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

**Histologia e bioquímica da interação entre porta-enxertos de citros resistente e suscetível a
*Phytophthora nicotianae***

Maria Eugenia Escanferla

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

**Piracicaba
2011**

Maria Eugenia Escanferla
Licenciada e Bacharel em Ciências Biológicas

Histologia e bioquímica da interação entre porta-enxertos de citros resistente e suscetível a
Phytophthora nicotianae

Orientador:
Prof. Dr. NELSON SIDNEI MASSOLA JÚNIOR

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

Piracicaba
2011

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

Escanferla, Maria Eugenia

Histologia e bioquímica da interação entre porta-enxertos de citros resistente e suscetível a *Phytophthora nicotianae* / Maria Eugenia Escanferla. - - Piracicaba, 2011.

101 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Citrumelo 2. Compostos fenólicos 3. Etileno 4. Frutas cítricas 5. Fungos fitopatogênicos 6. Gomose 7. Histologia 8. Porta-enxertos - Resistência 9. Tangerina
I. Título

CDD 634.3
E74h

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

Aos meus pais Satie e Luiz pelo amor e auxílio em todos os momentos;

A minha irmã Ana Carolina pela amizade e carinho;

Ao Bruno pelo apoio, amizade, compreensão e carinho sempre.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por essa oportunidade;

Aos meus pais Satie e Luiz, a minha irmã Ana Carolina, ao Bruno e a minha gatinha Pink pelo intenso apoio, força e carinho;

A Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP) e ao Departamento de Fitopatologia e Nematologia, pelas condições oferecidas;

Ao CNPq pela bolsa concedida;

Ao Professor Doutor Nelson Sidnei Massola Júnior pela orientação;

Ao Fundecitrus e ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira pelo fornecimento de sementes;

Ao Doutor Osswald Wolfgang da Universidade Técnica de Munique pela orientação e auxílio;

Ao Professor Doutor Marcilio de Almeida do departamento de Ciências Biológicas da ESALQ/USP pela orientação em determinados experimentos;

Ao pesquisador do Fundecitrus, o Doutor Geraldo J. Silva Junior pela amizade e auxílio;

As amigas Erika Mendes Graner e Eveline Calderan e também a todos do Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas pelo auxílio, paciência e bons momentos;

Ao amigo Doutor André B. Beltrame pelo auxílio e amizade;

Ao pesquisador Dr. Frank Fleischmann e ao estudante de doutorado Ronaldo Dalio, ambos da Universidade Técnica de Munique pela orientação e auxílio;

A todos os professores do Departamento de Fitopatologia e Nematologia e de demais áreas de ensino pelos ensinamentos concedidos;

A todos os funcionários do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, em especial Fabiana, Vera, Jeferson, Edivaldo, Fernanda e Rodolfo, pela amizade e auxílio;

Aos meus queridos tios e tias, primos e primas que tanto me auxiliaram, deram apoio e trouxeram maravilhosos bons momentos todos esses anos, em especial a minha tia Tieko Omote pelo carinho, hospedagens, risadas e amizade;

Aos amigos Robson Armindo, Joze Correa, Lígia Hansen, Cassiara Gonçalves, Juliana Ruiz, Helen Penha, Jéssica Tsuda, Daniela Flôres, Pedro Córdova, Ana Raquel Colleti, Sylvia Moraes, Ely Garcia, Heitor Arakawa, Viviani Marques, Daiana Alves, Daiana Martil, Denise Mantovani, Matheus Nunes, Guilherme Frare, Vanessa Frare pelos conselhos e boas risadas;

Ao professor de inglês Antonio A. Bianchi pelo auxílio e momentos de descontração;

A Academia Betty Training, especialmente as professoras Anita, Betty e Geovana que muito me ajudaram a manter a saúde e a animação durante todos esses anos em Piracicaba;

A turma e ao professor de espanhol Ivan do CCAA, em especial a Camila Mariah, Letícia e Vanessa pelas aulas, risadas, amizade e muita comilança;

A minha psicóloga Faride Simão, que muito me ajudou nos momentos de ansiedade;

Aos amigos do centro espírita Sementes de Luz pelas boas vibrações, em especial a meninada da pré-mocidade pelas risadas nas aulinhas;

A todos meus amigos da graduação, em Ciências Biológicas, na UEL. Bons momentos na memória até hoje;

Aos funcionários da biblioteca em especial a Eliana e a Silvia, pela disposição em ajudar, bom humor e auxílio nas correções;

Aos colegas do laboratório, em especial Juliana, Carolina, Isabela, Ananias, Hugo, Carlos e Wagner;

A todos os alunos do Departamento de Fitopatologia e Nematologia pela amizade;

As amigas Doutora Luzia D. Paccola-Meirelles e Doutora Edneia A. de Souza-Paccola pela amizade e auxílio na minha formação profissional desde a graduação;

A todos que seja por meio da amizade, de bons conselhos ou risadas direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho.

“Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta.”

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar... As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”

Francisco Cândido Xavier

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 A citricultura	19
2.2 Uso de porta-enxertos em citros	22
2.3 O gênero <i>Phytophthora</i> e doenças causadas em citros	25
2.4 Reconhecimento de hospedeiros pelo gênero <i>Phytophthora</i> e mecanismos de interação	29
2.5 Reconhecimento de patógenos do gênero <i>Phytophthora</i> por hospedeiros e mecanismos de interação	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Local de condução dos experimentos	37
3.2 Obtenção, cultivo e preparo do inóculo a partir de isolado de <i>Phytophthora nicotianae</i>	37
3.3 Obtenção, cultivo e preparo das plântulas de porta-enxerto de citros	38
3.4 Estudo histológico por microscopia de luz	38
3.5 Estudo histológico por microscopia confocal	40
3.6 Estudo histológico da superfície das raízes de citros	41
3.7 Detecção de compostos fenólicos e lignina por microscopia de luz em tecido fresco	42
3.8 Detecção de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência	42
3.9 Detecção de etileno	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 Estudo histológico por microscopia de luz	47
4.2 Estudo histológico por microscopia confocal	54
4.3 Análise de superfície das raízes de citros	60
4.4 Detecção de compostos fenólicos e lignina por microscopia de luz em tecido fresco	68
4.5 Detecção de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência	79
4.6 Detecção de etileno	83
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
REFERÊNCIAS	89
ANEXOS	99

RESUMO

Histologia e bioquímica da interação entre porta-enxertos de citros resistente e suscetível a *Phytophthora nicotianae*

No Brasil *Phytophthora nicotianae* é um dos principais agentes causadores da podridão do pé e de raízes e radículas em citros. As doenças provocadas pelo gênero ocasionam danos elevados à produção agrícola e o uso de porta-enxertos resistentes é medida importante para controle. Nesse trabalho objetivou-se estudar aspectos relacionados à histologia e bioquímica da interação entre *P. nicotianae* e porta-enxerto de tangerineira Sunki (suscetível) e citrumeleiro Swingle (resistente). Para tal, raízes de plântulas desses genótipos com dois, três ou seis meses foram inoculadas com suspensão de 10^5 zoósporos/mL de *P. nicotianae* e mantidas a 25°C. As análises foram realizadas em microscópio de luz (ML) e confocal (MC), em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em cromatógrafo a gás (CG) e em microscópio eletrônico de varredura (MEV). Em ML, as secções de raízes coradas com azul de toluidina um, dois, quatro e seis dias após a inoculação (dai) indicaram diferenças entre os porta-enxertos no modo e na velocidade de colonização do patógeno. O hospedeiro resistente apresentou menor número de hifas nos tecidos e essas se localizaram principalmente nos espaços intercelulares. Em MC, analisou-se a distribuição da elicítina do patógeno em secções de raízes um, dois e quatro dai. A elicítina foi detectada em menor quantidade e mostrou concentração constante em raízes de citrumeleiro Swingle e em quantidade maior e em gradual aumento em raízes tangerineira Sunki. Análises da superfície das raízes em MEV, 1, 2 e 4 horas após a inoculação, revelaram menor número de cistos do patógeno sobre o hospedeiro resistente no tempo de 2 horas. Testes histoquímicos com cloreto de zinco iodado e cloreto férrico para a detecção, respectivamente, de lignina e compostos fenólicos, em secções a fresco de raízes dos porta-enxertos um, três e seis dai foram visualizadas em ML e evidenciaram ausência de alteração nos níveis desses compostos entre raízes inoculadas e não inoculadas. A análise em CLAE, três dai, demonstrou que ambos os porta-enxertos, possuem compostos fenólicos em suas raízes. Entretanto, não houve diferença qualitativa e quantitativa destes compostos em plantas de um mesmo genótipo não inoculado e inoculado com *P. nicotianae*. Porém, diferenças quantitativas foram observadas entre ambos os genótipos. Em citrumeleiro Swingle encontrou-se menor quantidade de equivalentes em ácido clorogênico e apigenina e maior quantidade de equivalentes em rutina, quando comparado à tangerineira Sunki. A produção de etileno dos genótipos, analisada em CG, foi avaliada durante dez dai. O hospedeiro suscetível inoculado apresentou maior produção do gás comparado ao controle, do primeiro ao sexto dia. O hospedeiro resistente inoculado e não inoculado não apresentaram diferenças na produção do gás durante o ensaio. Esses resultados indicam diferenças na interação entre *P. nicotianae* e plântulas de citrumeleiro Swingle e tangerineira Sunki. Todavia, não esclarecem os mecanismos pelos quais essas diferenças ocorrem. Tais resultados fornecem subsídios para estudos sobre os mecanismos envolvidos na resistência de genótipos de citros à *P. nicotianae*.

