRUSCHAT et al., 2008) e hídrico em plantas colonizadas por esse fungo (SUN et al., 2010; SHERAMETI et al., 2008). A tolerância ao estresse salino parece estar associada, pelo menos em parte, a um aumento na capacidade antioxidante na planta resultante da colonização com o endofítico (BALTRUSCHAT et al., 2008).

P. indica parece mediar a absorção de fósforo, por meio da liberação de fosfatases, deixando-o disponível para as plantas, bem como nitrogênio do solo (SHERAMETI et al., 2005; KUMAR et al., 2011), sendo esta, possivelmente, uma das razões para o aumento de biomassa em plantas colonizadas. Além disso, a promoção de crescimento pode estar associada à liberação de ácido indolacético (AIA) (SIRRENBORG et al., 2007).

Outro aspecto que pode explicar, pelo menos em parte, a capacidade de *P. indica* atuar na promoção de crescimento e tolerância a estresses é sua associação com uma bactéria. O fungo *P. indica* pode ser encontrado em associação com a bactéria *Rhizobium radiobacter* (sin. *Agrobacterium tumefaciens*) (SHARMA et al., 2008). Estes autores demonstraram que plântulas de cevada inoculadas apenas com *R. radiobacter* exibiram promoção de crescimento e resistência sistêmica a oídio (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) comparável a inoculação com *P. indica*, podendo este efeito estar associado, em parte, a produção de ácido indolacético (AIA) pela bactéria.

3.1.2 Objetivos

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar o potencial de *Piriformospora indica* no controle biológico e/ou indução de resistência nos patossistemas citros x *Phytophthora nicotianae* e faia x *P. plurivora*.

Os objetivos específicos compreenderam a avaliação de mecanismos de ação de *P. indica* no controle dos patógenos, através de parâmetros bioquímicos, moleculares e de antagonismo. Buscou-se ainda verificar parâmetros fisiológicos e de crescimento afetados durante as interações.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Investigações histológicas e moleculares em plantas de faia infectadas com *Piriformospora indica*

3.2.1.1 Inoculação de plântulas de faia com *Piriformospora indica*

Sementes de faia (*Fagus sylvatica*) foram semeadas em vermiculita e mantidas em geladeira à 4 °C por, aproximadamente, duas semanas. Quando as sementes apresentaram protrusão radicular, as mesmas foram transferidas para bandejas contendo vermiculita, onde se desenvolveram em sala climatizada à 25 °C. Plântulas com, aproximadamente, três meses de idade foram infectadas utilizando-se o método dos discos de micélio de *P. indica*, cultivada em meio CM (completo ou complexo; ACHATZ, 2006; Apêndice A), os quais foram adicionados ao substrato de modo a entrar em contato com diferentes porções do sistema radicular das plântulas.

As plântulas inoculadas com o endofítico se desenvolveram em recipientes plásticos sob condições ambientais. Após um ano, as plantas de faia foram submetidas a análises histológicas e moleculares a fim de verificar se o fungo colonizou os tecidos radiculares.

3.2.1.2 Confirmação da infecção de *Piriformospora indica* por microscopia de luz

Primeiramente, para proceder a coloração por fucsina, foram preparadas três soluções:

- Solução estoque de fucsina (0,15%): diluição de 15 mg de fucsina em água destilada.
- Solução de coloração (fucsina 0,01% em ácido láctico):
 - 14 mL de ácido láctico (85%);
 - 1 mL de glicerol (50%);

- 1 mL de água destilada;
- 1 mL da solução estoque de ácido fucsina.
- Solução de lavagem: idêntica à solução de coloração, porém, sem adição de fucsina.

Para tanto, foi realizado o processo de coloração proposto por Chabaud et al. (2006). Raízes finas de faia foram coletadas, lavadas em água destilada e cortadas em pequenos pedaços com 1 a 2 cm de comprimento. As raízes foram transferidas para tubo de microcentrífuga contendo etanol 50% de forma que as raízes permanecessem imersas na solução. Após cerca de 12 h, o etanol foi removido com auxílio de pipeta e, em seguida, foi adicionado hidróxido de potássio 20% até que as raízes estivessem imersas. O material foi incubado à 80 °C para descoloração das raízes. Posteriormente, o hidróxido de potássio foi removido com auxílio de pipeta e as raízes foram lavadas em água destilada. Após a lavagem, as raízes foram imersas em ácido clorídrico por 1 h. Em seguida, o ácido foi removido e as raízes incubadas na solução de coloração por cerca de 12 h. Após esse tempo, as raízes foram transferidas para lâminas de microscopia, contendo uma gota de glicerol 50%, para observação das estruturas de *P. indica* em microscópio de luz sob aumento de 400 vezes.

3.2.1.3 Extração e purificação de DNA

O DNA total foi obtido a partir da extração de amostras de raízes utilizando-se o “DNeasy® Plant Mini Kit” (Qiagen), conforme as recomendações do fabricante. O sistema radicular das plantas foi liofilizado e, em seguida, apenas as raízes finas foram transferidas para tubo de microcentrífuga, juntamente com duas pequenas bolas de aço inox de 4 mm de diâmetro. Posteriormente, em um triturador denominado de “Ball-mill”, as raízes foram trituradas por meio de intensa agitação por 10 min, de forma que estas tornassem-se apenas pó.

Em seguida, cerca de 20 mg deste pó foram transferidos para um novo tubo de microcentrífuga, ao qual foram adicionados 400 µL do tampão AP1 (“Lysis buffer”) e 4 µL de RNase. O material foi mantido em “banho-maria” por 10 min a 65 °C, sendo os tubos agitados manualmente duas a três vezes durante este período. Posteriormente, foram adicionados 130 µL do tampão P3 (“Neutralization buffer”) e, depois, os tubos foram incubados em gelo por 5 min. Em seguida, o material foi centrifugado a 14.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi recuperado e adicionado a

outro microtubo que possui um filtro em seu interior (“QIA shredder Mini Spin Column”). Novamente foi realizada centrifugação a 14.000 rpm por 2 min e o material filtrado foi recolhido em um novo microtubo e foram adicionados 600 µL de tampão AW1 (“Wash buffer”). Uma alíquota de 650 µL foi adicionada a um microtubo contendo outro filtro (“DNeasy Mini Spin Column”), sendo em seguida centrifugada a 8.000 rpm por 1 min. O mesmo procedimento foi realizado com o restante do material presente no microtubo onde foi adicionado o tampão AW1.

Descartou-se o material filtrado, sendo o filtro transferido para novo tubo tipo Eppendorf. Adicionou-se 500 µL de AW2 (“Wash buffer”) e realizou-se a centrifugação a 8.000 rpm por 1 min, sendo que, esta etapa foi realizada duas vezes, porém, na segunda vez a centrifugação foi a 14.000 rpm por 2 min. A coluna, contendo DNA, foi transferida para outro microtubo e 100 µL de AE (“Elution buffer”) foram adicionados no centro da coluna e incubados por 5 min a temperatura ambiente e centrifugados a 8.000 rpm por 1 min para lavagem do DNA. Esta etapa também foi realizada duas vezes. O DNA obtido foi armazenado a - 80 °C.

Para purificação do extrato de DNA utilizou-se o kit “Wizard DNA clean up System”, da Promega e, para tanto, foram seguidas as recomendações do fabricante. Em tubo para microcentrífuga foram transferidos 100 µL do extrato de DNA e 1 mL da resina “Clean up” e, posteriormente, o tubo foi agitado para homogeneização. Em seguida, uma seringa foi instalada à uma coluna Wizard à qual foi adaptada à um tubo de 2 mL. A mistura extrato de DNA + resina foi passada pela coluna pela pressão no embolo da seringa. Após esta etapa, 2 mL de isopropanol (80%) foram adicionados e pressionados contra a coluna para lavagem do DNA. Para secagem, o embolo da seringa foi pressionado apenas com ar. A coluna foi transferida para um novo tubo e centrifugada por 2 min à 14.000 rpm. Posteriormente, 50 µL de água à 65 °C foram adicionados à coluna e incubados por 1 min e, logo após procedeu-se a centrifugação. Esta última etapa foi realizada duas vezes e, em seguida, o material foi armazenado à - 80 °C.

3.2.1.4 Confirmação da infecção de *Piriformospora indica* por PCR em plantas de faia e plântulas de citros

Plantas de faia, obtidas conforme descrito no item 3.2.1.1, foram inoculadas com *P. indica* há um ano. Plântulas de tangerina ‘Sunki’, obtidas de acordo com método descrito no item 3.2.3.3, foram inoculadas com o endofítico radicular há 14

dias, utilizando micélio (item 3.2.2.3; ANITH et al., 2011). Para confirmação da infecção de *P. indica*, as raízes foram analisadas utilizando o procedimento proposto por Pfiffi (2009).

Neste caso, também foram utilizadas plântulas de trigo, uma gramínea anual, semelhante a cevada, planta modelo utilizada nos estudos com o endofítico. As plântulas de trigo foram obtidas através de sementes germinadas e crescidas, por 14 dias, em substrato contendo micélio de *P. indica* (ANITH et al., 2011).

Para a confirmação da infecção de *P. indica* foram utilizados os primers específicos abaixo descritos:

- PiTef_for: TCG TCG CTG TCA ACA AGA TG
- PiTef_rev: ACC GTC TTG GGG TTG TAT CC

As reações foram realizadas em tubos tipo Eppendorf, sendo o volume para a reação de 25 μL , o qual continha:

- 2,5 μL de 10x tampão para PCR
- 1,5 de MgCl_2 (25 mM)
- 0,5 μL de 5mM dNTPs
- 1,0 μL de primer PiTef_for (10 μM)
- 1,0 μL de primer PiTef_rev (10 μM)
- 0,25 μL de Taq-polimerase (5 U μL^{-1})
- 16,75 μL de água
- 1 μL de DNA

As condições de PCR empregadas foram 95 °C por 15 min para uma desnaturação inicial, 95 °C por 30 s para desnaturação, 60 °C por 30 s para anelamento e 72 °C por 30 s para extensão, sendo estes três últimos repetidos por 35 a 40 vezes. Ao final, 72 °C por 7 min para a extensão final. O amplicon deve ter 200 pb.

3.2.1.5 Purificação de DNA usando NAAc/EtOH

Para purificação do DNA foi realizado um PCR, conforme descrito no item 3.2.1.4, no entanto, utilizando-se o dobro do volume dos reagentes, perfazendo um volume final de 50 μL . Destes, 15 μL foram utilizados para a visualização do resultado do PCR em eletroforese e 35 μL para a purificação.

Com vistas a realizar o sequenciamento para se determinar a espécie fúngica presente nas raízes de faia adotou-se o seguinte procedimento. Foram adicionados

em tubos Eppendorf de 1,5 mL, 35 µL de DNA, 3,5 µL de acetato de sódio e 105 µL de etanol 96%. O DNA foi precipitado por 1 h a -75 °C. Após, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 4 °C e 15.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” de DNA foi lavado com 300 µL de etanol 70% e centrifugado como descrito acima. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram novamente centrifugadas, no entanto, por 2 min. O sobrenadante remanescente foi removido com auxílio de pipeta e as amostras foram secas por 15 min a 37 °C. O “pellet” foi dissolvido em 200 µL de água bidestilada e as amostras armazenadas a -20 °C.

3.2.1.6 Sequenciamento

As amostras foram enviadas para sequenciamento a fim de se confirmar a espécie fúngica presente nas raízes de faia. As sequências obtidas foram comparadas com sequências previamente depositadas no GenBank.

3.2.1.7 Obtenção do inóculo de *Phytophthora plurivora*

Por se tratarem de plantas de um ano de idade, a inoculação com o patógeno não foi realizada utilizando-se suspensão de zoósporos. Para tanto utilizou-se o procedimento proposto por Matheron e Mircetich (1985), modificado por Jung et al. (1999).

Em um Becker de 1 L adicionou-se 500 mL de vermiculita e 350 mL de suco de vegetais preparado da seguinte forma: 70 mL de suco de vegetais comercial contendo suco concentrado de tomate e mistura de sucos de cenoura, aipo, beterraba, salsa, alface, agrião e espinafre foram centrifugados por 5 min a 3.000 rpm, com vistas a sedimentar a parte mais densa do suco. O sobrenadante foi misturado a 280 mL de água destilada e 1,0 g de carbonato de cálcio. Essa mistura foi adicionada a vermiculita e homogeneizada com auxílio de bastão de vidro. O Becker foi coberto com papel alumínio e autoclavado a 121 °C e 1 atm por 20 min. Após foram adicionados 20 discos de 7 mm de diâmetro de *P. plurivora* a cada Becker e novamente o substrato foi homogeneizado. O material foi incubado a 20 °C por três semanas no escuro. Para proceder a inoculação do patógeno, removeu-se uma das partes do recipiente plástico onde estavam as plantas e adicionou-se, aproximadamente, 20 mL do inóculo por planta (Figura 2). A seguir, a parte do recipiente foi recolocada e as plantas armazenadas em caixas plásticas. Estas

caixas foram inundadas com água durante dois dias com vistas a produção de esporângios e zoósporos por *P. plurivora*.

Figura 2 - Plantas de faia inoculadas com *Piriformospora indica* há um ano. No detalhe, as plantas com uma das partes do recipiente plástico removida e a inoculação de *Phytophthora plurivora*, com inóculo a base de vermiculita. Folhas exibindo coloração amarelada em função da entrada no período de outono

3.2.1.8 Quantificação de *Phytophthora plurivora*

O PCR quantitativo foi realizado de acordo com o método proposto por Böhm et al. (1999). Como reagentes foram utilizados o “Master-mix universal 23” para PCR, o qual continha tampão 10X, cloreto de magnésio (25 mM), dNTP-mix (5 mM) e Taq polimerase (5 U μL^{-1}).