Palavras-chave: Tangerineira Sunki; Citrumeleiro Swingle; Phytophthora; Gomose; Histologia; Compostos fenólicos; Etileno; Resistência

ABSTRACT

Histology and biochemistry of the interaction between resistant and susceptible citrus rootstocks to *Phytophthora nicotianae*

In Brazil *Phytophthora nicotianae* is one of the main causal agents of foot and root rot in citrus. Diseases caused by this genus are responsible for significant losses in agricultural production and the use of resistant rootstocks is an important control procedure. This work aimed to study aspects related to histology and biochemistry of the interaction between *P. nicotianae* and Swingle citrumelo (resistant) and Sunki tangerine (susceptible) rootstocks. For this purpose, roots of two, three or six months old seedlings of both genotypes were inoculated with a suspension of 10^5 zoospores/mL of *P. nicotianae* and kept at 25°C. Analyses were performed with light (LM) and confocal (CM) microscope, with high performance liquid chromatograph (HPLC), with gas chromatograph (GC) and, with scanning electron microscope (SEM). In LM, root sections stained with toluidine blue one, two, four and six days after inoculation (dai) indicated differences in the mode and speed of colonization of the pathogen between the rootstocks. The resistant host showed a lower number of hyphae inside its tissue, mainly in the intercellular spaces. In CM, the pathogen elicitin distribution was analyzed in root sections one, two and four dai. The elicitin amount was lower and apparently stable in Swingle citrumelo root and it was higher and increasing gradually in Sunki tangerine roots. Roots surface analysis by SEM, 1, 2 and 4 hours after inoculation, indicated fewer pathogen cysts on resistant host at 2 hours. Histochemical tests in fresh root sections with iodized zinc chloride and ferric chloride for detection, respectively, of lignin and phenolic compounds were seen one, three and six dai in LM. The results showed no change in levels of these compounds in roots of inoculated and uninoculated rootstocks. HPLC root analysis, three dai, revealed that both rootstocks, inoculated and uninoculated, had phenolic compounds. However, there was no qualitative and quantitative difference in phenolic compounds between inoculated and uninoculated plants of the same genotype. Quantitative differences were observed between both hosts. There was lower concentration of apigenin and chlorogenic acid equivalents and higher concentration of rutin equivalents in Swingle citrumelo as compared to Sunki tangerine. Production of ethylene by the genotypes was analyzed in GC during 10 dai. The susceptible host, when inoculated, showed higher ethylene production compared to control from the first to the sixth day. The resistant host, inoculated or not, showed no difference in ethylene production during the test. These results indicate differences in the interaction between *P. nicotianae* and seedlings of Swingle citrumelo and Sunki tangerine. Nevertheless, they do not clarify the mechanisms through which these differences occur. These results indicate some points where further studies should concentrate on the resistance mechanisms of citrus genotypes against *P. nicotianae*.

Keywords: Sunki tangerine; Swingle citrumelo; *Phytophthora*; Gummosis; Histology; Phenolic compounds; Ethylene; Resistance

1 INTRODUÇÃO

A citricultura está amplamente distribuída pelo mundo e é economicamente importante nas regiões subtropicais e tropicais, onde as condições edafoclimáticas são adequadas para o seu desenvolvimento (DAVIES; ALBRIGO, 1994). A produção mundial de citros em 2009 totalizou cerca de 120 milhões de toneladas, sendo que aproximadamente 56% correspondem a frutos de laranja (FAO, 2011). O Brasil é o maior produtor mundial de citros, sendo que o fruto de laranja correspondeu em 2009 a 89% dos citros produzidos no país (FAO, 2011; FNP, 2011).

A produção brasileira em 2010 foi de 18.340.240 toneladas e entre os estados brasileiros produtores dessa fruta, destaca-se o estado de São Paulo com cerca de 78% da produção nacional (FNP, 2011). Esse estado apresenta condições climáticas favoráveis à cultura, além da proximidade e garantia de mercado (AMARO; MAIA, 1997).

As plantas cítricas podem ser multiplicadas por sementes (via sexual), por estaquia e enxertia (via assexual), sendo essa última a forma comercialmente utilizada no Brasil (MACHADO FILHO et al., 2003). O processo de enxertia foi adotado buscando a frutificação precoce por meio da supressão de juvenilidade, plantas de tamanho uniforme, controle de produção e qualidade do fruto, tolerância a condições desfavoráveis do solo e tolerância a *Phytophthora* spp., viroses e nematóides (WUTSCHER, 1991). Pompeu Junior (1991) afirma que o uso generalizado de um único tipo de porta-enxerto em diferentes climas, tipos de solo e copa pode levar à não adequação do mesmo e, desse modo, não permitir que a planta manifeste todo seu potencial produtivo. Dessa forma, pesquisa e experimentação são necessárias para que outros porta-enxertos sejam desenvolvidos e usados (POMPEU JUNIOR, 1991).

A diversificação dos porta-enxertos vem ocorrendo na citricultura nacional devido ao surgimento recorrente de doenças cuja disseminação é favorecida pela falta de diversificação dos pomares brasileiros. Em 2003, constatou-se nos viveiros do estado de São Paulo, a adoção de 40% do limoeiro Cravo (*Citrus limonia* Osbeck), 33% da tangerineira Cleópatra (*C. reshni* hort. ex Tanaka), 14% do citrumeleiro Swingle [*C. paradisi* Macfad. cv. Duncan X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.], 7% da tangerineira Sunki (*C. sunki* hort. ex Tanaka), 3% do limoeiro Volkameriano (*C. volkameriana* V. Ten. & Pasq.), 3% do Trifoliata (*P. trifoliata*) e menos de 1% dos porta-enxertos de laranjeira Caipira [*C. sinensis* (L.) Osbeck], citrangeiro Carrizo [*P. trifoliata* x *C.*

sinensis cv. Wahington Navel] e tangeleiro Orlando (*C. tangerina* hort. ex Tanaka cv. Dancy x *C. paradisi*) (POMPEU JUNIOR, 2005).

Diversas doenças dos citros têm limitado a produtividade de pomares, e aquelas causadas pelo gênero *Phytophthora* correspondem as mais sérias doenças de solo e ocorrem em todas as regiões produtoras de citros do globo (BASSAN et al., 2010; FEICHTENBERGER et al., 2005). Os danos provocados por *Phytophthora* spp. em citros são estimados em 10 a 30% da produção mundial, causando prejuízos de milhões de dólares, uma vez que afetam todas as fases de desenvolvimento dos citros e assim, sua produção (TIMMER; GARNSEY; GRAHAM, 2000; SOARES FILHO et al., 2003).

Entre as diversas manifestações da doença, a podridão do pé e as podridões de raízes e radículas são as mais comuns, principalmente em plantas jovens (FEICHTENBERGER et al., 2005). *Phytophthora* spp. patogênicas a citros são encontradas com frequência nas inspeções a viveiros comerciais em São Paulo. A utilização de mudas produzidas em viveiros contaminados a principal responsável pela elevada incidência de doenças incitadas por esses patógenos em cultivos comerciais (FEICHTENBERGER, 1996, 2001). Outros sintomas provocados por esse gênero em citros são denominados *damping-off*, lesões em folhas, brotos novos e hastes, gomose em tronco e ramos e a podridão parda de frutos (FEICHTENBERGER et al., 2005).

A incidência e a severidade das doenças causadas por *Phytophthora* spp. no Brasil têm aumentado consideravelmente nas últimas décadas (FEICHTENBERGER, 1996). Várias espécies de *Phytophthora* foram descritas como capazes de induzir doenças em plantas cítricas (FEICHTENBERGER et al., 2005). No Brasil, *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan (syn *Phytophthora parasitica* Dastur) e *Phytophthora citrophthora* (R.E. Sm. & E.H. Sm.) Leonian são os principais agentes causais da doença, sendo *P. nicotianae* a espécie predominante nas principais regiões produtoras (FEICHTENBERGER et al., 2005). No entanto, os mecanismos pelos quais determinados porta-enxertos de citros se mostram resistentes ou suscetíveis ao gênero *Phytophthora* ainda não são claros (GRAHAM, 1990, 1995; WIDMER; GRAHAM; MITCHELL, 1998).

A análise histológica de raízes infectadas demonstra menor colonização inter e intracelular nos tecidos de porta-enxertos ditos “tolerantes” do que em tecidos de porta-enxertos suscetíveis, fator indicativo de que a “tolerância” atua na inibição do crescimento de *Phytophthora* spp. (WIDMER; GRAHAM; MITCHELL, 1998). Por atuar prevenindo o

estabelecimento e restringindo a colonização do patógeno, seria mais correto o uso do termo “resistência” ao invés de “tolerância” (CAMARGO, 2011). Desse modo, “resistência” será a palavra utilizada nesse trabalho.

No nível bioquímico, há vários estudos associando compostos como as fitoalexinas às reações de defesa de plantas de citros a *Phytophthora* spp., entretanto, ainda são pouco estudadas as relações com genótipos específicos desses e de outros compostos (MEDINA FILHO et al., 2004). Sendo assim, o presente trabalho busca analisar aspectos histológicos e bioquímicos da interação de *P. nicotianae* com os porta-enxertos de citros tangerineira Sunki (suscetível) e citrumeleiro Swingle (resistente).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A citricultura

A citricultura é um ramo da fruticultura que estuda o cultivo e características de um grupo de plantas denominados citros, os quais correspondem aos frutos mais produzidos e consumidos no mundo (AUGUSTI, 2003). A produção mundial de citros totalizou em 2009 cerca de 120 milhões de toneladas (FAO, 2011).

A origem dos citros se localiza no sudeste da Ásia, sendo as referências mais antigas presentes na literatura chinesa e datadas do ano 2.200 a.C. (DORNELLES, 1988). Os citros pertencem à família Rutaceae e apresentam como principais gêneros: *Citrus*, *Poncirus* e *Fortunella*. Estão presentes em ampla faixa do globo terrestre, entre as latitudes 40° S e 40° N, sendo as regiões mais adequadas para cultivo latitudes superiores a 22 ° N e 22 ° S (DAVIES; ALBRIGO, 1994).

Destaca-se mundialmente o cultivo de laranjas, limões, limas, tangerinas, cidras, toranjas e pomelos. Dentre esses, a laranja é a fruta mais produzida e é apreciada tanto *in natura* como na forma de suco. Famosa por ser importante fonte de vitamina C, era antigamente consumida pelos navegantes para prevenir o escorbuto, doença derivada da ausência de vitamina C na dieta, é atualmente também apreciada pelo sabor e demais propriedades hoje conhecidas (DAVIES; ALBRIGO, 1994).

No Brasil as primeiras plantas cítricas foram introduzidas pelas primeiras expedições colonizadoras de portugueses no ano de 1501 e encontraram condições ótimas para seu desenvolvimento (NEVES; JANK, 2006). A citricultura apresentou seu primeiro auge no país de 1930 a 1939 e encerrou-se com a chegada da II Guerra Mundial, que paralisou o tráfego marítimo, e da doença denominada tristeza, que eliminou em poucos anos todas as plantas enxertadas em laranjeira Azeda, principal porta-enxerto no estado de São Paulo na época (MOREIRA, MOREIRA, 1991; NEVES; JANK, 2006).

Em 1957, o cancro cítrico, provocado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, atacou pomares da região sudoeste paulista, expandiu-se para os estados do Paraná e Mato Grosso e passou a ser preocupação de âmbito nacional, levando a criação do FUNDECITRUS (Fundo de Defesa da Citricultura) (MOREIRA; MOREIRA, 1991). Essa doença foi

provavelmente trazida por mudas clandestinas vindas do Japão e ainda hoje seu combate consome anualmente somas consideráveis (OUTRAS..., 2004).

O cultivo de citros no Brasil veio novamente a sobressair-se no início da década de 60, devido a fortes geadas que causaram a destruição de 13 milhões de árvores adultas na Flórida, nos Estados Unidos. Esse fato provocou o desabastecimento do mercado de suco nesse país até então o maior produtor mundial (OUTRAS..., 2004). A partir desse fato e também devido ao crescimento do mercado da fruta *in natura*, a citricultura no Brasil passou a receber ainda mais investimentos, tanto na área da tecnologia quanto na área de produção. Esses fatores fizeram com que o país iniciasse seu avanço rumo à liderança mundial, posição que ocupa desde meados dos anos 1980 (OUTRAS..., 2004; NEVES; JANK, 2006). Assim, em menos de um século, o Brasil firmou-se como maior produtor e exportador de citros do mundo (OUTRAS..., 2004).

De acordo com a FAO (2011), o Brasil e os Estados Unidos se sobressaem atualmente como produtores de destaque desse produto. O país produziu em 2009 em torno de 19 milhões de toneladas de citros e os Estados Unidos cerca de 10 milhões, sendo a produção de laranja correspondente a 89 e 77%, respectivamente (FAO, 2011). No Brasil, há cultivos desde Roraima até o Rio Grande do Sul (MOREIRA; MOREIRA, 1991). As principais regiões produtoras são o estado de São Paulo, Bahia, Sergipe e Minas Gerais, sendo que o estado de São Paulo detém cerca de 78 % da produção de laranjas no país (FNP, 2011).

Apesar do destaque brasileiro, a produção de citros apresentou recente queda, tanto no Brasil quanto nos Estados Unidos. No Brasil, da safra de 2009 para 2010 houve desvalorização da laranja para o mercado interno, na fruta para a indústria e no suco para o mercado externo (FNP, 2010). Acrescido a esse fator, observou-se entre 2003 e 2008 o declínio do consumo mundial de suco de laranja e o aumento da concorrência com bebidas substitutivas (águas com sabor, chás, bebidas isotônicas e outros sucos) (FNP, 2010).

Além disso, a cultura do citros foi e vem sendo, tanto no Brasil quanto nos Estados Unidos, prejudicada por problemas fitossanitários e econômicos. Com ênfase, o *greening* que continua avançando sobre os pomares, reduzindo a produção e elevando os custos (FNP, 2011). Essa doença vem atingindo pomares paulistas, mineiros e paranaenses (FNP, 2011). Ao mesmo tempo, o cancro cítrico em levantamento amostral sobre sua incidência, realizado pelo Fundecitrus, indicou que a doença passou de 0,14% para 0,44% nos talhões do parque citrícola paulista em 2010 (FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA - FUNDECITRUS, 2011a).

Crescimento esperado, uma vez que, em junho de 2009, a legislação de controle da doença foi atenuada. Logo após a mudança da lei, em seis meses, o número de casos novos de cancro cítrico cresceu quase 80% se comparado ao primeiro semestre de 2009 (FUNDECITRUS, 2011a).

Apesar dessas dificuldades, as cotações internacionais do valor do suco vêm subindo substancialmente desde o primeiro semestre de 2010, consequência da redução da oferta e da recuperação da economia dos países desenvolvidos (FNP, 2011). Outro fator positivo para a citricultura foi a oficialização, em março de 2011 pela OMC (Organização Mundial do Comércio), que determinadas taxas *antidumping* impostas pelos Estados Unidos sobre as importações de suco de laranja produzido no Brasil violam as leis do comércio internacional (FOLHA DE SÃO PAULO, 2011). O governo brasileiro espera, dessa forma, que a decisão pressione os Estados Unidos a mudar suas regras internas, o que vai beneficiar diversos países e indústrias que estão sob penalidades de defesa comercial (FOLHA DE SÃO PAULO, 2011).

Além disso, o mercado interno de frutas de mesa vem expandindo-se devido a elevação de renda da população brasileira, devido a diversas oportunidades para melhor remuneração do produtor e a existência ainda de muito espaço para se pagar mais pela fruta no país (FNP, 2011). Outro fator positivo foram os resultados obtidos pela multinacional sueca de embalagens Tetra Pak em pesquisa realizada entre 2003 a 2010 (LOPES, 2011). A pesquisa constatou que a queda no consumo de suco de laranja mundial foi menos drástica devido à elevação do consumo de suco de laranja de 41% no grupo formado pelos BRIC (Brasil, Rússia, Índia e China) e pelo México, além de saltos expressivos em países como Marrocos (743%), Argentina (358,2%) e Indonésia (212,8%).

Também vem favorecendo a citricultura brasileira alterações na distribuição da cultura no país, devido principalmente aos problemas fitossanitários provocados pelo *greening*. A dificuldade no manejo do *greening* vem gerando insegurança na implantação de novos pomares em locais onde a doença se encontra (FNP, 2011). Com isso, a busca por locais distantes das áreas contaminadas vem tornando-se a melhor opção. As regiões de destaque compreendem o noroeste paulista e o PAT (Paranaíba, Aparecida do Taboado e Três Lagoas) no Mato Grosso do Sul (FNP, 2011). Parte da produção de laranja também passou a instalar-se na região centro-sul do estado de São Paulo devido à expansão do cultivo de cana-de-açúcar no norte do estado e ainda devido a fatores climáticos, os quais são mais favoráveis nessa nova região (BRASIL, 2011).

Outro fator que vem favorecendo a produção de citros no Brasil corresponde ao maior controle de certas doenças importantes no país. Dados dos relatórios de inspeção e erradicação nos laranjais paulistas, realizado pela Secretaria de Agricultura e Abastecimento do estado de São Paulo no segundo semestre de 2010, apontaram maior combate pelo produtor contra o *greening*, havendo a redução de 46% no número de plantas eliminadas (PORTO, 2011). A incidência da CVC diminuiu de 39,2% para 35,5% no estado de São Paulo, segundo o levantamento amostral realizado pelo Fundecitrus em 2010 (FUNDECITRUS, 2011b). Entre os motivos que levaram à queda dessa doença ressaltam-se a eliminação de pomares mais velhos e a erradicação de plantas doentes devido ao *greening* (FUNDECITRUS, 2011b).

Resultados destas medidas podem ser observados, de acordo com o Brasil (2011), durante a safra 2010/2011, a produção de laranja no estado de São Paulo deverá atingir 377 milhões de caixas de 40,8 kg, o que representa aumento de cerca de 17% em relação à safra passada, que foi de 322,2 milhões de caixas. Esses resultados levam a acreditar que a crise atual pode trazer à citricultura oportunidade singular para se fortalecer e inovar-se (FNP, 2011).

2.2 Uso de porta-enxertos em citros

Por centenas de anos, o cultivo de plantas de citros se deu por sementes. Tal atividade fazia com que as árvores apresentassem longo período de juvenilidade, geralmente entre 5 a 7 anos nos quais formavam grande quantidade de espinhos e não floresciam e, portanto, não eram produtivas (AUGUSTÍ, 2003; DAVIES; ALBRIGO, 1994). Além disso, algumas espécies de interesse econômico são sensíveis a problemas relacionados ao solo como doenças e alterações químicas (AUGUSTÍ, 2003). Tais características não são atrativas, pois se busca produção e retorno dos investimentos o mais rapidamente possível.

Devido a esses fatores, outras formas de propagação passaram a serem utilizadas como estaquia, alporquia, cultivo de tecido e enxertia (POMPEU JÚNIOR, 2005). Apesar de a enxertia ser conhecida desde o século V, acredita-se que o marco da passagem do uso de pés francos para plantas enxertadas na citricultura ocorreu em 1942 devido ao surgimento da gomose de *Phytophthora* na Ilha dos Açores, região pertencente a Portugal (POMPEU JÚNIOR, 2005). Com isso, atualmente os pomares apresentam árvores formadas por duas partes, a copa e o porta-

enxerto (TIMMER; GARNSEY; GRAHAM, 2000). Tal atividade busca combinar dois indivíduos de modo a gerar um sistema comercialmente benéfico.

De acordo com Augustí (2003) e Pompeu Júnior (1991), o porta-enxerto provoca na copa alterações no vigor e tamanho, na precocidade da produção, na época de maturação e peso dos frutos, no teor de açúcares e de ácido dos frutos, na permanência dos frutos na planta, na capacidade de absorção, síntese e utilização de nutrientes, na adaptação às condições do solo, como salinidade, pH e excesso de água, na tolerância a seca e ao frio, na resistência e tolerância a fitopatógenos e pragas, entre outros.

Apesar dessas qualidades, não existe o porta-enxerto perfeito e sua escolha deve basear-se nas principais condições limitantes de cada região citrícola, como clima, tipo de solo, variedade do cultivar e intenção de cultivo (fruto fresco ou processado) (DAVIES; ALBRIGO, 1994). Dessa forma, a seleção do porta-enxerto é de fundamental importância para o sucesso do pomar, pois apresenta diversas outras importantes funções além de suportar a copa. Para que ocorra uma combinação bem sucedida é necessária a instalação do mesmo em ecossistema apropriado, o recebimento de tratos culturais e o harmônico relacionamento entre copa e porta-enxerto (POMPEU JÚNIOR, 2005).