As sequências de iniciadores utilizadas foram:

P5 – 5' TCAACCCTTTTAGTTGGGGGTC 3'

P6 – 5' TTTAAAACAAAAAGCTACTAGCCCAGAC 3'

Já a sequência da sonda fluorogênica fosforilada foi:

F3 – 5' CTTTTTTTGGCGAGCCCTATCATGGCG 3'

As reações foram realizadas em placas com 96 cavidades, específicas para este tipo de análise. Em cada cavidade foram depositados 12,5 μL do “Master-mix universal”, 0,5 μL do fluoróforo, 0,75 μL de cada um dos iniciadores, 5,5 μL de água e 5 μL do DNA da amostra, o qual foi diluído 10 vezes em água. Assim, o volume total utilizado por reação foi de 25 μL .

Para realização da curva padrão, uma amostra de DNA de *P. plurivora*, com concentração de DNA previamente conhecida, foi diluída de forma seriada nas seguintes proporções: 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000, 1:100.000 (v/v). As condições

de PCR empregadas foram 15 min à 95 °C para uma desnaturação inicial, seguido por 40 ciclos de 15 s à 95 °C, 1 min à 62 °C e, finalmente, 5 min à 72 °C.

3.2.2 Inoculação de plântulas de faia com *Piriformospora indica* com vistas a indução de resistência contra *Phytophthora plurivora*

3.2.2.1 Obtenção das plântulas de faia

Sementes de faia (*Fagus sylvatica*) foram semeadas em caixas plásticas contendo vermiculita e mantidas em geladeira à 4 °C por, aproximadamente, duas semanas. Quando as sementes apresentaram protrusão radicular, as mesmas foram transferidas para bandejas contendo vermiculita, onde se desenvolveram em sala climatizada à 25 °C e fotoperíodo de 12 h. Para instalação dos experimentos, foram utilizadas plântulas com, aproximadamente, três meses de idade.

3.2.2.2 Inoculação das plântulas de faia com o endofítico radicular *Piriformospora indica*

Utilizou-se o método descrito por Anith et al. (2011), com modificações. O fungo *P. indica* foi cultivado em placas contendo meio CM (meio completo ou complexo; ACHATZ, 2006) sólido por 14 dias à 28 °C e escuro. Após, cinco discos de 7 mm de diâmetro, colonizados com o endofítico, foram transferidos para Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultivo CM líquido. Os frascos foram incubados a temperatura de 28 °C, iluminação ambiente e agitação constante a 100 rpm, em agitador rotatório, por 15 dias. Após, o micélio e o filtrado de cultivo do endofítico foram homogeneizados em homogeneizador de tecido por 3 min. O inóculo obtido foi misturado ao solo de modo a se obter a proporção de 2,5% (v/v). Como controle foi utilizado solo não inoculado e solo adicionado do meio de cultivo CM líquido.

3.2.2.3 Obtenção do inóculo de *Phytophthora plurivora*

Para a produção de zoósporos foram utilizadas culturas de *P. plurivora* crescidas em meio V8-água por cinco dias à 20 °C e escuro. Após esse período foi adicionado um volume de água destilada suficiente para cobrir as colônias. A cada 24 h o volume de água foi trocado. A troca de água foi paralisada no momento em que foi possível visualizar a presença de esporângios por toda a placa. Para a liberação dos zoósporos, a placa foi mantida com água e aberta por 1,5 h à 4 °C,

sendo que após este período foi possível visualizar intensa motilidade destas estruturas. A calibração da concentração (6×10^5 zoósporos mL^{-1}) foi efetuada com auxílio de hemocitômetro. Plântulas de faia colonizadas por *P. indica* por 14 dias, foram inoculadas com suspensão de zoósporos de *P. plurivora*.

3.2.2.4 Avaliações

3.2.2.4.1 Mortalidade das plântulas

As plântulas foram observadas diariamente e aquelas que se apresentavam murchas e secas foram consideradas mortas. Os dados foram expressos em porcentagem. De acordo com a experiência do grupo de pesquisa do Prof. Wolfgang Osswald, as plântulas de faia inoculadas com *P. plurivora* morrem, no máximo, até 12 dias após a inoculação.

3.2.2.4.2 Quantificação de *Phytophthora plurivora*

A extração e purificação de DNA foram realizadas conforme descrito no item 3.2.1.3. A quantificação de *Phytophthora plurivora* no sistema radicular seguiu procedimento descrito no item 3.2.1.8.

3.2.3 Efeito direto de *Piriformospora indica* e inoculação de plântulas de citros com *P. indica* com vistas a indução de resistência contra *Phytophthora nicotianae*

3.2.3.1 Antagonismo

No ensaio para avaliação da capacidade de colonização do sistema radicular por *P. indica* (3.2.1.4), utilizou-se plântulas de trigo devido a semelhança com cevada, planta modelo nos estudos com o endofítico. No ensaio de antagonismo optou-se também pela avaliação do efeito de *P. indica* sobre um patógeno de trigo, no caso, *Pyricularia grisea*.

A escolha dos meios de cultivo para condução dos ensaios de antagonismo deu-se pelo melhor crescimento de cada fungo: meio CM (completo ou complexo; ACHATZ, 2006; Apêndice A) para *P. indica* e meio de cenoura para *P. nicotianae*. Para *P. grisea* foi utilizado o meio de aveia. No primeiro teste conduzido para se avaliar a ocorrência de antagonismo de *P. indica* sobre o patógeno de citros, inicialmente, adicionou-se quatro discos de *P. indica* nas extremidades de placas de meio CM e meio cenoura. No caso do meio CM, após seis dias adicionou-se o disco

de *P. nicotianae* no centro da placa e após quatro dias foi realizada a avaliação. No caso do meio de cenoura, o mesmo foi realizado após três e dois dias, respectivamente, devido às diferenças na velocidade de crescimento de cada um dos fungos nos diferentes meios de cultivo. Para *P. grisea* e *P. indica*, em função da semelhança na velocidade de crescimento do patógeno e do endofítico, ambos foram colocados na placa no mesmo dia, sendo que a avaliação ocorreu após seis dias.

No segundo teste, o endofítico e os patógenos foram colocados na placa no mesmo dia. Outra diferença neste teste refere-se à disposição dos mesmos na placa. O patógeno foi colocado em um dos lados da placa enquanto o endofítico foi colocado no lado oposto (Figura 11; item 3.3.3.1). As avaliações ocorreram em diferentes momentos: para *P. grisea*, no meio de aveia após 15 dias e no meio CM após 17 dias; e para *P. nicotianae*, no meio de cenoura após 9 dias e no meio CM após 17 dias.

3.2.3.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para processamento das amostras para MEV utilizou-se procedimento adaptado de Roma (2013). Ao final do experimento de antagonismo de *P. indica* x *P. nicotianae*, foram retirados fragmentos de 5 x 5 mm dos bordos da colônia para processamento, os quais foram submergidos em solução de Karnovsky, contendo glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,0%, tampão fosfato 0,05 M (pH 7,2), por 12 h. Após, os fragmentos foram lavados em tampão cacodilato 0,05 M por 10 min, sendo em seguida, lavados com tampão cacodilato 0,01 M + solução de tetróxido de ósmio 1,0%, na mesma proporção. Os segmentos de micélio foram desidratados em solução de acetona com concentrações crescentes de 30, 50, 70, 90 e 100%, por 20, 20, 120, 20 e 3 x 20 min, respectivamente, tomando-se sempre o cuidado para não deixar as amostras secas durante as trocas de acetona. Em seguida, as amostras foram secas até o ponto crítico, fixadas em “stubs” e metalizadas com ouro para observação em microscópio eletrônico de varredura.

3.2.3.3 Obtenção das plântulas de citros

Plântulas de tangerina ‘Sunki’, suscetível a gomose dos citros, foram obtidas através de sementes, fornecidas pela Fundecitrus e pelo Centro de Citricultura Sylvio Moreira, as quais foram removidas de frutos de laranja e retirada a película que as

recobria. As mesmas foram semeadas em bandejas plásticas contendo substrato e mantidas em casa de vegetação. Após atingirem duas a três folhas, as plântulas foram utilizadas nos experimentos envolvendo o uso de *P. indica* no controle de gomose.

3.2.3.4 Obtenção do inóculo de *Phytophthora nicotianae*

O isolado de *P. nicotianae* foi cedido pelo Dr. Ronaldo J. D. Dalio (APTA/IAC). Este isolado foi mantido em meio de cultivo cenoura-ágar a 28 °C, no escuro. Periodicamente, para reativação do patógeno, foi necessário proceder o reisolamento em frutos de laranja, conforme descrito por Rezende (2014).

Para a produção de zoósporos de *P. nicotianae*, dez discos de micélio do patógeno foram retirados da borda da colônia com sete dias de crescimento em meio cenoura-ágar e, transferidos para placas de poliestireno contendo 10 mL de meio cenoura-líquido diluído (2 mL de meio cenoura-líquido e 8 mL de água destilada autoclavada) e mantidas a 24 °C sob luz fluorescente constante. Após 24 h, para proporcionar estresse nutricional e 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. Em seguida, as mesmas foram colocadas na geladeira (4 °C) por 20 min e, a seguir, em temperatura ambiente por 20 min para promover a liberação dos zoósporos (ARAÚJO, 1998), sendo assim obtida a suspensão de zoósporos para a inoculação. A concentração foi ajustada para 2×10^5 zoósporos mL⁻¹ com auxílio de hemocitômetro.

3.2.3.5 Inoculação das plântulas de citros com *Piriformospora indica*

A inoculação das plântulas de citros com o endofítico foi realizada de acordo com o método descrito no item 3.2.2.3 para plântulas de faia. Como controle foi utilizado apenas solo não inoculado.

Este primeiro experimento foi denominado “*P. indica* x tempos”, sendo realizadas coletas de plântulas para análises bioquímicas aos zero, cinco e 14 dias após a inoculação com o endofítico e antes da inoculação com *P. nicotianae*. Após 14 dias, as plântulas foram inoculadas com o patógeno, conforme método descrito no item 3.2.3.4, sendo as plântulas mantidas em casa de vegetação. As plântulas foram coletadas nos dias um, três, cinco e 14 após a inoculação com o patógeno,

representando as coletas do 15°, 17°, 19° e 28° dia, respectivamente. Foram utilizadas três repetições em cada data, com três plântulas por repetição, totalizando nove plântulas por tratamento. Os tratamentos foram os seguintes:

- plântulas sem inoculação com o endofítico *P. indica* e sem o patógeno *P. nicotianae* (Controle);
- plântulas inoculadas apenas com *P. indica* (PI);
- plântulas inoculadas apenas com o patógeno *P. nicotianae* (PN);
- plântulas inoculadas com o endofítico seguido de desafio com o patógeno (PI + PN).

Um segundo experimento foi conduzido de maneira semelhante, sendo realizadas, no entanto, coletas apenas no final do experimento. Este foi denominado de “Experimento de longo tempo” visto que as plântulas foram analisadas após longo período em contato com *P. indica* e *P. nicotianae*. As mesmas foram inoculadas com o endofítico sendo, após 14 dias, desafiadas com o patógeno. A coleta das plântulas para análise foi realizada 42 dias após a inoculação com o patógeno, ou seja, 56 dias após a inoculação com o endofítico. Como controle positivo foi utilizado o indutor comercial Bion[®], sendo as plântulas tratadas com o indutor no mesmo dia da inoculação com o endofítico e o tratamento repetido dois dias antes da inoculação com o patógeno. Utilizou-se a concentração de 0,8 g L⁻¹, de acordo com a recomendação da bula do produto para o tratamento de mudas cítricas.

3.2.3.6 Avaliações

Avaliou-se a presença do endofítico no sistema radicular através de microscopia de luz (item 3.2.1.2) e PCR (item 3.2.1.4), sintomas de *P. nicotianae* em plantas de tangerina ‘Sunki’ e quantificou-se o oomiceto no sistema radicular. Além destas avaliações, procedeu-se a análise de enzimas relacionadas aos processos de defesa das plântulas e expressão de genes relacionados à defesa.

3.2.3.6.1 Quantificação de *Phytophthora nicotianae*

3.2.3.6.1.1 Extração e purificação de DNA

Em função de dificuldades encontradas na extração de DNA com o DNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen), o DNA total de *P. nicotianae* foi obtido a partir da extração de

amostras de raízes utilizando-se o kit da Promega, seguindo as recomendações do fabricante.

O tecido vegetal foi macerado com auxílio de cadinho e pistilo e nitrogênio líquido. Em seguida adicionou-se 40 mg de tecido vegetal fresco a um tubo Eppendorf de 1,5 mL, juntamente com 600 µL da solução de “Nuclei Lysis Solution”, sendo as amostras homogeneizadas em agitador de tubos tipo “Vortex” por 1 a 3 s. As amostras foram incubadas a 65 °C por 15 min. Após, adicionou-se 3 µL da “RNase solution” para lise celular, misturou-se invertendo o tubo Eppendorf de 2 a 5 vezes e incubou-se a mistura a 37 °C por 15 min. As amostras foram resfriadas a temperatura ambiente por 5 min antes de continuar a extração.