No Brasil o porta-enxerto inicialmente utilizado foi a laranjeira Caipira [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], a qual por apresentar suscetibilidade ao patógeno *Phytophthora* sp. e à seca, foi substituída pela laranjeira Azeda (*C. aurantium* L.), que passou a corresponder a 90% do porta-enxerto da citricultura paulista (POMPEU JÚNIOR, 2005; OUTRAS..., 2004). Durante quase duas décadas, a laranjeira Azeda foi o principal porta-enxerto utilizado na citricultura brasileira e em outros países produtores (OUTRAS..., 2004). Porém, em 1937 o aparecimento do vírus da tristeza levou novamente a citricultura a buscar um novo porta-enxerto, devido à intolerância da laranjeira Azeda a esse vírus (POMPEU JÚNIOR, 2005). Segundo estimativas, mais de 80% das plantas existentes nos pomares paulistas foram dizimadas (OUTRAS..., 2004). Com isso, passou-se a utilização do porta-enxerto limão Cravo (*C. limonia* Osbeck), tolerante a tristeza e que permitiu, após 10 anos, o restabelecimento da citricultura de São Paulo e de outros estados (MOREIRA; MOREIRA, 1991). Devido as características excepcionais, o porta-enxerto limão Cravo passou a predominar em novos plantios e em 2002, participava em 70% das mudas existentes em viveiros, além da estimativa que estivesse presente em 80% das plantas cítricas comerciais do estado de São Paulo (POMPEU JÚNIOR, 2005).

Novamente, na década de 70, a estratégia de utilizar um único tipo de porta-enxerto permitiu que uma nova doença, de etiologia desconhecida, o declínio dos citros, atacasse os pomares brasileiros (POMPEU JÚNIOR, 1991). Essa doença foi constatada causando perdas anuais de 5 a 10% das plantas do parque citrícola nacional (FEICHTENBERGER et al., 2005). Mais recentemente, foi descrita em 2001, em Minas Gerais, a doença morte súbita dos citros, também de causa desconhecida e que se disseminou rapidamente no sul do Triângulo Mineiro e norte e nordeste de São Paulo (FEICHTENBERGER et al., 2005).

O declínio dos citros e a morte súbita dos citros levaram à diversificação de porta-enxertos usados no Brasil (POMPEU JÚNIOR, 1991). Entre as variedades de porta-enxerto que passaram a serem exploradas, destacam-se a tangerineira Cleópatra (*C. reshni* hort. ex Tanaka) e a tangerineira Sunki (*C. sunki* hort. ex Tanaka) e, a partir do início da década de 90, o citrumeleiro Swingle [*C. paradisi* Macfad. cv. Duncan X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] (POMPEU JÚNIOR, 2005). Assim, levantamento realizado pelo Fundecitrus, em maio de 2003, mostrou que apenas 39,8% das mudas estavam enxertadas em limoeiro Cravo, seguido por 32,6% em tangerineira Cleópatra, 13,8% em citrumeleiro Swingle e 7,1% em tangerineira Sunki (POMPEU JÚNIOR, 2005).

A tangerineira Sunki é um dos porta-enxertos utilizados na China e que, de acordo com Pompeu Júnior (2005), vem sendo adotado no estado de São Paulo desde o início do século passado. É tolerante à tristeza, ao declínio, à morte súbita dos citros e à xiloporose e intolerante à exocorte. É suscetível a gomose de *Phytophthora*, à seca e ao frio (MACHADO FILHO et al., 2003; POMPEU JÚNIOR, 2005). A tangerineira Sunki passou a fazer parte do percentual dos principais porta-enxertos em São Paulo a partir de 1985, com 0,2% de participação das mudas presentes em viveiros, devido a sua resistência ao declínio dos citros e pela indução de produções de frutos, em geral, superiores às proporcionadas pela tangerineira Cleópatra (POMPEU JÚNIOR, 2005). Após a constatação de que plantas enxertadas em tangerineira Sunki não eram afetadas pela morte súbita dos citros, houve aumento de 5,1% em 2002 para 7,1% em 2003 (POMPEU JÚNIOR, 2005).

O citrumeleiro Swingle é originado do cruzamento entre Trifoliata e pomeleiro Duncan. É considerado tolerante à tristeza, à exocorte, à xiloporose e ao declínio (MACHADO FILHO et al., 2003). É resistente à gomose de *Phytophthora*, ao nematóide dos citros (*Tylenchulus semipenetrans*) (MACHADO FILHO et al., 2003; POMPEU JÚNIOR, 2005) e à morte súbita

dos citros (GIMENES-FERNANDES; BASSANEZI, 2001). Plantas enxertadas em citrumeleiro Swingle produzem bem em solos arenosos ou argilosos, entretanto não apresentam bom desempenho em solos com pH elevado e nos solos mal drenados, sendo moderadamente resistente à seca e à geadas (MACHADO FILHO et al., 2003; POMPEU JÚNIOR, 2005). De acordo com Pompeu Júnior (2005), citrumeleiro Swingle vem sendo avaliado pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) desde sua introdução em 1948. O interesse por esse porta-enxerto iniciou-se na década de 80, devido à tolerância ao declínio e resistência à gomose. Ainda de acordo com o autor, em 1988 o genótipo passou a fazer parte dos principais porta-enxertos utilizados em São Paulo, com 0,9%. Desde então, a presença desse citrumeleiro vem crescendo, sendo o terceiro porta-enxerto mais utilizado em 2002 e 2003, com 10,8 e 13,7% respectivamente. As principais limitações de citrumeleiro Swingle são menor resistência à seca que os limoeiros Cravo e Volkameriano (*C. volkameriana* V. Ten. & Pasq.) e a incompatibilidade com laranjeira Pêra (*C. sinensis*), tangeleiro Murcott (*C. reticulata* Blanco x *C. sinensis*) e limoeiros [*C. limon* (L.) Burm. f.] cv. Siciliano e Eureka (MACHADO FILHO et al., 2003; POMPEU JÚNIOR, 2005).

2.3 O gênero *Phytophthora* e doenças causadas em citros

O gênero *Phytophthora* encontra-se distribuído por todo globo e pertence à família Peronosporaceae, ordem Peronosporales, classe Oomycetes do reino Chromista (MASSOLA JR.; KRUGNER, 2011). Esse gênero compreende um grupo diversificado de microrganismos heterotróficos que morfologicamente e fisiologicamente lembram fungos, mas são filogeneticamente distante deles (TYLER, 2002). O nome do gênero é derivado do grego e significa *phyto* (planta) e *phthora* (destruidor) (ERWIN; RIBEIRO, 1996).

Esse grupo de microrganismos é favorecido por água livre no solo e folhagens, possui micélio cenocítico, ou seja, com poucos ou nenhum septo e celulose na constituição da parede celular (ERWIN; RIBEIRO, 1996). A reprodução assexual do gênero leva à formação de zoósporos, os quais não apresentam parede celular e são biflagelados, sendo um flagelo liso e outro do tipo *tinsel* que se formam dentro ou a partir de esporângios globosos, por clivagem citoplasmática (FEICHTENBERGER et al., 2005; MASSOLA JR.; KRUGNER, 2011, TYLER, 2002). Os zoósporos são a forma mais importante de infecção de raízes, especialmente quando o

solo se encontra encharcado (TYLER, 2002). Miller e Maxwell (1984) observaram que zoósporos de *P. megasperma* f. sp. *medicaginis* Kuan & Erwin foram atraídos e encistaram na superfície de raízes de plantas de alfafa dentro de 60 minutos após a inoculação.

Na reprodução sexual, formam-se o oogônio (gametângio feminino) e o anterídio (gametângio masculino), por meio de meiose gametangial, tornando-os haplóides (MASSOLA JR.; KRUGNER, 2011). O gênero *Phytophthora* pode manter-se viável no solo por longos períodos na forma de micélio ou esporângio em caules e em raízes infectadas, zoósporos encistados, clamidósporos e oósporos que em condições favoráveis, germinam, produzindo o tubo germinativo que se desenvolve em micélio (AGRIOS, 2005; FEICHTENBERGER et al., 2005). As espécies de *Phytophthora* são consideradas hemibiotróficas, no entanto, sugere-se que o estágio biotrófico seja bastante curto (LE BERRE; ENGLER; PANABIÉRES, 2008). Le Berre, Engler e Panabières (2008) observaram que *P. nicotianae* havia entrado no estágio necrotrófico dois dias após a inoculação em raízes de tomateiro.

A produção de esporos assexuais ocorre com frequência nas estações quentes e chuvosas, época em que os solos apresentam temperaturas elevadas e grandes variações de teores de umidade, nas quais o crescimento micelial cessa e há a formação de esporângios (FEICHTENBERGER et al., 2005; MASSOLA JR.; KRUGNER, 2011). Os zoósporos produzidos nos esporângios, ao serem liberados, nadam em direção às raízes, atraídos por exsudatos (FEICHTENBERGER et al., 2005; MASSOLA JR.; KRUGNER, 2011; TYLER, 2002). Em contato com a superfície das raízes de hospedeiros suscetíveis, perdem seus flagelos, encistam e germinam, penetrando no hospedeiro (AGRIOS, 2005; MASSOLA JR.; KRUGNER, 2011). Em raízes de plantas de alfafa, zoósporos de *P. megasperma* f. sp. *medicaginis* germinaram 60 a 90 minutos após a inoculação (MILLER; MAXWELL, 1984). Com a colonização do tecido do hospedeiro, mais esporângios são produzidos e novos zoósporos são liberados (AGRIOS, 2005). Doenças causadas por esse grupo são, portanto, do tipo policíclica (ERWIN; RIBEIRO, 1991). Podem resultar em epidemias severas quando as condições ambientais, principalmente a presença de água livre, favorecem a proliferação de propágulos de *Phytophthora* (ERWIN; RIBEIRO, 1991).

A água do solo é a forma de umidade que mais torna a planta suscetível a agentes patogênicos (BEDENDO; AMORIM, 2011). A irrigação excessiva ou a má drenagem do solo podem levar ao encharcamento do mesmo. O encharcamento diminui a disponibilidade de

oxigênio para as raízes, prejudica a absorção de água e nutrientes e cria condição propícia aos zoósporos (BEDENDO; AMORIM, 2011). Essa situação ocorre principalmente em viveiros de mudas, onde a densidade de plantas é elevada, provocando a elevação da severidade de doenças causadas pelo gênero *Phytophthora* (BEDENDO; AMORIM, 2011).