Dando continuidade, adicionou-se 200 µL da “Protein Precipitation Solution”, sendo as amostras misturadas sob alta velocidade em agitador de tubos tipo “Vortex” por 20 s. Após centrifugação por 3 min a 12.000 rpm, a proteína precipitada formou um sedimento grosso. O sobrenadante contendo o DNA (400 a 500 µL, deixando-se o “pellet” no fundo do tubo Eppendorf) foi transferido para novo tubo tipo Eppendorf de 1,5 mL, contendo 600 µL de isopropanol a temperatura ambiente.

A solução foi misturada invertendo-se os tubos até as fitas de DNA formarem uma massa visível, sendo em seguida centrifugada a 12.000 rpm por 1 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 600 µL de etanol 70% a temperatura ambiente e inverteu-se o tubo várias vezes para lavar o DNA. O material foi novamente centrifugado a 12.000 rpm por 1 min a temperatura ambiente. O etanol foi removido utilizando uma pipeta Pasteur e o tubo Eppendorf, contendo o “pellet” de DNA no fundo, foi invertido sobre papel absorvente limpo, e seco ao ar durante, no mínimo, 15 min.

Ao final, adicionou-se 100 µL da “DNA Rehydration Solution” para reidratação do DNA, o qual foi incubado a 65 °C por 1 h sendo os tubos invertidos, de tempos em tempos. O DNA extraído foi armazenado a - 20 °C.

3.2.3.6.1.2 Quantificação de *Phytophthora nicotianae*

O PCR quantitativo foi realizado de acordo com o método proposto por Ippolito, Schena e Nigro (2002). Como reagente foi utilizado o “SyBr master-mix universal” para PCR, o qual continha tampão 10X, cloreto de magnésio (25 mM), dNTP-mix (5 mM) e Taq polimerase (5 U µL⁻¹). As sequências de iniciadores utilizadas foram:

Pn5B: GAACAATGCAACTTATTGGACGTTT

Pn6: AACCGAAGCTGCCACCCTAC

As reações foram realizadas em placas com 96 cavidades, específicas para este tipo de análise. Em cada cavidade foram depositados 12,5 µL do “Master-mix universal”, 1,0 µL de cada um dos iniciadores, 5,5 µL de água e 5 µL do DNA da amostra, o qual foi diluído 10 vezes em água. Assim, o volume total utilizado por reação foi de 25 µL.

Para realização da curva padrão, uma amostra de DNA de *P. nicotianae*, com concentração de DNA previamente conhecida, foi diluída de forma seriada nas seguintes proporções: 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000, 1:100.000 (v/v). As condições de PCR empregadas foram 15 min à 95 °C para uma desnaturação inicial, seguido por 40 ciclos de 15 s à 95 °C, 30 s à 60 °C e 15 min à 72 °C.

3.2.3.6.2 Análises bioquímicas

3.2.3.6.2.1 Preparo do extrato proteico

As amostras de raízes e folhas frescas foram pesadas e maceradas em nitrogênio líquido, com auxílio de almofariz e pistilo. Após, foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), na proporção 1:6 (p/v) acrescido de polivinilpirrolidona (PVPP). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm durante 30 min a 4 °C, sendo o sobrenadante obtido considerado como extrato enzimático, sendo usado para a determinação da atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase, β -1,3-glucanase e guaiacol peroxidase, bem como o teor de proteínas totais.

3.2.3.6.2.2 Proteínas totais

O teor total de proteínas foi determinado de acordo com o método de Bradford (1976). Para tanto, foram adicionados a cada 20 µL do sobrenadante do extrato proteico, 1.000 µL do reagente de Bradford (diluído em água destilada na proporção de 1:4; v/v). Após 5 min, foi efetuada a leitura da absorbância a 595 nm em espectrofotômetro. A concentração de proteínas foi expressa em termos de equivalentes µg de albumina de soro bovino g⁻¹ de tecido fresco.

3.2.3.6.2.3 Atividade da fenilalanina amônia-liase

A atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL) foi determinada pela quantificação do ácido *trans*-cinâmico, liberado do substrato fenilalanina (UMESHA,

2006). A reação foi realizada da seguinte forma: 400 µL de tampão Tris-HCl 25 mM (pH 8,8) e 500 µL de L-fenilalanina foram acondicionados em tubos para microcentrífuga e incubados a 40 °C por 5 min. Após esse tempo, para cada amostra, foi realizada a reação e o controle da reação, conforme descrito abaixo:

- reação: aos 400 µL de tampão Tris-HCl 25 mM (pH 8,8) e 500 µL de L-fenilalanina foram adicionados 100 µL do extrato proteico diluído na proporção 1:1 (v/v). Essa diluição do extrato proteico foi corrigida posteriormente;

- controle da reação: aos 400 µL de tampão Tris-HCl 25 mM (pH 8,8) e 500 µL de L-fenilalanina foram adicionados 50 µL de HCl 5M seguido de 100 µL do extrato proteico diluído na proporção 1:1 (v/v). A adição do HCl antes do extrato proteico impede a reação da enzima com o substrato;

- branco: utilizou-se 100 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) (o mesmo utilizado no preparo do extrato proteico), 400 µL de tampão Tris-HCl 25 mM, (pH 8,8) e 500 µL de L-fenilalanina.

As amostras foram incubadas a 40 °C por 2 h. Após, para paralisar a reação foram adicionados 50 µL de HCl 5M à reação e ao branco. A absorbância das amostras foi determinada a 290 nm em espectrofotômetro e a atividade enzimática expressa em µg de ácido *trans*-cinâmico mg⁻¹ proteína.

3.2.3.6.2.4 Atividade da β-1,3-glucanase

A determinação da atividade da β-1,3-glucanase foi realizada de acordo com Kombrink e Hahlbrock (1986). Para isso, a partir do extrato proteico obtido anteriormente, as reações foram conduzidas da seguinte forma:

- reação (1): 150 µL de laminarina 0,2%, previamente dissolvida em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0), e 100 µL de extrato proteico;

- controle da reação (2): 150 µL de laminarina 0,2%, previamente dissolvida em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0), 100 µL de extrato proteico e 125 µL de ADNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico);

- branco: 150 µL de laminarina 0,2% previamente dissolvida em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0).

As amostras foram incubadas a 40 °C por 4 h. Após esse período, adicionou-se 125 µL de ADNS aos tubos da reação e branco, sendo as amostras novamente incubadas a 95 °C por 5 min, seguidas de resfriamento em gelo. O volume das amostras foi completado para 1,5 mL com a adição de água destilada. A

concentração da glicose liberada pela hidrólise da laminarina foi determinada a 410 nm em espectrofotômetro, sendo obtida com base na subtração da reação (1) (glucanases hidrolisam laminarina liberando glicose) do controle da reação (2) (glucanases tratadas com ADNS não hidrolisam laminarina). Os resultados foram expressos em μg de glicose mg^{-1} de proteína.

3.2.3.6.2.5 Atividade da guaiacol peroxidase

A atividade da guaiacol peroxidase foi determinada a 470 nm em espectrofotômetro, pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol (LUSSO; PASCHOLATI, 1999). A mistura da reação continha 0,5 μL do extrato proteico e 2,955 mL de solução com 250 μL de guaiacol e 306 μL de peróxido de hidrogênio para cada 100 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0). A atividade da peroxidase foi expressa em unidades de absorbância $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

3.2.3.6.3 Extração de RNA, síntese de cDNA e análise da expressão de genes relacionados ao processo de defesa

A análise da expressão gênica foi realizada em plântulas inoculadas com *P. indica* ou tratadas com o indutor de resistência Bion[®], ambas aos 14 dias. A seguir, as plântulas foram desafiadas com *P. nicotianae*, e as coletas realizadas aos 28 dias, ou seja, 14 dias após a inoculação do patógeno. Os tratamentos foram os seguintes:

- plântulas sem inoculação e/ou tratamento (Controle);
- plântulas inoculadas apenas com *P. indica* (PI);
- plântulas tratadas apenas com o indutor de resistência Bion[®] (Bion[®]);
- plântulas inoculadas apenas com o patógeno *P. nicotianae* (PN);
- plântulas inoculadas com o endofítico seguido de desafio com o patógeno (PI + PN);
- plântulas tratadas com o indutor de resistência Bion[®] e inoculadas com o patógeno (Bion[®] + PN).

3.2.3.6.3.1 Extração de RNA utilizando Trizol

As raízes de citros foram pesadas (0,1 g), colocadas em tubos tipo Eppendorf e maceradas em nitrogênio líquido. Em seguida, acrescentou-se 700 μL de Trizol e misturou-se bem, sendo o material incubado por 5 min em gelo. Após a incubação,

acrescentou-se 200 µL de clorofórmio, sendo as amostras agitadas em agitador de tubos tipo “Vortex” por 15 s. Incubou-se as mesmas em gelo por 10 min e agitou-se no “Vortex” de 2 em 2 min, seguida de centrifugação a 11.000 rpm por 15 min à 4 °C. A seguir, coletou-se a fase aquosa (somente a porção superior) e transferiu-se para novo tubo, sendo acrescentados 500 µL de álcool isopropílico.

As amostras foram incubadas por, no mínimo, 2 h no gelo, seguida de centrifugação a 12.000 rpm por 30 min. Descartou-se o álcool e manteve-se o “pellet” aderido ao fundo do tubo Eppendorf. Acrescentou-se 700 µL de álcool 70-75% (diluído em água DEPC 0,01%) a 4 °C. A água DEPC é preparada adicionando-se dietilpirocarbonato (DEPC) na água Milli-Q. O DEPC é utilizado para inativar possíveis RNases presentes na água, sendo o mesmo inativado após autoclavagem da água DEPC.

As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 min e o sobrenadante descartado, sendo o “pellet” seco à 37 °C por, aproximadamente, 15 min em estufa. Ao final, o “pellet” foi ressuspenso em 20 µL de água DEPC, sendo esse material armazenado a - 80 °C.

A qualidade do RNA foi avaliada por eletroforese (5V/cm) em gel de agarose 1%, contendo 20% de formaldeído 37%, 10% de tampão MOPS 10X (MOPS 0,2M; acetato de sódio 50 mM; EDTA 10 mM; pH 7,2) e 0,5X de “Sybr safe” (Invitrogen). Antes da aplicação no gel, adicionou-se a 400 ng de RNA e o tampão de amostra 5X (30,84% de formamida; 40% de MOPS 10X; 7,2% de formaldeído 37%; 0,5% de EDTA 500mM; 20% de glicerol; 0,35% de azul de bromofenol) na proporção de 4 de amostra: 1 de tampão (v/v). As amostras foram aquecidas a 65 °C por 5 min e aplicadas no gel. O RNA ficou armazenado em congelador - 80°C até ser utilizado. Para digestão de DNA residual foi utilizada a enzima “RQ1 – RNase free DNase” (Promega). Para cada 1 µg de RNA foi adicionado 1 unidade da enzima citada, 1 µL de tampão, completando-se o volume final para 10 µL com água livre de nucleases. Em seguida, para confirmação da não contaminação do RNA com DNA genômico foi feito um PCR qualitativo. O programa de PCR utilizado seguiu o seguinte modelo: 5 min a 95 °C para desnaturação de moléculas, 40 ciclos para amplificação do DNA consistindo de 10 s a 95 °C para desnaturação, 30 s a 61 °C para anelamento de primers, 10 s a 72 °C para extensão e, por fim, um ciclo de 72 °C por 5 min para extensão final. O gene utilizado para esta reação qualitativa foi o gene normalizador FBOX.

3.2.3.6.3.2 Síntese de cDNA

O RNA extraído foi utilizado em reação de transcrição reversa, usando o “RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit” (Thermo Scientific) para a obtenção do cDNA, segundo as recomendações do fabricante. Nesta reação, juntamente com 5 µL do RNA da planta (500 ng), foi adicionado 0,5 µL de primers hexâmeros randômicos a 50 ng µL⁻¹ e 0,5 µL de oligo (dT) a 50 µM e 6 µL de água livre de nucleases, totalizando 12 µL. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 65 °C por 5 min e colocadas no gelo por, no mínimo, 5 min. Após esse período foi adicionado a cada amostra, 8 µL de uma mistura de reação contendo 4 µL de 5X “Reaction buffer”, 2,0 µL de “PCR nucleotide mix” (concentração final de 0,5 mM de cada nucleotídeo), 1,0 µL da enzima “RiboLock RNase Inhibitor” (20 U µL⁻¹) e 1,0 µL “RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase”, completando um volume final de 20 µL. O cDNA foi armazenado a - 20 °C e, posteriormente, utilizado nas reações de qPCR.

3.2.3.6.3.3 Expressão dos genes relacionados ao processo de defesa

Alíquotas de uma concentração padrão de cDNA foram subsequentemente utilizadas como modelo para o qPCR com primers para genes específicos (Tabela 1). A sequência de nucleotídeos para os genes normalizadores foi obtida a partir do trabalho de MAFRA et al. (2012) e a sequência para os genes de *Citrus sinensis* foi obtida no National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2015). Utilizou-se os genes de *C. sinensis* devido ao genoma de *C. sunki* estar apenas, em parte, sequenciado. Os genes da *PR-1* possuem cópia em cromossomos distintos, uma cópia no cromossomo 4 e, outra cópia, no cromossomo 8. Dessa forma, as duas formas foram analisadas no estudo.