Existem aproximadamente 60 espécies de *Phytophthora*, todas patogênicas. Certas espécies como *P. cinnamomi* Rands, *P. nicotianae* Breda de Hann (syn. *Phytophthora parasitica* Dastur) e *P. cactorum* (Lebert & Cohn) J. Schröt. atacam centenas de diferentes plantas hospedeiras, outras, como *P. sojae* Kaufm. & Gerd. e *P. infestans* (Mont.) de Bary apresentam pequena gama de hospedeiros (TYLER, 2002). Doenças provocadas por esses fitopatógenos são *damping-off*, podridões de raízes em plantas jovens e adultas, podridões de tubérculos, necrose em órgãos da parte aérea de plantas (podridões de colo, cancos e podridões de fruto) e queima de folhagem e ramos jovens em culturas anuais (MASSOLA JR.; KRUGNER, 2011).

O gênero *Phytophthora* é o maior causador de doenças de solo em citros (TIMMER; GARNSEY; GRAHAM, 2000). Os zoósporos se prendem a ferimentos ou a zona de crescimento das raízes de citros, encistam, germinam e penetram diretamente (FEICHTENBERGER et al., 2005; TIMMER; GARNSEY; GRAHAM, 2000). Diversas espécies de *Phytophthora* foram relatadas como patógenos de citros: *P. citrophthora* (R.E. Sm. & E.H. Sm.) Leonian, *P. nicotianae*, *P. syringae* (Kleb.) Kleb., *P. hibernalis* Carne, *P. palmivora* (E.J. Butler) E.J. Butler, *P. cactorum*, *P. cinnamomi*, *P. citrícola* Sawada, *P. drechsleri* Tucker, *P. megasperma* e *P. boehmeriae* Sawada (FEICHTENBERGER et al., 2005).

No Brasil, as principais espécies que atacam os citros são *P. citrophthora* e *P. nicotianae*, sendo essa última a espécie predominante nas principais regiões produtoras (FEICHTENBERGER et al., 2005). A espécie *P. nicotianae* é mais ativa em altas temperaturas (27 a 32°C) e raramente provoca infecções muito acima no tronco, enquanto que *P. citrophthora* é mais ativa em temperaturas mais moderadas (24 a 28°C) e ataca as partes aéreas da planta mais frequentemente que *P. nicotianae* (ERWIN; RIBEIRO, 1996; FEICHTENBERGER et al., 2005; TIMMER; GARNSEY; GRAHAM, 2000). Além de causar doenças em citros, *Phytophthora nicotianae* também ataca diversas outras culturas como tabaco, abacaxizeiro, algodoeiro, tomateiro, orquídeas e maracujazeiro, totalizando mais de 60 famílias de plantas hospedeiras (ERWIN; RIBEIRO, 1996; LE BERRE; ENGLER; PANABIÈRES, 2008).

Os sintomas causados pelo gênero em citros são tombamento, mela ou *damping-off* em sementeiras, lesões em folhas, brotos novos e hastes que são frequentes em viveiros, podridão do pé e gomose presentes em viveiros e pomares, podridão de raízes e radículas em viveiros e pomares e podridão parda de frutos (FEICHTENBERGER et al., 2005; TIMMER; GARNSEY; GRAHAM, 2000; POMPEU JUNIOR, 2005). As doenças mais sérias são podridão de pé e gomose, lesões desse tipo podem causar o anelamento das raízes e do tronco e dessa forma, impedir o fluxo da seiva elaborada das folhas para as raízes, causando a ocorrência de sintomas reflexos na copa e podendo levar a planta a morte (FEICHTENBERGER et al., 2005; TIMMER; GARNSEY; GRAHAM, 2000). O primeiro registro de gomose de *Phytophthora* em citros no Brasil data de 1917 (ALENCAR, 1941 apud POMPEU JÚNIOR, 2005).

As medidas de maior importância para o controle de doenças provocadas por *Phytophthora* em citros consistem no plantio de mudas livres do fitopatógeno e o uso de porta-enxertos resistentes ou tolerantes (FEICHTENBERGER et al., 2005). Medina Filho et al. (2004), baseados em diversos parâmetros, determinaram a “tolerância” de diversos híbridos e genitores de porta-enxertos quanto à “tolerância” das raízes à *P. nicotianae*. Nos extremos dessa avaliação definiram-se com altamente “tolerantes” os Trifoliatas Davis A e Rich 16-6 e o citrumeleiro Swingle, e como “intolerantes” a tangerineira Sunki e Cleópatra. No entanto, o termo tolerância não se encaixa de forma correta no contexto. Tolerantes são plantas suscetíveis ao patógeno, porém, sem consequências significativas em sua produção, pois não são mortas (AGRIOS, 2005). As plantas resistentes apresentam níveis de sintomas menores que plantas suscetíveis por possuírem a capacidade de prevenir o estabelecimento e restringirem a colonização do patógeno (CAMARGO, 2011). Dessa forma, no caso da interação citros-*Phytophthora*, como demonstrado por Medina Filho et al. (2004), os genótipos intolerantes deveriam ser denominados suscetíveis e os tolerantes, denominados resistentes.

Dentre todos os porta-enxertos estudados por Medina Filho et al. (2004), tangerineira Sunki apresentou a menor porcentagem de sobrevivência, resultado que está de acordo com o observado na prática pelos viveiristas, que consideram Sunki suscetível à podridão de raízes. Beltrame (2010) em seus estudos concluiu que infecções por *P. nicotianae* provocam redução do sistema radicular de tangerineira Sunki, diminuindo as trocas gasosas e afetando o balanço hídrico das plantas. O autor também analisou interações entre *P. nicotianae* e citrumeleiro Swingle e observou que o patógeno altera o metabolismo de carboidratos do genótipo, no

entanto, de forma menos severa que em tangerineira Sunki. Também foi verificada ausência de alterações no metabolismo secundário (atividade de glucanases, quitinases, peroxidases, polifenoloxidasas e fenilalanina amônia-liase) de citrumeleiro Swingle que esclarecessem sua resistência a *P. nicotianae*. Graham (1990) estudou a interação de Trifoliata e citrumeleiro Swingle inoculados com o patógeno *P. nicotianae*. O pesquisador sugere que a resistência parece estar relacionada à capacidade desses porta-enxertos de regenerarem suas raízes mais rapidamente quando comparado a outras espécies de porta-enxerto.

2.4 Reconhecimento de hospedeiros pelo gênero *Phytophthora* e mecanismos de interação

O reconhecimento é o primeiro passo em qualquer interação direta entre planta-microrganismo (TYLER, 2002). O reconhecimento do hospedeiro inclui a detecção, pelo patógeno, do tecido do hospedeiro por meio de propriedades químicas, elétricas e físicas (TYLER, 2002).

Desse modo, a atração dos zoósporos, encistamento, germinação do cisto e tropismo da hifa em direção ao tecido do hospedeiro representam comportamentos que podem ser afetados por sinais da planta e, dessa forma, são situações nas quais o reconhecimento do hospedeiro pode ser afetado (TYLER, 2002). A maior parte das pesquisas nessa área se concentra em respostas de atração pelos zoósporos, pois uma variedade de comportamentos foi relatada nesse grupo (CARLILE, 1983).

Zoósporos móveis constituem importante forma de iniciar infecções por *Phytophthora*, sendo considerados os principais propágulos infecciosos (CARLILE, 1983). A distância que os zoósporos podem alcançar pode ser favorecida não somente por sua motilidade, mas também por serem transportados de forma passiva por movimentos da água presente no solo (CARLILE, 1983). A duração da motilidade dos zoósporos pode ser determinada pela disponibilidade de energia contida nos zoósporos (CARLILE, 1983). Bimpong (1975 apud CARLILE, 1983) demonstrou que zoósporos de *P. palmivora* após estarem nadando por 6 horas, o conteúdo de lipídio dos mesmos havia reduzido cerca de 46%, o que pode sugerir que lipídeos endógenos foram a fonte principal de energia para a motilidade dos zoósporos.

A maioria dos zoósporos de *Phytophthora* spp. apresenta relativa atração não específica por aminoácidos, mais especificamente aspartato, glutamato, asparagina, glutamina, arginina e

metionina (CARLILE, 1983). A atração por compostos deste grupo revela-se com o acúmulo, em elevado número, destes propágulos em especial na região de crescimento e ao redor de ferimentos em raízes, onde há maior concentração de exsudatos (BEDENDO; AMORIM, 2011). A atração por substâncias químicas específicas está relacionada à seleção de hospedeiros e especificidade ao hospedeiro, como a atração de zoósporos de *P. sojae* por isoflavonas denominadas genisteína e daidzeína, as quais são fenóis heterocíclicos, presentes em sementes e em exsudato de raízes de soja (MORRIS; WARD, 1992).

Também foi observada em espécies de *Phytophthora* a atração espécie-específica, isto é, zoósporos móveis são atraídos em direção à zoósporos previamente encistados, resultando em grandes agregados de zoósporos encistados (DEACON; DONALDSON, 1993 apud TYLER, 2002). O ambiente elétrico igualmente pode fornecer informações ao patógeno, raízes podem desenvolver fracos campos elétricos, em especial nas pontas, ferimento e pontos de ramificação (MORRIS; GOW, 1993). Os mesmos autores sugerem que esse tipo de atração pode permitir aos zoósporos distinguir raízes vivas das mortas ou contribuir para a identificação de local de infecção na superfície da raiz.

Previamente ao encistamento, o zoósporo se torna adesivo e, ao entrar em contato com uma superfície sólida, prende-se firmemente a ela (CARLILE, 1983). Após, cerca de 10 minutos, ocorre a reabsorção ou liberação dos flagelos, arredondamento do cisto e rápida formação de parede celular temporária (CARLILE, 1983). Com a maturação do cisto, esse perde sua propriedade adesiva, permitindo-o ser transportado pela água (TYLER, 2002). O encistamento é provocado por ampla gama de fatores como agitação, aglomeração, obstrução física, presença de cálcio ou nutrientes (TYLER, 2002). Fatores que sinalizam condições favoráveis parecem estimular tanto encistamento quanto germinação (CARLILE, 1983). A germinação do cisto para formação de hifa é, dessa forma, estimulada por nutrientes e cálcio, típicos da rizosfera (TYLER, 2002).

Cistos podem germinar e formar tubos germinativos ou liberar zoósporo secundário, Ho e Hickman (1967 apud CARLILE, 1983) relatam que, em seus estudos, a germinação de cistos *P. megasperma* var. *sojae* na superfície de plantas iniciou-se dentro de 30 minutos e que todos os cistos haviam produzido tubo germinativo dentro de 3 horas. Além disso, os autores demonstraram que a germinação e a formação de tubos germinativos, em detrimento à formação de zoósporos secundários, foram favorecidas por nutrientes e exsudatos de raiz. Tal resultado

indica que a formação de zoósporos secundários pode estar mais relacionada a cistos localizados distantes de raízes (CARLILE, 1983).

A orientação de tubos germinativos envolve dois principais fatores, o quimiotropismo e o tigmotropismo. O primeiro pode ocorrer quando zoósporos encistam a alguma distância da superfície da raiz e, desse modo, o tubo germinativo deve desenvolver-se em direção à raiz (TYLER, 2002). O segundo ocorre quando se observa o crescimento do tubo germinativo buscando depressões na superfície da raiz, as quais caracterizam a presença de junções de paredes anticlinais de células epidérmicas (TYLER, 2002). Estudos ultraestruturais envolvendo a interação de espécies de *Phytophthora* e hospedeiros suscetíveis e resistentes indicam que zoósporos encistados formam tubos germinativos que penetram através de paredes periclinais ou, na maioria dos casos, por meio da lamela média das paredes anticlinais de células da epiderme de raízes (PHILIPS, 1993 apud WIDMER; GRAHAM; MITCHELL, 1998).

Patógenos atacam plantas devido a sua capacidade evolutiva de conseguirem nutrir-se de substâncias produzidas pelo hospedeiro, mas para tal, diversas barreiras se opõem como mecanismos de defesa pré e pós-formados das plantas ou mesmo a presença do conteúdo de forma não assimilável pelo patógeno, que terá de processá-lo (AGRIOS, 2005). Dessa forma, o patógeno deve ser capaz de penetrar, retirar os nutrientes e neutralizar as reações de defesa do hospedeiro (AGRIOS, 2005). Para o cumprimento dessas etapas o patógeno pode fazer uso de força mecânica e/ou de compostos químicos (enzimas, toxinas e hormônios) (AGRIOS, 2005). Após os eventos iniciais de penetração, diferenças nas respostas celulares dependem da resistência ou suscetibilidade do hospedeiro ao patógeno.

Para algumas espécies de *Phytophthora*, suporta-se a ideia de que a penetração de raízes ocorre inicialmente por meios enzimáticos em vez de mecânicos (BENHAMOU; CÔTÉ, 1992). As enzimas são proteínas de alto peso molecular e estão ligadas à desintegração dos componentes estruturais das células do hospedeiro, estando provavelmente envolvidas na maioria das doenças de plantas (PASCHOLATI, 2011a). Benhamou e Côté (1992) ao estudarem a interação de raízes de tabaco Xanthin-nc e *P. parasitica* var. *nicotianae*, concluíram que o patógeno produz enzimas pécticas que se difundem extracelularmente e também possa produzir celulase, ambas para degradação da parede celular do hospedeiro.

As toxinas correspondem a mecanismo adicional usado pelo gênero *Phytophthora*. As toxinas agem diretamente no protoplasto e interferem na permeabilidade de membranas

(PASCHOLATI, 2001a). Essas moléculas apresentam baixo peso molecular, são móveis, ativas em concentrações muito baixas ($<10^{-6}$ - 10^{-8} M) e podem ser do tipo seletivas ou não-seletivas (PASCHOLATI, 2001a). Elicitinas são secretadas em culturas de todas as espécies de *Phytophthora* testadas e por certas espécies de *Pythium* (TYLER, 2002). As elicinas, obtidas de espécies de *Phytophthora* e *Pythium*, são toxinas não-seletivas ao hospedeiro e, portanto, vistas como fatores de virulência ou determinantes secundários de patogenicidade (PASCHOLATI, 2001a). A habilidade de espalharem-se sistematicamente no hospedeiro é o que lhes confere papel na patogenicidade (TYLER, 2002).

2.5 Reconhecimento de patógenos do gênero *Phytophthora* por hospedeiros e mecanismos de interação

A interação entre planta-microrganismo, que envolve defesa e ataque, desenvolveu-se ao longo de um processo evolutivo. As plantas podem se defender de fitopatógeno passiva ou ativamente. Nesse sentido, os mecanismos de resistência são subdivididos em pré-formados (passivos, constitutivos) e pós-formados (ativos, induzíveis) (PASCHOLATI, 2011b).

Os mecanismos de resistência pré-formados incluem mecanismos estruturais e bioquímicos presentes nas plantas antes do contato com o patógeno, os quais buscam gerar condições adversas para inibir o desenvolvimento do patógeno (PASCHOLATI, 2011b). Mecanismos estruturais correspondem a barreiras impostas pela anatomia da planta hospedeira, como cutícula, estômatos e pilosidade. Mecanismos bioquímicos envolvem compostos químicos como os alcalóides, as lactonas insaturadas, os glicosídeos cianogênicos e sulfurados (PASCHOLATI, 2011b).

Enquanto a primeira linha de defesa é constitutiva, os mecanismos pós-formados dependem do contato do patógeno com a planta (LEITE; STANGARLIN, 2008). Da mesma forma, há mecanismos estruturais como papilas, halos, lignificação e tiloses; e mecanismos bioquímicos como espécies ativas de oxigênio, fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (PASCHOLATI, 2011b). É importante ainda ressaltar que compostos os quais ativam respostas de defesa da planta podem originar-se do patógeno ou da própria planta (LHERMINIER et al., 2003). Fragmentos de parede celular têm sido relatados como eliciadores de defesa em diversas interações *Phytophthora*-hospedeiro, como entre *P. sojae* e plantas de soja, *P. infestans* e

batateira, *P. nicotianae* e plantas de tabaco, *P. capsici* Leonian e plantas de pimentão e *P. cinnamomi* e roseira (TYLER, 2002).

Diversos eliciadores derivados de *Phytophthora* foram identificados, incluindo carboidratos, proteínas e pequenas moléculas (HAHN, 1996). Na maior parte dos casos, essas moléculas são encontradas em todas as espécies do gênero e provocam respostas de defesa em variedades suscetíveis e resistentes de seus hospedeiros (TYLER, 2002).

As elicinas, além de agirem como fatores de patogenicidade entre certas interações planta-patógeno, também são importantes fatores de avirulência em outros casos (YU, 1995). Essas proteínas foram sequenciadas em diversas espécies e, genes de elicina foram clonados de *P. nicotianae*, *P. sojae*, *P. infestans*, *P. cryptogea* Pethybr. & Laff. e *P. cinnamomi* (TYLER, 2002). As sequências são altamente similares e definem a classe de elicina I (TYLER, 2002). Essas pequenas moléculas passam livremente através de paredes celulares e possuem a habilidade de espalharem-se sistematicamente por toda a planta (DEVERGNE et al., 1992 apud TYLER, 2002). Resultados obtidos por Tyler (2002) sugerem que os receptores de elicina responsáveis pela ativação de mecanismos de defesa estão presentes no interior das células.

Lherminier et al. (2003) observaram modificações citológicas induzidas por elicina em plantas de tabaco inoculadas com *P. nicotianae*, como a impregnação de pectina por compostos fenólicos em espaços intercelulares do floema e acúmulo de proteínas do floema no lúmen de elementos de vaso da folha. Essas alterações citológicas levaram ao aprimoramento das barreiras físicas que preveniam o ingresso do patógeno e restringiram sua colonização no tecido do hospedeiro. A deposição de parede também foi observada na maior parte dos locais de penetração de hifa.

No patossistema carvalho (*Quercus robur* L.) e *P. quercina*, a análise ultraestrutural de raízes infectadas, realizada por Brummer et al. (2002), demonstrou modificações no tecido vegetal devido a presença da elicina denominada quercinina. Os autores relatam que material semelhante a fenol e deposição de parede rica em calose correspondem a fatores relacionados às reações de defesa do hospedeiro a *P. quercina*. Os compostos fenólicos são encontrados em todas as plantas, alguns ocorrendo constitutivamente como o ácido clorogênico e o catecol; e outros formados especificamente em resposta à tentativa de invasão do patógeno no interior da planta como muitos tipos de fitoalexinas e a presença na formação de papilas e outras estruturas (LO; NICHOLSON, 2008). Raízes de plantas de cedro do Oregon (*Chamaecyparis lawsoniana*)

apresentaram-se resistentes a *P. lateralis* Tucker & Milbrath devido ao engrossamento das paredes das células corticais, deposição de material da parede celular ao redor de hifas em processo de penetração e acúmulo de grânulos osmofílicos ao redor das hifas (OH; HANSEN, 2007).

Nos patossistemas *P. megasperma* f.sp. *glycinea*-plantas de soja e *P. infestans*-plantas de batata foi observada a indução da síntese de fitoalexinas (EBEL; GRISEBACH, 1988), compostos antimicrobianos de baixa massa molecular, capazes de reduzir ou impedir a atividade de agentes patogênicos (PASCHOLATI, 2011b). Também foi detectada a produção, em maior quantidade, da fitoalexina scoparone em tecidos de plantas resistentes de Trifoliata e limoeiro Rugoso (*C. jambhiri* Lush) e menor em plantas de citros suscetíveis Shamouti (*C. sinensis*) e Niva (*C. reticulata* x *C. sinensis*) quando inoculados com *P. citrophthora* (AFEK; SZTEJNBERG, 1988).

Albrecht e Bowman (2007) estudaram a interação entre *P. palmivora* e sete genótipos de porta-enxertos de citros: tangerineira Cleópatra, tangerineira Sun Chu Sha (*C. reticulata*), citrumeleiro Swingle, US-897 (*C. reticulata* Cleópatra x *P. trifoliata*), citrangeiro Carrizo, laranjeira Caipira e laranjeira Azeda (*C. aurantium*). Os autores ao analisarem raízes inoculadas dos porta-enxertos, notaram a elevação da concentração de fenóis totais e da atividade da β -1,3-glucanase, além de leve redução ou não alteração dos níveis de quitinase e peroxidase em todos os porta-enxertos. No entanto, observaram que o aumento das proteínas estava associado ao progresso da doença e não a resistência ou suscetibilidade do porta-enxerto a *P. palmivora*. Tal fato indica que as variáveis analisadas contribuem para a inibição do patógeno durante a infecção em porta-enxertos resistentes de citros, porém não se tratam de mecanismos de defesa primária contra *Phytophthora* (ALBRECHT; BOWMAN, 2007).