Tabela 1 – Sequência de nucleotídeos dos genes normalizadores de citros e dos genes de defesa de *Citrus sinensis*

Especificação	Abreviação do gene	Sequência do primer
Genes normalizadores de citros	<i>SAND</i>	F: AGGTTGTCAGCCTTGTTGGT R: GCCGTGGGATTATATCTTGG
	<i>FBOX</i>	F: TTGGAAACTCTTTTCGCCACT R: CAGCAACAAAATACCCGTCT
	<i>UPL7</i>	F: CAAAGAAGTGCAGCGAGAGA R: TCAGGAACAGCAAAAGCAAG
	<i>GAPC2</i>	F: TCTTGCCTGCTTTGAATGGA R: TGTGAGGTCAACCACTGCGACAT
Genes de defesa (<i>C. sinensis</i>)	<i>PR-1.4</i>	F: TTAGAATGAGGCCAATGC R: CGTAAGGTCCGTTAGAATGC
	<i>PR-1.8</i>	F: AGATGTCTAGCATTTCCT R: AGGTAGTCTTGAGGCGAG
	<i>PR-β-glucosidase</i>	F: TCCGAATCAAGCAACTCTCC R: CGTTGTTCTGGACCCAT
	<i>Hsp70</i>	F: GTACGGATGTCTTATTA R: TGTACTGACCAATAATC

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems) utilizando o kit “Power UP Sybr Green Master Mix” (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante. As reações se basearam em 2 µL do cDNA, 6,25 µL de tampão de amplificação “SyBr master-mix universal” para PCR, o qual continha tampão 10X, cloreto de magnésio (25 mM), dNTP-mix (5 mM) e Taq polimerase (5 U µL⁻¹). Utilizou-se ainda 0,3 µM de cada primer e água livre de nucleases para um volume final de 12,5 µL. Para cada amostra houve uma repetição. O programa de PCR utilizado seguiu o seguinte modelo: 5 min a 95 °C para desnaturação de moléculas, 40 ciclos para amplificação do DNA consistindo de 10 s a 95°C para desnaturação, 30 s a 61 °C para anelamento de primers, 10 s a 72 °C para extensão e, finalmente, um ciclo de 72 °C por 5 min para extensão final.

3.2.3.6.3.4 Análise dos resultados de expressão gênica por qPCR

Os dados brutos (dados sem correlação da linha de base) dos níveis de fluorescências foram submetidos ao programa “LinRegPCR” (RAMAKERS et al., 2003) para se obter a regressão linear de cada curva de amplificação para então se calcular a eficiência de amplificação em cada curva ($E=10^{\text{slope}}$). Valores ideais de E ($1,8 \leq E \leq 2$) e correlação ($R \geq 0,995$) foram almejados. Como apontado na Tabela 1, os genes endógenos analisados foram família de proteína SAND (*SAND*), família de proteína F-box (*FBOX*), proteína ubiquinina ligase 7 (*UPL7*) e gliceraldeído-3-fosfato

desidrogenase C2 (*GAPC2*). A análise da estabilidade da expressão dos genes foi obtida através da ferramenta “RefFinder” (www.leonxie.com/referencegene.php) que une os métodos “geNorm” (VANDESOMPELE et al., 2002), “NormFinder” (ANDERSEN; JENSEN; ORNTTOFT, 2004) e “ Δ Ct method” (SILVER et al., 2006). Após o cálculo de cada programa separadamente, o “RefFinder” fornece pesos diferentes a cada um dos resultados e realiza a média geométrica dos mesmos, classificando-os em graus distintos de estabilidade. A análise de expressão gênica do controle e tratamentos, bem como suas respectivas análises estatísticas, foram feitas utilizando-se o software “REST” (“Relative Expression Software Tool”) (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002).

3.3 Resultados

3.3.1 Investigações histológicas e moleculares de plantas de faia infectadas com *Piriformospora indica*

3.3.1.1 Confirmação da infecção de *Piriformospora indica* por microscopia de luz

Na análise histológica das raízes de faia (Figura 3), um ano após a inoculação com discos de micélio de *P. indica*, observou-se estruturas semelhantes às descritas para *P. indica* na literatura (WALLER et al., 2005; ANITH et al., 2011; Figura 4).

Figura 3 – Análises histológicas para observação de clamidósporos de *Piriformospora indica* em raízes de faia (*Fagus sylvatica*), um ano após a inoculação com o endofítico. A e B: setas indicam estruturas, possivelmente, pertencentes a *P. indica*. Imagens obtidas em microscópio óptico com aumento de 100 vezes

Figura 4 – Clamidósporos de *Piriformospora indica* observados por Waller et al. (2005) em raízes de cevada (*Hordeum vulgare*), quatro semanas após a inoculação com *P. indica* (A) e por Anith et al. (2011) em raízes de pimenta-preta (*Pipiper nigrum*), 60 dias após a inoculação com o endofítico (B)

3.3.1.2 Confirmação da infecção de *Piriformospora indica* por PCR em plantas de faia e plântulas de citros

Não foi possível detectar *P. indica* a partir das raízes de plantas de faia (Figura 5). No caso das plântulas de citros e trigo realizou-se PCR antes e após a etapa de purificação do DNA (item 3.2.3.7.1), constatando-se melhores resultados sem a etapa de purificação. Este método foi utilizado nas análises seguintes, quando pode-se detectar a presença de *P. indica* em raízes de trigo e citros.

Figura 5 – PCR para detecção de *Piriformospora indica* em raízes de plantas de faia e plântulas de citros e trigo infectadas com o endofítico. O sinal + (branco) significa plântulas inoculadas previamente com o *P. indica*. O sinal – (branco) refere-se a plântulas sem a inoculação com o endofítico radicular. Com ou sem purificação, refere-se a realização do PCR antes ou após a etapa de purificação do DNA. O sinal + e – (vermelho) indica o controle positivo (DNA de *P. indica*) e negativo (água), respectivamente. A seta vermelha refere-se a banda de *P. indica*. O amplicon deve ter 200 pb

3.3.1.3 Sequenciamento

Como não foi possível detectar *P. indica* a partir de PCR em raízes de faia, optou-se por realizar sequenciamento gênico. Através da comparação da sequência obtida a partir do DNA de raízes de plantas de faia com sequências previamente depositadas no GenBank constatou-se que o fungo presente nas raízes de faia tratava-se de *Sphaerospora brunnea*.

3.3.1.4 Quantificação de *Phytophthora plurivora*

Em função da detecção de *Sphaerospora brunnea* no sistema radicular de plantas de faia, os ensaios não foram continuados com as plantas inoculadas com *P. indica* há um ano. Além disso, as mesmas perderam as folhas devido a chegada do outono, impossibilitando a inoculação com o patógeno e avaliações das mesmas.

3.3.2 Inoculação de plântulas de faia com *Piriformospora indica* com vistas a indução de resistência contra *Phytophthora plurivora*

As plântulas de faia inoculadas com *P. indica* apresentaram sintomas nas folhas, semelhantes aos causados por podridões radiculares (antes da inoculação com *P. plurivora*) ou sintomas de deficiência ou toxidez nutricional (Figura 6). No entanto, através de PCR o patógeno não foi detectado (Figura 7). A área foliar com sintomas foi maior no tratamento com *P. indica*, assim como, o número de plântulas mortas e plântulas com sintomas (Tabelas 2 e 3).

Figura 6 – Sintomas típicos de murcha e necrose dos bordos foliares, exibidos 14 dias após a inoculação com *Piriformospora indica*, em plântulas de faia com, aproximadamente, três meses de idade. As plântulas não foram inoculadas com *Phytophthora plurivora*

Tabela 2 - Área foliar sadia plântula⁻¹ (cm²) e área foliar com sintomas plântula⁻¹ (cm²) em faia inoculada com *Piriformospora indica*. As plântulas não foram inoculadas com *Phytophthora plurivora*. Meio CM: meio completo ou complexo utilizado para o cultivo de *P. indica*. Substrato: plantas crescidas apenas em substrato autoclavado

Tratamentos	Número plântulas	Área foliar sadia plântula ⁻¹ (cm ²)	Área foliar com sintomas plântula ⁻¹ (cm ²)
Substrato	13	3,32	2,08
Meio CM	9	3,91	0,94
<i>P. indica</i>	7	3,23	4,51

Tabela 3 - Percentual de plântulas de faia sadias, com sintomas e mortas, 14 dias após a inoculação com *Piriformospora indica*. As plântulas não foram inoculadas com *Phytophthora plurivora* e apresentavam-se com, aproximadamente, três meses de idade. Meio CM: meio completo ou complexo utilizado para o cultivo de *P. indica*. Substrato: plantas crescidas apenas em substrato autoclavado

Tratamentos	Sadias (%)	Sintomas (%)	Mortas (%)
Substrato	87	6,5	6,5
Meio CM	57	7	36
<i>P. indica</i>	28	36	36

Ladder

Figura 7 - PCR para detecção de *Phytophthora plurivora* em de raízes de plântulas de faia com, aproximadamente, três meses de idade, 14 dias após a inoculação com *Piriformospora indica* (amostras 4, 5 e 6). No retângulo vermelho, ausência de amplificação para *P. plurivora*. As bandas demonstram plântulas de faia inoculadas com *P. plurivora*. O sinal + e - indica o controle positivo (DNA de *P. plurivora*) e negativo (água), respectivamente. A seta vermelha refere-se a banda de *P. plurivora*

Plântulas de faia também foram analisadas quanto a presença de *P. indica* no sistema radicular por PCR. O endófito foi detectado com o auxílio de primers específicos (Figura 8). As estruturas observadas na Figura 9, condizem com as descritas na literatura para *P. indica*, confirmando a infecção com o endófito. WATTHANAKARNKITIKUN (2012) observou estruturas semelhantes em plantas de faia inoculadas com o endófito.

Figura 8 - PCR para a detecção de *Piriformospora indica* em raízes de faia. Amostras 1 e 2: plântulas crescidas apenas em substrato autoclavado. Amostras 3 e 4: plântulas de faia crescidas em substrato contendo meio de cultivo CM (meio completo ou complexo). Amostras 5 a 9: plântulas de faia inoculadas com *P. indica*. Sinais + e - referem-se ao controle positivo (DNA de *P. indica*) e negativo (água), respectivamente. O amplicon deve ter 200 pb

Figura 9 – Raízes de faia 14 dias após a inoculação com *Piriformospora indica*. Na seta, estruturas, possivelmente, pertencentes a *P. indica*. Imagens obtidas em microscópio óptico com aumento de 100 vezes

3.3.3 Efeito direto de *Piriformospora indica* e inoculação de plântulas de citros com *P. indica* com vistas a indução de resistência contra *Phytophthora nicotianae*

3.3.3.1 Antagonismo

Não há indícios de antibiose de *P. indica* sobre *P. nicotianae* (Figura 10 e 11). No primeiro teste de antagonismos (Figura 10) não foram fotografados os tratamentos controle para fins de comparação. Novo teste foi conduzido alterando a disposição do endofítico e do patógeno nas placas. Novamente, não existem indícios de formação de halo de inibição, descartando, portanto, a ocorrência de

antibiose (Figura 11). Para *Pyricularia grisea*, foram observados resultados semelhantes (dados não mostrados).

Figura 10 – Antagonismo de *Piriformospora indica* x *Phytophthora nicotianae* após 10 dias em meio de cultivo CM (A) e após cinco dias em meio de cultivo de cenoura (B). *P. indica* foi colocada em quatro pontos na borda das placas e o patógeno ao centro

Figura 11 – Antagonismo de *Piriformospora indica* x *Phytophthora nicotianae* após 17 dias em meio de cultivo CM (A) e após nove dias em meio de cultivo de cenoura (B). No lado esquerdo da placa encontra-se o patógeno e no lado direito o endofítico. As placas na posição inferior referem-se ao controle, contendo apenas o patógeno

3.3.3.2 Microscopia eletrônica de varredura

Através da análise de microscopia eletrônica de varredura (Figura 12), pode-se observar indícios de parasitismo de *P. indica* sobre *P. nicotianae*, porém este parece não afetar o desenvolvimento do patógeno. Hifas variam em diâmetro conforme o meio e condições de cultivo, sendo que *P. indica*, apresenta hifas com diâmetro variando de 0,6 a 3,5 μm (KOST; REXER, 2013) enquanto as hifas de *P. nicotianae* apresentam de 7 a 10 μm de diâmetro (MOUNDE et al., 2012). Assim, as hifas de maior espessura correspondem, possivelmente, ao patógeno, enquanto as de diâmetro menor correspondem ao endofítico.

Figura 12 – Microscopia eletrônica de varredura de *Phytophthora nicotianae* (PN) e *Piriformospora indica* (PI) em meio de cultivo CM (complexo). Setas indicam início de parasitismo entre hifas

3.3.3.3 Confirmação da infecção de *Piriformospora indica* por microscopia e PCR

As plântulas cítricas foram analisadas quanto à presença de *P. indica* no sistema radicular através de PCR. O endofítico foi detectado com o auxílio de primers específicos (Figura 13). As imagens obtidas na análise histológica revelaram a presença de estruturas semelhantes às descritas na literatura para *P. indica*, externamente e internamente às raízes (Figura 14). Análises de microscopia eletrônica de varredura mostram a presença de clamidósporos em meio de cultura (Figura 15).