Outro mecanismo de resistência é a produção do gás etileno em certas espécies de plantas, funcionando como sinalizador na resistência a doenças e mediando diferentes tipos de resistência induzida (VAN LOON; GERAATS; LINTHORST, 2006). Plantas de tabaco inoculadas com a proteína extracelular de *P. cryptogea*, denominada criptogeína, acumularam etileno e capsidiol (MILAT; RICCI; BLEIN, 1991). Esse acúmulo levou a formação de necroses em células de tabaco em suspensão, semelhantes a hipersensibilidade, tornando o tabaco resistente a *P. parasitica* var. *nicotianae* (MILAT; RICCI; BLEIN, 1991). No entanto, o etileno também pode

atuar de forma conjunta com o patógeno para acelerar o desenvolvimento de sintomas em plantas suscetíveis (DUTTA; BIGGS, 1991; GERAATS et al., 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de condução dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fungos Fitopatogênicos e no Laboratório do Núcleo de Apoio à Pesquisa / Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) do Departamento de Fitopatologia e Nematologia e no Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo, campus “Luiz de Queiroz” na cidade de Piracicaba, estado de São Paulo, Brasil. Também no Laboratório de Patologia Florestal do Departamento de Ecofisiologia Vegetal da Universidade Técnica de Munique, estado da Bavária, Alemanha.

3.2 Obtenção, cultivo e preparo do inóculo a partir de isolado de *Phytophthora nicotianae*

O isolado de *Phytophthora nicotianae* Breda de Hann (syn. *Phytophthora parasitica* Dastur) utilizado correspondeu ao LRS 01/06, cedido pelo Pesquisador Científico Eduardo Feichtenberger da Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Sorocaba, APTA. O isolado foi o mais agressivo dentre os sete cedidos pelo pesquisador e, por isso, selecionado para os experimentos (BELTRAME, 2010). O isolado foi mantido em meio cenoura-água (200 gramas de cenoura sem casca, 15 gramas de água e 1000 mL de água destilada) em câmara de crescimento, a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas claro/12 horas escuro.

Para preparo do inóculo, colônias do cromista com dez dias de cultivo em meio cenoura-água foram cobertas com água destilada esterilizada durante uma semana (para a formação de zoosporângios), sendo a água trocada diariamente. As placas permaneceram em câmara de crescimento a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas claro/12 horas escuro. Para a liberação dos zoósporos na água, as placas foram mantidas por 30 minutos a 6°C e em seguida, 30 minutos em temperatura ambiente (25°C).

A calibração da solução foi realizada em câmara de Neubauer. Para facilitar a contagem, o encistamento dos zoósporos foi provocado por meio do aquecimento da câmara, com o auxílio de lamparina. A suspensão foi calibrada para 10^5 zoósporos/mL.

3.3 Obtenção, cultivo e preparo das plântulas de porta-enxerto de citros

Os porta-enxertos utilizados foram o híbrido citrumeleiro Swingle [*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.], resistente à *P. nicotianae* e a espécie tangerineira Sunki (*Citrus sunki* Hort. ex. Tan.), suscetível ao patógeno. As sementes de ambos foram cedidas pelo Fundo de Defesa da Citricultura - Fundecitrus (Araraquara-SP) e Centro de Citricultura Sylvio Moreira (Cordeirópolis-SP).

As sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio e água destilada esterilizada, na proporção de 1:3, por 5 minutos e em seguida lavadas três vezes em água destilada estéril. Após, as mesmas foram transferidas para solo composto de vermiculita e mantidas em estufa. Posteriormente, as plântulas foram retiradas do substrato e suas raízes lavadas em água destilada para utilização nos experimentos.

3.4 Estudo histológico por microscopia de luz

Plântulas com dois meses de idade de citrumeleiro Swingle e tangerineira Sunki, obtidas como citado no item 3.3, foram suspensas em suportes de acrílico (Figura 1A) para imersão de suas raízes em microtubos de 1,5 mL contendo 1 mL de suspensão de zoósporos de *P. nicotianae* (Figura 1B) obtida conforme item 3.2. O sistema manteve-se dessa forma durante 4 horas, em temperatura ambiente (25°C) e em câmara úmida.

Figura 1 – Suporte para inoculação das plântulas de citrumeleiro Swingle e tangerineira Sunki. (A) Visão geral do suporte com as plântulas. (B) Raiz imersa em suspensão de 10^5 zoósporos/mL de *Phytophthora nicotianae*

Transcorrido o tempo, as plântulas foram transferidas para tubos plásticos de 50 mL contendo apenas água destilada esterilizada. A coleta de amostras de raízes foi realizada 1, 4 e 6 dias após a inoculação. Amostras de 1 cm de comprimento a partir da ponta da raiz foram coletadas com auxílio de bisturi e fixadas a 6°C em solução de Karnovsky (1965) modificado (glutaraldeído 2,5%; paraformaldeído 2%; CaCl_2 0,001 M e tampão cacodilato 0,05 M) por uma noite. Após, as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%) durante 10 minutos em cada concentração. Na concentração de 100% o procedimento foi realizado três vezes. Em seguida, iniciou-se a infiltração das amostras que foram mantidas em resina de hidroxietil metacrilato (Historesin, Leica, Alemanha) e etanol 100% na proporção de 1:1 durante 24 horas. Posteriormente, foram mantidas em resina pura por mais 24 horas e ao final emblocadas. Depois da polimerização da resina, os blocos contendo as amostras foram seccionados longitudinalmente em micrótomo rotativo manual (Spencer Lens Co., Estados Unidos) equipado com navalha de aço. Foram utilizadas cinco repetições para cada tratamento e o controle correspondeu à imersão das raízes de plântulas em água destilada esterilizada nos diferentes tempos.

As secções de 5 μm de espessura foram coradas com azul de toluidina a 0,05%, pH 3,0 em solução aquosa e ácido acético (SAKAI, 1973). As lâminas foram imersas no corante por 8

minutos, lavadas em água corrente e secas naturalmente. As secções coradas e secas foram cobertas por lamínulas de vidro utilizando-se como meio de montagem a resina sintética Entellan® (Merck, Alemanha). As lâminas foram analisadas e fotomicrografadas em microscópio de luz Zeiss Axioskop 2 (Zeiss, Alemanha). O experimento foi realizado duas vezes.

3.5 Estudo histológico por microscopia confocal

Plântulas com dois meses de idade de citrumeleiro Swingle e tangerineira Sunki, obtidas como citado no item 3.3, foram inoculadas de maneira idêntica à descrita no item 3.4, com suspensão de zoósporos de *P. nicotianae* obtida conforme 3.2. O sistema manteve-se dessa forma durante 4 horas, nas mesmas condições presentes no item 3.4. Transcorrido o tempo, as plântulas foram transferidas para tubos plásticos de 50 mL contendo apenas água destilada esterilizada.

As amostras de raízes foram coletadas um, dois e quatro dias após a inoculação como descrito no item 3.4 e fixadas em solução de Karnovsky (1965) a 5°C por uma noite. As amostras fixadas foram seccionadas transversalmente de forma manual, com auxílio de pinça e de bisturi, sob microscópio estereoscópico (Olympus, Japan).

Para a observação das amostras em microscopia confocal, as secções foram submetidas à marcação com anticorpo fluorescente. O anticorpo primário utilizado foi produzido contra a elicítina de *Phytophthora citricola*, denominada citricolina. A reação cruzada desse anticorpo contra a elicítina de *P. nicotianae* foi demonstrada por meio de teste Western Blot (informação pessoal, fornecida pelo Dr. Nelson Sidnei Massola Júnior).

As secções foram submetidas ao protocolo de marcação descrito por Brummer et al. (2002). Após as etapas de bloqueio de aldeídos e de proteínas, as amostras seguiram para a etapa de imunomarcação. Para incubação em anticorpo primário, as secções foram mantidas por 2 horas a 37°C em anti-soro contra citricolina purificado produzido em galinha na diluição de 1:100 em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,2 contendo albumina de soro bovino (BSA) 0,5%.

Para a marcação com anticorpo secundário foi utilizado anti-soro anti-galinha produzido em cabra, marcado com o corante fluorescente Alexa Fluor 633 (Molecular Probes, Invitrogen, EUA), por 1 hora a 37°C, na diluição 1:2000 em PBS pH 7,2 contendo BSA 0,5%. O corante apresenta absorção máxima em 632 nm e emissão máxima em 647 nm, de acordo com o

fabricante. Após a incubação em cada anticorpo, as secções foram lavadas duas vezes de 10 minutos cada em PBS/Tween 0,2% pH 7,2 e uma vez de 10 minutos em PBS pH 7,2. Como controle do método de imunomarcação, amostras não inoculadas de tangerineira Sunki foram submetidas ao mesmo protocolo. Além disso, amostras de tangerineira Sunki não inoculadas e sem nenhum tipo de tratamento foram visualizadas em microscópio confocal para monitoramento de possível autofluorescência.

Após o procedimento, as secções foram transferidas para lâminas de vidro, cobertas com lamínula e analisadas em microscópio confocal de varredura a laser modelo TCS SP5 (Leica, Alemanha). A fluorescência específica da marcação foi obtida por meio de excitação com laser hélio-neônio (He-Ne) a 633 nm e detecção no intervalo entre 641-655 nm. Esse equipamento também foi programado para monitorar a autofluorescência das amostras por meio de excitação com laser de argônio a 488 nm e detecção no intervalo entre 496-611 nm. As imagens obtidas foram armazenadas em arquivo eletrônico. Foram utilizadas seis repetições por tratamento, o experimento foi realizado duas vezes.