Figura 13 - PCR para detecção de *Piriformospora indica* em plântulas de citros. Amostras 1 a 5: plântulas de citros inoculadas apenas com *P. indica*. Amostras 8 e 9: plântulas de citros inoculadas com *P. indica* e *Phytophthora nicotianae*. Amostras 6 e 7: controle positivo (DNA de *P. indica*) e negativo (água), respectivamente. O amplicon deve ter 200 pb

Figura 14 – Clamidósporos de *Piriformospora indica* em raízes de citros (A). Clamidósporos em formato de pera na superfície de raízes de citros, 14 dias após a inoculação com o endofítico radicular (B)

Figura 15 – Clamidósporos (B) e hifas (A) de *Piriformospora indica* em meio de cultura (adaptado de Sun; Oelmüller, 2010; a). Clamidósporos (B) e hifas (A) observadas no presente trabalho (b). Barra em (b): 20 µm

3.3.3.4 Sintomas de *Phytophthora nicotianae*

No ensaio “*Piriformospora indica* x tempos”, ao analisar a massa fresca de plântulas de tangerina ‘Sunki’ inoculadas com o endofítico e desafiadas ou não com o patógeno, observa-se que não houve promoção de crescimento nas plântulas inoculadas com *P. indica* (Figura 16). Além disso, pode-se observar uma redução de mais de 40% na massa fresca de raiz do tratamento com *P. indica* e inoculado com o patógeno, apesar de não ser observada diferença estatística (Figura 16A), quando comparado ao tratamento apenas com o patógeno indicando, possivelmente, um aumento na suscetibilidade das plântulas quando inoculadas com o endofítico.

Na parte aérea, os efeitos foram menos evidentes, não havendo redução na massa fresca nos tratamentos apenas com *P. indica* ou apenas com o patógeno

(Figura 16B). Porém, no tratamento com o endofítico e o patógeno (PI + PN), a redução na massa fresca da parte aérea foi superior a 40% quando comparado ao controle, apesar de não ser observada diferença estatística.

Figura 16 - Massa fresca de raízes (A) e parte aérea (B) de plântulas de tangerina 'Sunki' inoculadas ou não com *Piriformospora indica* (PI) seguidas de desafio ou não com *Phytophthora nicotianae* (PN). Controle: plântulas crescidas apenas em substrato autoclavado. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As barras indicam o erro padrão da média. Avaliação realizada 14 dias após a inoculação com o patógeno

No "Experimento de longo tempo" quando a coleta das plântulas foi realizada 42 dias após a inoculação com o patógeno, ou seja, 56 dias após a inoculação com o endofítico, as plântulas colonizadas com o endofítico não exibiram promoção de crescimento (PI) e não houve proteção das mesmas do dano proporcionado pelo patógeno (PI + PN) (Figura 17). Para massa fresca de raiz os tratamentos com Bion[®] e Bion[®] + PN foram estatisticamente superiores quando comparados com os tratamentos apenas com o patógeno (PN).

Figura 17 - Massa fresca de plântulas de tangerina 'Sunki' inoculadas com *Piriformospora indica* ou tratadas com Bion®, seguidas de desafio com *Phytophthora nicotianae* ("Experimento de longo tempo"). A coleta das plântulas para análise foi realizada 42 dias após a inoculação com o patógeno, ou seja, 56 dias após a inoculação com o endofítico. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. As barras indicam o erro padrão da média (n=3), sendo cada repetição composta por três plântulas

Com relação a incidência do patógeno (Figura 18), não foi observada diferença entre os tratamentos sendo que, no tratamento apenas com o patógeno, 20% das plântulas morreram e, no tratamento com *P. indica* e o patógeno, a incidência foi de 30%. No entanto, conforme demonstrado nos dados de massa fresca (Figuras 16 e 17) houve efeito do patógeno no tratamento com o endofítico, não sendo este eficiente no controle da doença. Outros experimentos foram conduzidos com incidências semelhantes ou superiores, porém sem efeito de *P. indica* sobre a doença.

Figura 18 - Plântulas de tangerina 'Sunki' inoculadas com *Piriformospora indica* seguidas de desafio ou não com *Phytophthora nicotianae*. Setas mostram plantas mortas devido a inoculação com o patógeno. Plântulas de tangerina 'Sunki' foram inoculadas com o endofítico e após 14 dias inoculadas com o patógeno. A coleta das plantas ocorreu 14 dias após a inoculação com o patógeno, ou seja, 28 dias após a inoculação com *P. indica*

3.3.3.5 Quantificação de *Phytophthora nicotianae*

A quantificação do patógeno no sistema radicular foi realizada através de qPCR (Figura 19). Pode-se observar no tratamento com *P. indica* mais *P. nicotianae*, uma quantidade de DNA do patógeno 360 vezes maior do que no tratamento apenas com *P. nicotianae*, confirmando os dados observados na incidência e massa fresca das plântulas, quando se constatou um efeito superior do patógeno no tratamento PI + PN.

Figura 19 – Concentração de *Phytophthora nicotianae* (ng DNA g⁻¹ de tecido seco) em raízes de citros inoculadas ou não com *Piriformospora indica* (PI) e desafiadas ou não com *P. nicotianae* (PN). A análise estatística (Teste de Tukey à 5% de probabilidade) distingue apenas os tratamentos em que a inoculação do patógeno foi realizada. As barras indicam o erro padrão da média (n=3), sendo cada repetição composta por três plântulas

3.3.3.6 Análises bioquímicas

Inicialmente serão apresentadas as análises bioquímicas referentes ao “Experimento *P. indica* x tempos” (Figuras 20 e 21), sendo que na tabela 4 são apresentadas as enzimas e os tempos de coletas onde observou-se diferenças estatísticas. Para raiz, o teor de proteínas foi superior apenas no 17° dia após a inoculação com o endofítico (PI), o que coincidiu com o 3° dia após a inoculação com o patógeno, sendo os teores superiores no tratamento com *P. indica*, porém não se mantendo quando as plântulas foram inoculadas com o patógeno (PI + PN). No 15° dia, observou maior atividade da enzima β -1,3-glucanase em raízes e guaiacol peroxidase em folhas no tratamento com o endofítico e o patógeno (PI + PN).

Em alguns momentos de coleta, apesar de não haver diferença estatística, observa-se valores da atividade das enzimas ligeiramente superiores no tratamento com *P. indica* (PI), os quais não se mantem quando as plântulas inoculadas com o endofítico são desafiadas com o patógeno (PI + PN). Exemplos neste sentido referem-se, por exemplo, ao teor de proteínas na raiz no 17° dia e a atividade da fenilalanina amônia-liase em raízes no 28° dia.

Tabela 4 – Análise de médias para o teor de proteínas e atividade das enzimas β -1,3-glucanase e guaiacol peroxidase em raízes e folhas provenientes de plântulas de tangerina 'Sunki' inoculadas com o endofítico *Piriformospora indica* (PI) seguidas ou não de desafio com *Phytophthora nicotianae* (PN)

	Proteína (raiz)*	β -1,3-glucanase (raiz)**	Guaiacol peroxidase (folha)***
Tratamentos/dias	17 dias	15 dias	15 dias
Controle****	2,703 b	0,066 b	0,145 b
PI	4,228 a	0,057 b	0,139 b
PN	3,277 ab	0,064 b	0,182 b
PI + PN	2,934 b	0,090 a	0,218 a

* mg de proteína g⁻¹ de tecido fresco

** μ g de glicose mg⁻¹ de proteína

*** Abs 470 nm min⁻¹ mg⁻¹ de proteína

**** Plantas crescidas em substrato + solo autoclavado

Figura 20 - Teor de proteínas (A) e atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (B), β -1,3-glucanase (C) e guaiacol peroxidase (D) em raízes provenientes de plântulas de tangerina 'Sunki' inoculadas com o endofítico *Piriformospora indica* (PI) seguidas ou não de desafio com *Phytophthora nicotianae* (PN). A inoculação com o patógeno ocorreu no 14º dia. * Diferença significativa pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Figura 21 - Teor de proteínas (A) e atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (B), β-1,3-glucanase (C) e guaiacol peroxidase (D) em folhas provenientes de plântulas de tangerina 'Sunki' inoculadas com o endofítico *Piriformospora indica* (PI) seguidas ou não de desafio com *Phytophthora nicotianae* (PN). A inoculação com o patógeno ocorreu no 14º dia. * Diferença significativa pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

As análises bioquímicas referentes ao “Experimento *P. indica* x tempos” foram repetidas, porém com coletas apenas aos 0, 14, 21 e 44 dias (Figuras 22 e 23). Para raízes e folhas, observou-se diferença estatística apenas para os teores de proteínas (Tabela 5). Nas raízes, aos 21 dias e 44 dias, os teores de proteínas foram superiores no tratamento com o endofítico + patógeno (PI + PN), o que corresponde ao 7º e 20º dia após a inoculação com o patógeno.

Nas folhas, aos 14 dias, o tratamento controle apresentou valores superiores de proteína quando comparado ao tratamento com o endofítico (PI). Pode-se observar que aos 21 dias, os teores de proteína no tratamento PI + PN foram superiores quando comparado ao controle. O tratamento com *P. indica* (PI) também apresentou teores elevados de proteína, mas sem diferir estatisticamente do tratamento controle.

Tabela 5 – Análise de médias para o teor de proteínas em raízes e folhas provenientes de plântulas de tangerina ‘Sunki’ inoculadas com o endofítico *Piriformospora indica* (PI) seguidas ou não de desafio com *Phytophthora nicotianae* (PN)

	Proteína (raiz)	Proteína (raiz)	Proteína (folha)	Proteína (folha)
Tratamentos/dias	21 dias	44 dias	14 dias	21 dias
Controle**	3,18 ab	1,41 ab	1,94 a	1,25 bc
PI	3,84 ab	1,34 ab	1,57 b	1,80 ab
PN	2,67 b	0,94 b	-***	1,18 c
PI + PN	4,90 a	2,01 a	-	2,26 a

* mg de proteína g⁻¹ de tecido fresco

** Plantas crescidas em substrato + solo autoclavado

*** *Phytophthora nicotianae* não havia sido inoculada nesta data

Figura 22 - Teor de proteínas (A) e atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (B), β-1,3-glucanase (C) e guaiacol peroxidase (D) em raízes provenientes de plântulas de tangerina ‘Sunki’ inoculadas com o endofítico *Piriformospora indica* (PI) seguidas ou não de desafio com *Phytophthora nicotianae* (PN). A inoculação com o patógeno ocorreu no 14º dia. * Diferença significativa pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Figura 23 - Teor de proteínas (A) e atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (B), β-1,3-glucanase (C) e guaiacol peroxidase (D) em folhas provenientes de plântulas de tangerina 'Sunki' inoculadas com o endofítico *Piriformospora indica* (PI) seguidas ou não de desafio com *Phytophthora nicotianae* (PN). A inoculação com o patógeno ocorreu no 14º dia. * Diferença significativa pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

A seguir, são apresentados os dados das análises bioquímicas realizadas para o "Experimento de longo tempo" (Figuras 24 e 25). Neste ensaio, a coleta das plântulas para análise foi realizada 42 dias após a inoculação com o patógeno, ou seja, 56 dias após a inoculação com o endofítico. Para raízes (Figura 24), observa-se que o teor de proteínas foi superior nos tratamentos com o endofítico mais patógeno e apenas com o patógeno. A atividade da enzima guaiacol peroxidase foi superior no tratamento com *P. indica*, mostrando, para as enzimas fenilalanina amônia-liase e β-1,3-glucanase, tendência de superioridade, quando comparado ao controle. A atividade das mesmas enzimas não se manteve quando as plântulas colonizadas com o endofítico foram desafiadas com o patógeno. O tratamento com o indutor Bion[®] incrementou a atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase e β-1,3-glucanase quando comparado com o tratamento apenas com o patógeno.

Figura 24 - Teor de proteínas e atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase, β -1,3-glucanase e guaiacol peroxidase em raízes provenientes de plântulas de tangerina 'Sunki' inoculadas com o endófito *P. indica* (PI) ou tratadas com Bion® seguidas ou não de desafio com *Phytophthora nicotianae* (PN). A coleta das plântulas para análise foi realizada 42 dias após a inoculação com o patógeno, ou seja, 56 dias após a inoculação com o endófito. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. As barras indicam o erro padrão da média (n=3), sendo cada repetição composta por três plântulas

Ao analisar a atividade das enzimas na parte aérea (Figura 25) observou-se apenas incremento no teor de proteínas no tratamento com *P. indica*, seguido de desafio com o patógeno, quando comparado ao controle. A atividade da fenilalanina amônia-liase quase dobrou no tratamento com endófito (PI) mas, não diferiu estatisticamente do controle.

Figura 25 - Teor de proteínas e atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase, β-1,3-glucanase e guaiacol peroxidase em folhas provenientes de plântulas de tangerina ‘Sunki’ inoculadas com o endofítico *P. indica* (PI) ou tratadas com Bion® seguidas ou não de desafio com *Phytophthora nicotianae* (PN). A coleta das plântulas para análise foi realizada 42 dias após a inoculação com o patógeno, ou seja, 56 dias após a inoculação com o endofítico. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. As barras indicam o erro padrão da média (n=3), sendo cada repetição composta por três plântulas

3.3.3.7 Expressão gênica

3.3.3.7.1 Análise da estabilidade dos genes endógenos

Os genes endógenos selecionados foram submetidos a análise pela ferramenta “RefFinder” que une os programas “Bestkeeper”, “ΔCt”, “GeNorm” e “NormFinder” para fazer a classificação dos genes em mais ou menos estáveis. Os genes da família de proteína SAND (*SAND*) e da família de proteína F-box (*FBOX*) foram selecionados para as análises de expressão gênica, pois se mostraram mais estáveis por exibirem as menores médias geométricas (Figura 26).

Figura 26 – Classificação pela média geométrica dos genes testados pela ferramenta RefFinder. *FBOX*: família de proteínas F-box; *SAND*: proteína SAND; *GAPC2*: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase C2; *UPL7*: proteína ubiquinina ligase 7

3.3.3.7.2 Análise de expressão gênica

Com os genes endógenos determinados, a análise de expressão dos quatro genes selecionados foi realizada. Aos 14 dias, os genes analisados não exibiram expressão diferenciada (dados não mostrados). Aos 28 dias (Figura 27), os tratamentos Controle e Bion[®] não apresentaram expressão dos genes analisados. As plântulas inoculadas com *P. indica* (PI) ou com *P. nicotianae* (PN) isoladamente e plântulas tratadas com Bion[®] seguida de inoculação com o patógeno (Bion[®] + PN), apresentaram níveis semelhantes de expressão dos quatro genes analisados. Quando as plântulas inoculadas com o endofítico foram desafiadas com o patógeno (PI + PN), a expressão dos genes, aos 28 dias, foi aumentada em mais de 400%.

Figura 27 - Razão de expressão dos genes analisados ($p \leq 0,05$) de plântulas de citros infectadas com *Piriformospora indica* (PI) ou tratadas com Bion®, seguida de inoculação com *Phytophthora nicotianae* (PN). C: controle. Dados referem-se a coleta 28 dias após a inoculação com o endofítico e 14 dias após a inoculação com o patógeno

3.4 Discussão

A produção de estruturas de resistência por espécies de *Phytophthora* spp. é a principal razão para a exclusão constituir-se no principal método de controle de doenças provocadas por espécies desse gênero (FEICHTENBERGER et al., 2005). Uma vez na área, o produtor precisa conviver com o problema, pois os métodos de controle curativos se restringem à remoção das plantas severamente atacadas e controle químico com produtos sistêmicos (FUNDECITRUS, 2008). Nesse sentido, o presente trabalho buscou elucidar mecanismos envolvidos nas interações *Piriformospora indica* - citros - *Phytophthora nicotianae* e *Piriformospora indica* - faia - *Phytophthora plurivora* buscando, como ideia futura, a utilização do endofítico radicular na produção de mudas colonizadas sob condições de viveiro, para posterior controle de *Phytophthora* spp. a campo. Para tanto, buscou-se avaliar se o endofítico atua diretamente sobre o patógeno e/ou ativando mecanismos de defesa das plantas. Deve-se ressaltar que alguns dos estudos foram conduzidos durante o

doutorado sanduíche na “Technische Universität München” em Freising na Alemanha (através do projeto PROBRAL - Brasil/Alemanha – DAAD/CAPES), tendo como foco a interação *P. indica* - faia - *P. plurivora*.

Como comentado nos resultados, não se observou efeito direto de *P. indica* sobre *P. nicotianae* indicando, possivelmente, que o endofítico não produz antibióticos com ação sobre o patógeno em estudo. Kumar et al. (2009) também observaram que *P. indica* não secreta nenhum antibiótico efetivo contra *Fusarium verticillioides* e vice-versa. Além disso, *P. indica* não exibiu atividade antifúngica *in vitro* sobre *Fusarium culmorum* e *Cochliobolus sativus*, indicando que o potencial de proteção desse fungo não depende de antibiose (WALLER et al., 2005). Por outro lado, em trabalho conduzido por Sun e colaboradores (2014), *P. indica* inibiu, *in vitro*, o crescimento de *Verticillium dahliae*, além de reduzir a produção de microescleródios do patógeno. Em folhas de couve chinesa, *P. indica* inibiu tanto o crescimento do patógeno nas raízes, quanto sua disseminação para a parte aérea. Desta forma, tem se indicativo de que *P. indica* atuaria tanto com agente de biocontrole quanto ativando mecanismos sistêmicos de defesa da planta.

No presente trabalho, imagens obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura demonstram indícios de parasitismo *in vitro* entre hifas de *P. indica* e *P. nicotianae*, porém este parece não afetar o desenvolvimento do patógeno. Nesse sentido, não foram encontrados trabalhos na literatura demonstrando o parasitismo do endofítico sobre fitopatógenos.

Os estudos para se avaliar a ação de *P. indica* em diferentes patossistemas relatam a inoculação do endofítico através de micélio (ANITH et al., 2011), filtrado de cultivo (BAGDE; PRASAD; VARMA, 2011), suspensão de clamidósporos (PIFFI, 2009; WATTHANAKARNKITIKUN, 2012), discos de meio, dentre outras formas. Plântulas de faia foram inoculadas com *P. indica* utilizando discos de micélio, sendo analisadas após um ano quanto a presença do endofítico. Durante este período, as mesmas permaneceram em vasos sob condições ambientais, portanto, sujeitas a proliferação de outros microrganismos. Ao se analisar as raízes de faia e se fazer o sequenciamento, detectou-se a presença do fungo *Sphaerospora brunnea*. Segundo García-Montero et al. (2008), o fungo ectomicorrízico *S. brunnea* é um contaminante importante em viveiros. Os autores citam ainda que este fungo pode impedir as infecções por outros fungos micorrízicos durante a produção de plantas em toda a Europa, América do Norte, Oceania e Ásia. *S. brunnea* previne a infecção

por outros fungos micorrízicos através da produção em massa de esporos que germinam e, rapidamente, infectam as plantas hospedeiras, fato que pode ter impedido ou dificultando a colonização por *P. indica*. Porém, estudos devem ser conduzidos visto que as estruturas observadas no sistema radicular não condizem com as produzidas por *S. brunnea*. Possivelmente, *P. indica* esteja presente nas raízes de faia, mas, em quantidades pequenas, dificultando sua detecção. Dessa forma, os ensaios não foram continuados com as plântulas de faia inoculadas com *P. indica* há um ano. Além disso, as mesmas perderam as folhas devido a chegada do outono, impossibilitando a inoculação com o patógeno e avaliações das mesmas.

Em outro ensaio, conduzido com plântulas de faia inoculadas com *P. indica* utilizando micélio e filtrado de cultivo, concomitantemente, as mesmas apresentaram sintomas nas folhas semelhantes aos causados por podridões radiculares antes da inoculação com *P. plurivora*. Uma explicação para este fato é de que o solo foi autoclavado, afetando a disponibilidade de nutrientes para as plântulas, o que levou as mesmas a apresentarem sintomas de toxidez e/ou deficiência de nutrientes. Outra possibilidade é de que a *P. indica* atue como um agente patogênico no início da interação em plântulas de faia, afetando a planta. De acordo com trabalhos anteriores, a colonização de plantas por *P. indica* pode variar conforme as condições ambientais, predisposição genética e os estádios de desenvolvimento da hospedeira e do órgão da planta (SHÄFER; KOGEL, 2009). Kaldorf et al. (2005), por exemplo, relatam uma mudança de associação mutualística para a patogênica de *P. indica* em *Populus* sp., devido a presença de amônio no meio.

Possivelmente, a técnica de inoculação com micélio não seja ideal devido ao pouco contato das raízes com os discos de micélio. Por outro lado, a inoculação com filtrado e/ou micélio permitiu a detecção de *P. indica* tanto histologicamente quanto molecularmente nos tecidos de faia e citros. Os estudos com faia foram conduzidos somente até este ponto, em função das plântulas de faia não terem se desenvolvido sob condições brasileiras.

Watthanakarnkitikun (2012) avaliou a inoculação de plântulas de faia através da incubação em placas contendo micélio de *P. indica*, através da adição de micélio e clamidósporos em tubos tipo Falcon contendo água e plântulas de faia e através de discos de micélio adicionados ao substrato (vermiculita) em contato com raízes de faia. A inoculação com discos de meio contendo *P. indica* se mostrou como o método mais efetivo para inoculação de faia. *P. indica* atrasou o desenvolvimento de

sintomas visíveis e reduziu a mortalidade de plântulas de faia infectadas com *P. plurivora*. No estudo conduzido neste trabalho, realizou-se dois ensaios com inoculação de *P. indica*. No primeiro, as plântulas foram inoculadas com discos de micélio, e analisadas após um ano da inoculação com o endofítico. Possivelmente, *P. indica* não tenha tido condições de expressar seu potencial indutor nestas condições. No outro método de inoculação utilizado neste trabalho, utilizou-se solo autoclavado inoculado com filtrado e micélio do endofítico. Possivelmente, a autoclavagem do solo tenha prejudicado a ação de *P. indica* e/ou causado desequilíbrio nutricional às plantas de faia. A autoclavagem do substrato não foi explorada no estudo de Watthanakarnkitikun (2012).

Confirmada a colonização de plântulas cítricas por *P. indica*, iniciou-se os estudos para avaliar se o fungo era capaz de ativar os mecanismos de defesa das plântulas. Em ambos os experimentos, conduzidos com coletas ao longo do tempo para se avaliar o teor de proteínas e a atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase, β -1,3-glucanase e guaiacol peroxidase, pode-se observar que o endofítico alterou o status de defesa da planta apenas em momentos pontuais e em algumas das variáveis analisadas. Observou-se incremento no teor de proteínas em plântulas inoculadas com o endofítico e desafiadas com o patógeno, tanto em raízes, quanto em folhas, nos dois ensaios conduzidos com coletas ao longo do tempo. A atividade das enzimas β -1,3-glucanases em raízes e peroxidase em folhas foi superior, aos 15 dias, no tratamento com o endofítico e o patógeno, em apenas um ensaio. Por sua vez, quando as análises bioquímicas foram realizadas após 56 dias da inoculação com o endofítico, observou-se incrementos na atividade das enzimas avaliadas no tratamento com o endofítico, indicando uma resposta de resistência sistêmica. Apesar de não haver diferença estatística em alguns pontos, a atividade da fenilalanina amônia-liase, da β -1,3-glucanase e da guaiacol peroxidase sempre foi superior no tratamento com o endofítico quando comparado ao tratamento com endofítico e patógeno. A atividade enzimática não se manteve alta quando as plântulas foram desafiadas pelo patógeno, não sendo observados efeitos sobre o controle da doença. Aparentemente, *P. indica* não altera o status de defesa da planta quando sob ação do patógeno.

As PR-proteínas podem apresentar ação direta sobre o agente patogênico, devido à presença de quitina e β -1,3-glucanas, como principais constituintes da parede celular dos fungos. No caso de oomicetos, o principal constituinte da parede

celular são as β -1,3-glucanas. Segundo Kuhn (2007), as quitinases e as β -1,3-glucanases representam hidrolases antifúngicas, as quais atuam sinergisticamente inibindo o crescimento fúngico. Outro modo de ação se refere à liberação de eliciadores não específicos, devido à ação lítica dessas enzimas (YOSHIKAWA et al., 1993). Dessa forma, estas PR-proteínas, podem atuar tanto diretamente sobre o patógeno, quanto ativando o sistema de defesa das plantas.

A fenilalanina amônia-liase (FAL) é a enzima do metabolismo secundário mais estudada em plantas, devido, dentro outras causas, à importância nas reações do metabolismo dos compostos fenólicos (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008). Segundo os mesmos autores, a enzima é responsável pela desaminação da L-fenilalanina, transformando-a em ácido *trans*-cinâmico e amônia, podendo, o ácido *trans*-cinâmico, ser incorporado em vários compostos fenólicos, os quais estão presentes em ésteres, coumarinas, flavonóides e ligninas. Além disso, enzimas como a FAL têm sido estudadas com relação à regulação das rotas biossintéticas das fitoalexinas (BRAGA, 2008).

Durante a resposta de resistência da planta, as espécies reativas de oxigênio (EROs) podem atuar de diferentes maneiras: podem inibir o desenvolvimento do patógeno, atuando diretamente sobre este; fortalecer a parede celular da planta, por favorecer a formação de ligações cruzadas com proteínas estruturais; e promover a peroxidação de lipídeos da membrana plasmática, fortalecendo sua integridade (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008). Quando as espécies reativas de oxigênio se acumulam em níveis tóxicos, a planta pode sofrer prejuízos. Segundo Moller (2001), as EROs podem reduzir a atividade de enzimas através da reação com proteínas, aumentar a permeabilidade da membrana plasmática pela reação com lipídios e causar mutações pela reação com o DNA. Nesse sentido, para minimizar os efeitos deletérios que as EROs podem ocasionar, as plantas contam com várias enzimas antioxidantes, presentes de forma diferenciada nas organelas onde atuam na remoção das EROs. Por exemplo, as peroxidases da família III desempenham várias funções na defesa vegetal, devido à sua participação no processo de lignificação e no metabolismo da parede celular (MESSIAS, 2008). A peroxidase catalisa a oxidação e a eventual polimerização de álcool hidroxicinâmico em presença do peróxido de hidrogênio, originando lignina (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008). As peroxidases são bastante estudadas na indução de resistência devido à sua importância nos processos de defesa da planta,

sendo que, geralmente, aumentos na atividade da enzima estão diretamente relacionados à redução da severidade da doença (KUHN, 2007).

Nos estudos já realizados com o endofítico *P. indica*, a maior parte dos trabalhos se refere a análise de genes envolvidos no processo de defesa das plantas. Com relação às alterações bioquímicas, os resultados disponíveis referem-se basicamente a alterações na atividade de enzimas antioxidantes. Plantas de cevada colonizadas por *P. indica* apresentaram aumento em sua capacidade antioxidante (WALLER et al., 2005). Os autores comentam que espécies reativas de oxigênio exercem papel fundamental no processo infeccioso de fungos necrotróficos, já que induzem reações de hipersensibilidade e morte celular programada. Deste modo, o acúmulo de altos níveis de ascorbato após a inoculação com *P. indica* teria sido responsável pelo controle dos fungos necrotróficos *Fusarium culmorum* e *Cochliobolus sativus* em raízes de cevada.

Uma possibilidade para não serem observadas alterações na enzima guaiacol peroxidase é a participação de outras enzimas relacionadas ao processo oxidativo na eliminação das espécies reativas de oxigênio, como o “singlet oxygen” ($^1\text{O}_2$), o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$) (HEISER; OSSWALD, 2008). A eliminação ou detoxificação das EROs é realizada por um eficiente sistema antioxidante, que compreende antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (NOCTOR; FOYER, 1998). As enzimas antioxidantes incluem a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a guaiacol peroxidase (GPX), enzimas do ciclo da ascorbato glutathiona (AsA-GSH), como a ascorbato peroxidase (APX), a monodehidroascorbato redutase (MDHAR), a dehidroascorbato redutase (DHAR) e a glutathiona redutase (GR). Por outro lado, entre os antioxidantes não enzimáticos, o ascorbato (AsA), a glutathiona (GSH), os carotenoides, os tocoferóis e os fenóis auxiliam na detoxificação das EROs.

Além das análises bioquímicas conduzidas no presente trabalho, foram analisados os genes da *PR-1* (presente no cromossomo 4 e 8), *PR-β-glucosidase* e *Hsp70*. A expressão dos genes analisados em plântulas de citros inoculadas com *P. indica* e *P. nicotianae*, aos 28 dias, foi aumentada em mais de 400%, na média. No entanto, as análises bioquímicas não mostraram alteração e não foram observados resultados no controle da doença. Isso deve-se, possivelmente, aos genes ativados resultarem em respostas bioquímicas diferentes das avaliadas no presente trabalho.

Aparentemente, *P. indica* é capaz de ativar o sistema de defesa da planta, mas esta ativação não apresenta efeitos sobre o patógeno em questão.

Estudos com o endofítico *P. indica* relatam a ativação de várias classes de genes envolvidos no sistema de defesa das plantas. Em plantas de cevada colonizadas pelo endofítico, e desafiadas com *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, vários genes relacionados às respostas de defesa foram ativados, como a proteína relacionada a patogênese *HvPR-17b* e a chaperona molecular *HvHsp70* (WALLER et al., 2008). Molitor et al. (2011) também observaram a ativação de *PR-1*, *PR-2*, *PR-5*, *BCI-7* ("Barley chemically induced 7") e *Hsp70* ("Heat shock protein 70") em cevada contra *B. graminis* f. sp. *hordei*. Stein et al. (2008) observaram uma maior expressão dos genes da *PR-1*, *PR-5*, *ERF1* ("Ethylene response factor 1"), *PDF1.2* ("Plant defensin 1.2") e *LOX2* ("Lipoxygenase 2") em *Arabidopsis* contra *Golorinomyces orontii*.

Quanto a função dos genes analisados no presente estudo, a família de proteínas relacionadas à patogênese 1 (*PR-1*) é relatada por apresentar propriedades anti-fúngicas, enquanto a *PR-2* (*PR-β-glucosidade*) apresenta propriedade de β-1,3-glucanase (ANTONIOW et al., 1980). Conforme já mencionado, β-1,3-glucanases podem atuar diretamente, inibindo o crescimento fúngico ou liberando eliciadores, os quais ativam os mecanismos de defesa das plantas (YOSHIKAWA et al., 1993; KUHN, 2007).

As chaperonas moleculares *Hsp* apresentam papel importante na síntese e reparo de proteínas. Em células submetidas a estresse observa-se elevados níveis de *Hsp*, que auxiliam no dobramento de proteínas recém-sintetizadas, além de atuarem na renaturação de proteínas danificadas (MEYER; BUKAU, 2005). A *Hsp70* atua ainda inibindo a apoptose, apresentando assim um importante papel na manutenção da viabilidade da célula (MOSSER et al., 1997). Portanto, o incremento na atividade da *Hsp70* é condizente com o maior teor de proteínas observado no tratamento com *P. indica* + *P. nicotianae*.

Os experimentos envolvendo a colonização radicular de plântulas cítricas por *P. indica*, promoção de crescimento, resistência à doença e alterações bioquímicas foram conduzidos, pelo menos, em dois momentos diferentes, não sendo observados efeitos significativos de *P. indica* na promoção do crescimento e/ou controle da doença avaliada.

Contudo, na literatura, inúmeros trabalhos relatam os efeitos benéficos promovidos por *P. indica* tanto no crescimento de plantas, na melhoria da tolerância a estresses abióticos e no controle de doenças. Plantas de cevada infectadas com *P. indica* demonstraram resistência a *F. culmorum* e *C. sativus*, dois patógenos radiculares, e *B. graminis* f. sp. *hordei*, um patógeno de parte aérea. Uma vez que o fungo não infecta folhas, proteção contra patógenos de folhas requer uma resposta sistêmica originada nas raízes infectadas com o endofítico. Também se observou resistência a estresse salino, visto que plantas colonizadas com *P. indica* apresentaram incrementos nos níveis de biomassa quando cultivadas sob moderados níveis de NaCl (100 mM), porém não sob níveis elevados (200 mM) (WALLER et al., 2005). Bagde, Prasad e Varma, (2011) observaram aumentos no crescimento, na biomassa da planta e das flores, além de aumentos na produção de óleo a partir de sementes de variedades de girassol (*Helianthus annuus*), inoculadas com filtrado de cultivo de *P. indica*.

Quando experimentos foram conduzidos em vasos, *P. indica* proporcionou incrementos na biomassa de plantas de trigo, bem como redução nos níveis de doença ocasionados por três patógenos: o patógeno radicular *F. culmorum*, o patógeno de haste *Pseudocercospora herpotrichoides* e o patógeno de folha *B. graminis* f. sp. *tritici* (SERFLING et al., 2007). Por outro lado, quando *P. indica* foi testada em condições de campo, somente foram observados incrementos na biomassa de plantas de trigo em solos pobres, quando comparado ao controle. Não foi observada redução nos sintomas ocasionados por vários patógenos foliares que ocorreram sob condições naturais no campo, sendo apenas observados efeitos sobre *P. herpotrichoides*. Dessa maneira, Serfling et al. (2007) observaram alguns pontos que merecem atenção nos estudos com o endofítico: ele não foi capaz de crescer em temperaturas baixas como o patógeno *P. herpotrichoides*; seu efeito, quando testado em condições de campo, foi observado apenas em solo pobre. Por fim, os autores comentam que *P. indica* não possui uma boa adaptação para crescimento em temperaturas mais baixas e, portanto, poderia ser interessante testar se o endofítico é capaz de proporcionar incrementos na produção de grãos em solos pobres, sem fertilização, especialmente, em climas quentes, em que o endofítico pode apresentar melhor desempenho no controle de patógenos locais.

Algumas considerações podem ser feitas em busca da explicação para *P. indica* não apresentar efeitos na promoção de crescimento e/ou no controle de

doenças em plântulas de citros e faia. Uma explicação para o resultado poderia estar relacionada ao fato de que para o cultivo das plântulas e colonização do endofítico utilizou-se solo autoclavado, o qual pode não ter proporcionado condições ideais para o crescimento do fungo. Além disso, *P. indica* coloniza o sistema radicular de citros, porém este pode ocorrer em níveis insuficientes para expressar seu potencial promotor de crescimento e/ou no controle de doenças. Outro aspecto é que, para a interação citros - *P. nicotianae*, *P. indica* não seja efetiva, ou seja, o endofítico não é capaz de atuar no controle do patógeno, apesar de colonizar plântulas de citros e ativar alguns mecanismos de defesa.

Alguns aspectos permanecem obscuros quanto a interação de *P. indica* com plântulas cítricas e seu efeito sobre *P. nicotianae*. Este estudo trata-se de trabalho inicial na elucidação dos mecanismos envolvidos nesta interação. Em trabalhos futuros, deve-se determinar o percentual de raízes colonizadas com o endofítico, testar o mesmo em solos com diferentes níveis de fertilidade e sem autoclavagem e, em paralelo, testar o mesmo em patossistemas com resultados sabidamente positivos.

Outro aspecto que deve ser objeto de estudos futuros refere-se a uma possível associação de *P. indica* a fungos micorrízico para a expressão de seu potencial como indutor a estresses bióticos e abióticos. O endofítico foi descoberto como contaminante de *Glomus mosseae* (VERMA et al., 1998). No presente trabalho, quando plantas de faia foram inoculadas com *P. indica* e analisadas após um ano, observou-se a presença do fungo micorrízico *Sphaerospora brunnea*. Estudos futuros devem ser conduzidos neste sentido.

Por sua vez, Romeiro (2008) afirma que a estratégia mais correta no futuro será encontrar a forma mais inócua possível de ativar os mecanismos de defesa da planta, fazendo assim, com que ela mesma se defenda contra o ataque de agentes fitopatogênicos, em vez da utilização massiva de defensivos. Inclui, inclusive, explorar a variabilidade genética dentro de populações de plantas cultivadas para melhorar a utilizada da SAR e ISR no campo (VALLAD, GOODMAN, 2004).

Contudo, conforme mencionado anteriormente, a indução de resistência proporciona níveis de controle de 20 a 85%, além de ser fortemente influenciada pelas condições as quais a planta está exposta (WALTERS; RATSEP; HAVIS, 2015). Por isso, estas formas de defesa da planta não devem ser utilizadas isoladamente no controle de doenças de plantas (WALTERS; RATSEP; HAVIS,

2015), devendo ser mais uma ferramenta, parte de um programa de manejo integrado de doenças (VALLAD; GOODMAN, 2004). Por outro lado, cuidados devem ser tomados pois, pode haver um custo metabólico envolvido na ativação de mecanismos de defesa, o qual pode ter reflexos na produtividade, bem como, a resistência desencadeada à um patossistema pode resultar em suscetibilidade a outro ou a ação de herbívoros, por exemplo (VALLAD; GOODMAN, 2004).

3.5 Conclusões

A técnica de inoculação utilizando discos de micélio não foi efetiva para a colonização de plântulas de faia por *Piriformospora indica*. Por outro lado, a inoculação concomitante com filtrado e micélio permitiu a detecção do endofítico no sistema radicular de faia. Dados com relação ao controle de *Phytophthora plurivora* em faia através de *P. indica* não foram obtidos.

Piriformospora indica inoculada através de micélio é capaz de colonizar plântulas cítricas, o que foi comprovado através de análises histológicas e moleculares. O endofítico apresenta potencial na ativação do status de defesa de tangerina 'Sunki', sendo que esta ativação, aparentemente, não é efetiva para o patógeno em questão *Phytophthora nicotianae*.

Referências

- ACHATZ, B. **Untersuchungen zum Einfluss des Wurzelendophyten *Piriformospora indica* auf das Wachstum von *Hordeum vulgare*, die Resistenz gegen *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* und die Genexpression in den Blättern.** 2006. 203 p. Dissertation (Master) - Marburg University, Marburg, 2006.
- ANDERSEN, C.L.; JENSEN, J.L.; ORNTTOFT, T.F. Normalization of real-time transcription-PCR data: a model-base variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, Baltimore, v.64, p.5245-5250, 2004.
- ANITH, K.N.; FASEELA, K.M.; ARCHANA, P.A.; PRATHAPANK.D. Compatibility of *Piriformospora indica* and *Trichoderma harzianum* as dual inoculants in black pepper (*Piper nigrum* L.). **Symbiosis**, Philadelphia, v. 55, p. 11–17, 2011.
- ANTONIOW, J.F.; RITTER, C.E.; PIERPOINT, W.S.; VAN LOON, L.C. Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. **Journal of General Virology**, London, v. 47, p. 79-87, 1980

ARAÚJO, J.R.G. **Caracterização química, bioquímica e horticultural de microtangerinas (*Citrus* spp.), de valor potencial como porta-enxertos.** 1998. 155 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 1998.

BAGDE, U.S.; PRASAD, R.; VARMA, A. Influence of culture filtrate of *Piriformospora indica* on growth and yield of seed oil in *Helianthus annuus*. **Symbiosis**, Philadelphia, v. 53, p. 83–88, 2011.

BALTRUSCHAT, H.; FODOR, J.; HARRACH, B.D.; NIEMCZYK, E.; BARNA, B.; GULLNER, G.; JANECHKO, A.; KOGE, K.H.; SCHÄFER, P.; SCHWARCZINGER, I.; ZUCCARO, A.; SKOCZOWSKI, A. Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants. **New Phytologist**, Cambridge, v. 180, n. 2, p. 501-510, 2008.

BÖHM J.; HAHN, A.; SCHUBERT, R.; BAHNWEG, G.; ADLER, N.; NECHWATAL, J.; OEHLMANN, R.; OSSZWALD, W. Real-time quantitative PCR: DNA determination in isolated spores of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and monitoring of *Phytophthora infestans* and *Phytophthora citricola* in their respective host plants. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 147, p. 409–16. 1999.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAGA, M.R. Fitoalexinas. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular.** Piracicaba: FEALQ, 2008. cap. 9, p. 305-346.

CHABAUD, M.; HARRISON, M.; CARVALHO-NIEBEL, F.; GUILLAUME BÉCARD, G.; BARKER, D.G. Inoculation and growth with mycorrhizal fungi. In: MATHESIU, U.; JOURNET, E.P.; SUMNER, L.W. (Ed.). **The *Medicago truncatula* handbook.** Ardmore: Samuel Roberts Noble Foundation, 2006. chap. 1, p. 1-15.

DE MEYER, G.; HÖFTE, M. Salicylic acid produced by the Rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, No. 6, p. 588-593, 1997.

FAKHRO, A.; ANDRADE-LINARES, D.R.; VON BARGEN, S.; BANDTE, M.; BÜTTNER, C.; GROSCH, R.; SCHWARZ, D.; FRANKEN, P. Impact of *Piriformospora indica* on tomato growth and on interaction with fungal and viral pathogens. **Mycorrhiza**, Gresham, v. 20, p. 191-200, 2010.

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

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. Araraquara, 2008. Disponível em: <<http://fundecitrus.com.br/doencas>>. Acesso em 20 mar. 2009.

GARCÍA-MONTERO, L.G.; DI MASSIMO, G.; MANJÓN, J.L.; GARCÍA-CAÑETE, J. Effect of *Sphaerospora brunnea* mycorrhizas on mycorrhization of *Quercus ilex* x *Tuber melanosporum*. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, Wellington, v. 36, p. 153-158, 2008.

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. cap. 7, p. 249-283.

IPPOLITO, A.; SCHENA, L.; NIGRO, F. Detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. citrophthora* in citrus roots and soils by nested PCR. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, p. 855–868, 2002.

JACOBS, S.; ZECHMANN, B.; MOLITOR, A.; TRUJILLO, M.; PETUTSCHNIG, E.; LIKPA, V.; KOGE, K.H.; SCHAFER, P. Broad-spectrum suppression of innate immunity is required for colonization of *Arabidopsis* roots by the fungus *Piriformospora indica*. **Plant Physiology**, Washington, v. 156, p. 726-740, 2011.

JUNG, T.; COOKE, D.E.L.; BLASCHKE, H.; DUNCAN, J.M.; OßWALD, W. *Phytophthora quercina* sp. nov., causing root rot of European oaks. **Mycological Research**, Cambridge, v. 103, p. 785-798, 1999.

KALDORF, M.; KOCH, B.; REXER, K.H.; KOST, G.; VARMA, A. Patterns of interaction between *Populus* Esch5 and *Piriformospora indica*: a transition from mutualism to antagonism. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 7, p. 210–218, 2005.

KOMBRINK, E.; HAHNBROCK, K. Response of cultured parsley cells to elicitors from phytopathogenic fungi: timing and dose dependency of elicitor-induced reactions. **Plant Physiology**, Washington, v. 81, n. 1, p. 216-221, 1986.

KOST, G.; REXER, K-H. Morphology and Ultrastructure of *Piriformospora indica*. In: A. VARMA, A.; KOST, G.; OELMÜLLER, R. (Ed.) ***Piriformospora indica*: sebacinales and their biotechnological applications**. Berlin: Springer-Verlag, 2013. chap. 2, p. 25-36.

KUHN, O.J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**. 2007. 140 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

KUMAR, M.; YADAV, V.; TUTEJA, N.; JOHRI, A.K. Antioxidant enzyme activities in maize plants colonized with *Piriformospora indica*. **Microbiology**, New York, v. 155, p. 780–790, 2009.

KUMAR, M.; YADAV, V.; KUMAR, H.; SHARMA, R.; SINGH, A.; TUTEJA, N.; JOHRI, A.K. *Piriformospora indica* enhances plant growth by transferring phosphate. **Plant Signaling & Behavior**, Bonn, v. 6, p. 723-725, 2011.

LUSSO, M.F.G.; PASCHOLATI, S.F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 25, n.3, p. 244-249, 1999.

MAFRA, V.; KUBO, K.S.; ALVES-FERREIRA, M.; RIBEIRO-ALVES, M.; STUART, R.M.; BOAVA, L.P.; RODRIGUES, C.M.; MACHADO, M.A. Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n.2, p. 1-11, 2012.

MATHERON, M.E.; MIRCETICH, S.M. Pathogenicity and relative virulence of *Phytophthora* spp. from walnut and other plants to rootstocks of English walnut trees. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 75, p. 977-981, 1985.

MAURHOFER, M.; HASE, C.; MEUWLY, P.; MÉTRAUX, J.-P.; DÉFAGO, G. Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, p. 139-146, 1994.

MESSIAS, U. **Atividade da superóxido dismutase, catalase, peroxidases e acúmulo de H₂O₂ associados à infecção de um *Carlavirus* em soja e um *Potyvirus* no feijoeiro**. 2008. 92 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

MEYER, M.P.; BUKAU, B. Hsp70 Chaperones: cellular functions and molecular mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 62, n. 6, p. 670-684, 2005.

MOLITOR, A.; ZAJIC, D.; VOLL, L.M.; PONS-KÜHNEMANN, J.; SAMANS, B.; KOGEL, K.H.; WALLER, F. Barley leaf transcriptome and metabolite analysis reveals new aspects of compatibility and *Piriformospora indica*-mediated systemic induced resistance to powdery mildew. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 24, p. 1427–1439, 2011.

MOLLER, I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 561-91. 2001.

MOSSER, D.D.; CARON, A.W.; BOURGET, L.; DENIS-LAROSE, C.; MASSIE, B. Role of the human heat shock protein HSP70 in protection against stress-induced apoptosis. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 17, p. 5317-5327, 1997.

MOUNDE, L.G.; ATEKA, E.M.; KIHURANI, A.W.; WASILWA, L. Morphological characterization and identification of *Phytophthora* species causing citrus gummosis in Kenya. **African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development**, Nairobi, v. 12, n. 7, p. 7072-7087, 2012.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 20 jun. 2015.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 49, p. 249–279, 1998.

PARK, J.; NGUYEN, K.T.; PARK, E.; JEON, J-S.; GILTSU CHOIA, G. DELLA
Proteins and their interacting RING finger proteins repress gibberellin responses by
binding to the promoters of a subset of gibberellin-responsive genes in arabidopsis.
Plant Cell, Rockville v. 25, n. 3, p. 927–943, 2013.

PASCHOLATI, S.F.; BLUMER, S.; REZENDE, D.C.; BRAND, S.C. Resistência
Sistêmica Adquirida (SAR) x Resistência Sistêmica Induzida (ISR). In:
UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. Núcleo de Estudos em Fitopatologia.
(Org.). **Indução de resistência: novos conceitos e aplicações**. Brasília: Sociedade
Brasileira de Fitopatologia, 2010. p. 29-40.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool
(REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression
results in real time PCR. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v. 30, e36, 2002.

PIFFI, S. **Molekulare der kompatiblen Interaktion von *Piriformospora indica*
mit Gerste (*Hordeum vulgare* L.)**. 2009. 124 p. Dissertation (Doktorgrades der
Naturwissenschaftlichen Fachbereiche), Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen,
2009.

PIETERSE, C.M.; VAN WEES, S.C.; HOFFLAND, E.; VAN PELT, J.A.; VAN LOON,
L.C. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is
independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene
expression. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 8, p. 1225-37, 1996.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREZ, R.H.; MOORMAN, A.F. Assumption free
analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data.
Neuroscience Letters, New Haven, v. 13, p. 62-66, 2003.

ROMA, R.C.C. **Fosforo de potássio no controle de doenças pós-colheita em
bagas de uva 'Itália' e possíveis mecanismos de ação à *Rhizopus stolonifer***.
2013. 117 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura
"Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

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. cap. 13, p. 411-
431.

SCHÄFER, P.; KOGEL, K-H. The sebacinoid fungus *Piriformospora indica*: an orchid
mycorrhiza which may increase host plant reproduction and fitness. In: DEISING,
H.B. (Ed.). **Plant relationships**. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2009. chap. 5,
p. 99-112.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.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. cap. 6, p. 227-248.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**,
Cambridge, v. 109, p. 661–686, 2005.

- SERFLING, A.; WIRSEL, S.G.R.; LIND, V.; DEISING, H.B. Performance of the biocontrol fungus *Piriformospora indica* on wheat under greenhouse and field conditions. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, p. 523-531, 2007.
- SHARMA, M.; SCHMID, M.; ROTHBALLER, M.; HAUSE, G.; ZUCCARO, A.; IMANI, J.; KÄMPFER, P.; DOMANN, E.; SCHÄFER, P.; HARTMANN, A.; KARL-HEINZ KOGEL, K.-H. Detection and identification of bacteria intimately associated with fungi of the order Sebaciniales. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 10, n. 11, p. 2235–2246, 2008.
- SHERAMETI, I.; SHAHOLLARI, B.; VENUS, Y.; ALTSCHMIED, L.; VARMA, A.; OELMÜLLER, R. The endophytic fungus *Piriformospora indica* stimulates the expression of nitrate reductase and the starch-degrading enzyme glucan-water dikinase in tobacco and *Arabidopsis* roots through a homeodomain transcription factor that binds to a conserved motif in their promoters. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 280, p. 26241-26247, 2005.
- SHERAMETI, I.; TRIPATHI, S.; VARMA, A.; OELMÜLLER, R. The root-colonizing endophyte *Piriformospora indica* confers drought tolerance in *Arabidopsis* by stimulating the expression of drought stress-related genes in leaves. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 21, p. 799-807, 2008.
- SILVER, N.; BEST, S.; JIANG, J.; THEIN, S.L. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, London, v. 7, n. 33, p. 1-14, 2006.
- SIRRENBURG, A.; GÖBEL, C.; GROND, S.; CZEMPINSKI, N.; RATZINGER, A.; KARLOVSKY, P.; SANTOS, P.; FEUSSNER, I.; PAWLOWSKI, K. *Piriformospora indica* affects plant growth by auxin production. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 131, p. 581–589, 2007.
- STEIN, E.; MOLITOR, A.; KOGEL, K.H.; WALLER, F. Systemic resistance in *Arabidopsis* conferred by the mycorrhizal fungus *Piriformospora indica* requires jasmonic acid signaling and the cytoplasmic function of NPR1. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, 49:1747-1751, 2008.
- SUN, C.; OELMÜLLER, R. *Piriformospora indica* hyphae and chlamydospores by scanning electron microscopy. **Journal of Endocytobiosis and Cell Research**, Thuringia, v. 10, p. 34-37, 2010.
- SUN, C.; JOHNSON, J.M.; CAI, D.; SHERAMETI, I.; OELMÜLLER, R.; LOU, B. *Piriformospora indica* confers drought tolerance in Chinese cabbage leaves by stimulating antioxidant enzymes, the expression of drought-related genes and plastid-localized CAS protein. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 167, p. 1009-1017, 2010.
- SUN, C.; SHAO, Y.; VAHABI, K.; LU, J.; BHATTACHARYA, S.; DONG, S.; YEH, K.-W.; SHERAMETI, I.; LOU, B.; BALDWIN, I.T.; OELMÜLLER, R. The beneficial fungus *Piriformospora indica* protects *Arabidopsis* from *Verticillium dahlia* infection by downregulation plant defense responses. **BMC Plant Biology**, London, v. 14, n. 268, p. 1-16, 2014.

UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 34, n.1, p. 68-71, 2006.

VALLAD, G.E.; GOODMAN, R.M. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. **Crop Science**, Madison, v. 44, p. 1920-1934, 2004.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PEAPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, London, v. 3, n. 7, p. 1-11, 2002.

VERMA, S.; VARMA, A.; REXER, KH.; HASSEL, A.; KOST, G.; SARBHOY, A.; BISEN, P.; BUTEHORN, B.; FRANKEN, P. *Piriformospora indica*, gen. et sp. nov., a new root-colonizing fungus. **Mycologia**, New York, v. 90, p. 896-903, 1998.

WALLER, F.; MUKHERJEE, K.; ACHATZ, B.; DESHMUKH, S.; SHARMA, S.; SCHÄFER, P.; KOGL, K.H. Systemic and local modulation of plant responses by *Piriformospora indica* and related Sebaciniales species. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 165, p. 60–70, 2008.

WALLER, F.; ACHATZ, B.; BALTRUSCHAT, H.; FODOR, J.; BECKER, K.; FISCHER, M.; HEIER, T.; HÜCKELHOVEN, R.; NEUMANN, C.; VON WETTSTEIN, D.; FRANKEN, P.; KOGL, K.H. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 102, p. 13386–13391, 2005.

WALTERS, D.R.; RATSEP, J.; HAVIS, N.D. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 64, n. 5, p. 1263-1280, 2015.

WATTHANAKARNKITIKUN, A. **Effects of the endophytic fungus *Piriformospora indica* on the susceptible interaction between Beech (*Fungus sylvatica*) and *Phytophthora plurivora***. 2012. 71 p. Thesis (Master) - Technische Universität München, Freising, 2012.

YOSHIKAWA, M.; TSUDA, M.; TAKEUCHI, Y. Resistance to fungal diseases in transgenic tobacco plants expressing the phytoalexin elicitor-releasing factor, β -1,3-glucanase, from soybean. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 80, n. 9, p. 417-420, 1993.

Apêndice

Apêndice A – Meio de cultura para o cultivo de *Piriformospora indica* (ACHATZ, 2006)

Reagente	Quantidade (g)	Volume
Glicose	20	
Peptona	2	
Extrato de Levedura	1	949 mL
Caseína	1	
Ágar	15	
Nitrato de sódio	6	
Cloreto de potássio	0,520	50 mL
Sulfato de Magnésio	0,520	
Dihidrogênio fosfato de potássio	1,520	
Cloreto de Manganês	0,600	
Ácido Bórico	0,150	
Sulfato de Zinco	0,265	1 mL
Iodeto de Potássio	0,075	
Molibdato de Sódio	0,00024	
Sulfato de Cobre	0,013	