3.6 Estudo histológico da superfície das raízes de citros

Cinco plântulas de citrumeleiro Swingle e cinco de tangerineira Sunki com três meses de idade, obtidas conforme o item 3.3, tiveram seus sistemas radiculares imersos em um mesmo tubo plástico de 50 mL contendo suspensão de 10^5 zoósporos/mL de *P. nicotianae*, obtida como citado no item 3.2. As plântulas permaneceram nessa condição durante 1, 2, 4 e 12 horas, em câmara de crescimento a 25 °C e escuro contínuo. Transcorrido os tempos, segmentos de 1,5 cm de comprimento a partir da ponta das raízes foram retirados com auxílio de bisturi e mantidos em solução de Karnovsky (1965) modificado (glutaraldeído 2,5%; paraformaldeído 2%; CaCl_2 0,001 M e tampão cacodilato 0,05 M) por uma noite.

As amostras fixadas em solução de Karnovsky (1965) modificado foram submetidas ao vapor de solução de tetróxido de ósmio 2% por 4 horas. Posteriormente, as amostras foram fixadas em suportes de alumínio (*stubs*) com fita dupla face de carbono e metalizadas com vapor de ouro em aparelho metalizador modelo MED 010 (Balzers Union, Principado de Lichtenstein), a 50 mA, por 180 segundos.

As observações foram realizadas no Microscópio Eletrônico de Varredura LEO 435 VP (Zeiss, Inglaterra). Imagens foram registradas e armazenadas em arquivo eletrônico e o número de cistos de *P. nicotianae* foi quantificado na superfície das raízes em cada uma das cinco amostras, em área de $1600 \mu\text{m}^2$. Os dados foram analisados utilizando-se Teste de Tukey a 5% de significância. O experimento foi realizado duas vezes.

3.7 Detecção de compostos fenólicos e lignina por microscopia de luz em tecido fresco

Plântulas de citrumeleiro Swingle e tangerineira Sunki com seis meses, obtidas conforme item 3.3, foram colocadas em bandejas e a ponta das raízes imersas em microtubos de 2 mL contendo 1,5 mL de suspensão de 10^5 zoósporos/mL de *P. nicotianae*, obtida conforme item 3.2. Em seguida, foram acondicionadas em câmara úmida, por um, três e seis dias. Transcorrido os tempos, segmentos de 1 cm de comprimento a partir da ponta das raízes foram retirados com auxílio de bisturi e em seguida seccionados longitudinalmente de forma manual para obtenção de seções longitudinais a fresco.

Após a disposição dos cortes em lâminas, foram realizados testes histoquímicos com cloreto de zinco iodado (JENSEN, 1962) e cloreto férrico (JOHANSEN, 1940). Em diferentes lâminas, os corantes foram aplicados sobre os cortes e, após cerca de 1 minuto, laminulas foram dispostas sobre as seções para análise em microscópio de luz Zeiss Axioskop 2 (Zeiss, Alemanha). O cloreto férrico indica a presença de compostos fenólicos no tecido por meio de coloração marrom escuro e o cloreto de zinco indica a presença de lignina por meio de coloração alaranjada no tecido. Em parte das seções de cada tratamento foi aplicada somente água, servindo esses como controles histoquímicos.

Algumas amostras de cada tratamento foram também emblocadas, seccionadas e coradas com azul de toluidina conforme o item 3.4 para visualização de estruturas do patógeno em microscópio de luz. As lâminas foram analisadas e fotomicrografadas em microscópio de luz. Foram utilizados cinco repetições por tratamento e o experimento foi realizado duas vezes.

3.8 Detecção de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência

Para os ensaios de determinação de fenóis por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*), plântulas de citrumeleiro Swingle e

tangerineira Sunki com seis meses de idade, obtidas conforme item 3.3, tiveram todo o sistema radicular inoculado com suspensão de 10^5 zoósporos/mL de *P. nicotianae*, obtida conforme item 3.2, em recipientes de vidro com capacidade para 800 mL. Cada genótipo foi inoculado separadamente. Após a inoculação, as plântulas foram mantidas em recipientes com água destilada, a qual foi trocada diariamente. As raízes foram coletadas três dias após a inoculação e processadas para análise em HPLC.

Como controle, foram usadas plântulas dos mesmos genótipos mantidas somente em água destilada. Para cada tratamento, utilizaram-se três repetições. Em todas as inoculações realizadas as testemunhas foram inoculadas de maneira idêntica, porém, água destilada esterilizada foi utilizada em vez da suspensão de zoósporos.

Assim que coletadas, as raízes das plântulas foram congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas por 24 horas. As raízes liofilizadas foram segmentadas, com auxílio de lâmina esterilizada, em fragmentos de cerca de 2 cm. Os fragmentos foram acondicionados em microtubos de 2 mL e moídos em moinho vibratório modelo MM2 (Retsch, Alemanha) por 5 minutos a 80 rotações por segundo, com auxílio de duas bolas de moagem de aço (diâmetro 3,5 mm) por microtubo.

Para a extração dos compostos fenólicos, seguiu-se metodologia descrita por Mayr et al. (1997), com modificações. As amostras analisadas constituíram em frações com massa de 100 mg de raízes trituradas, acondicionadas em microtubos de 2 mL. Em cada amostra foi adicionado 500 μ L de metanol PA (Pró-Análise), seguindo-se extração em ultra-som por 30 minutos a 4°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm a 4°C e o sobrenadante transferido para novo microtubo. Após nova centrifugação a 10.000 rpm a 4°C, o HPLC foi realizado por três vezes com o extrato metanólico de uma das amostras para ajuste da melhor diluição que favorecesse a detecção de compostos fenólicos. A diluição estabelecida para detecção foi de 1 de extrato metanólico de amostra para 20 de metanol PA. Desse modo, alíquotas de 70 μ L do sobrenadante do centrifugado de cada amostra foram utilizadas para análise em HPLC.

As amostras foram analisadas em HPLC equipado com coluna Kinetex pentafluorofenil (PFP) (Phenomenex, EUA), com partículas de 2,6 μ m, poros de 100Å e dimensões internas de 150 x 4,6 mm. O HPLC foi realizado em gradiente de metanol (PA) e solução 5% de ácido fórmico, de modo que se iniciou com mistura de 100% da solução de ácido fórmico:0% metanol e terminou com 10% de solução de ácido fórmico:90% metanol. O fluxo foi de 0,5 mL/minuto

(MAYR et al., 1997) e o tempo de corrida para cada amostra foi de 170 minutos. Para tanto, o equipamento estava acoplado a duas bombas 422 (Kontron, Itália) e detector de arranjo de diodos e fluorescência (Goebel Instrumentelle Analytik, Alemanha) (BECK; VAN HOEK; ENGELHARDT, 1993). O experimento foi realizado uma vez.

3.9 Detecção de etileno

Plântulas de citrumeleiro Swingle e tangerineira Sunki com três meses de idade, mantidas em substrato de vermiculita em tubos plásticos de 50 mL, tiveram o sistema radicular encharcado com suspensão de 10^5 zoósporos/mL de *P. nicotianae*, obtida conforme 3.2, por 4 horas (Figura 2A). Transcorrido o tempo, o excesso da suspensão dentro dos tubos foi removido do sistema (plântula + tubo com vermiculita) (Figura 3B).

O sistema foi mantido dentro de tubos de vidro de 250 mL vedados com tampa de silicone em câmara a 24°C e fotoperíodo de 14 horas claro e 10 horas escuro (Figura 2C).

Figura 2 – Procedimentos realizados em plântulas de porta-enxerto de citros para detecção de etileno. (A) Plântulas com sistema radicular em vermiculita, encharcadas com suspensão de 10^5 zoósporos/mL. (B) Escoamento do excesso da suspensão do tubo. (C) Plântulas mantidas dentro de tubos de vidro vedados com tampa de silicone para coleta do etileno

A cada 24 horas após a inoculação, durante dez dias, alíquotas de 1 mL de ar do interior de cada tubo foi coletada com auxílio de seringas ultrafinas plásticas, através da tampa de silicone. Essas amostras foram injetadas em cromatógrafo a gás modelo Star 3400cx (Varian, Alemanha), equipado com detector de ionização de chama (FID) regulado para 225°C, injetor regulado para 80°C e coluna de óxido de alumínio (1/8 inch x 100 cm) regulada para 80°C. O gás

de arraste foi o nitrogênio e, para registro e quantificação dos picos, o cromatógrafo estava acoplado a registrador e integrador Shimadzu RC6. O padrão utilizado na calibração foi o etileno em ar sintético 248 pmol/mL. Após a coleta da amostra, os tubos permaneciam abertos para troca do ar em seus interiores durante 1 hora por dia.

Utilizaram-se oito plântulas por tratamento e o controle correspondeu a plântulas inoculadas com água para ambos os porta-enxertos. O cálculo da produção de etileno pelos tratamentos seguiu a metodologia descrita por Portz et al. (2011). Os tratamentos foram analisados utilizando-se Teste de Tukey a 5% de significância. O experimento foi realizado uma vez.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo histológico por microscopia de luz

As secções das raízes não inoculadas de citrumeleiro Swingle e tangerineira Sunki apresentaram tecido com aparência normal, mantendo a organização estrutural e característica de cada espécie, com células túrgidas e membranas íntegras, livres da presença de patógenos (Figura 3).

Figura 3 – Secções longitudinais de raízes de porta-enxerto de citros não inoculadas com *Phytophthora nicotianae*, seis dias após início do experimento. (A) e (B) Citrumeleiro Swingle. (C) e (D) Tangerineira Sunki. Barra = 50μm

Nas secções das raízes inoculadas com zoósporos de *P. nicotianae* de ambos os genótipos, após um dia, o tecido apresenta-se com aparência normal e células túrgidas. No entanto, se observa a presença de hifas intercelulares no córtex, próximo a epiderme (Figuras 4A a D). Igualmente, *P. nicotianae* se encontrava presente no córtex de raízes de tomateiro um dia após inoculação com zoósporos (LE BERRE; ENGLER; PANABIÈRES, 2008). Em raízes de plântulas de tangerineira Sunki é possível a visualização do início do processo de penetração das

hifas do patógeno no interior das células parenquimáticas, havendo a formação de pequenos *pegs* nesses locais (Figura 4B).

Mediante a análise das secções das raízes dois dias após a inoculação foi observado, em ambos os genótipos, que o patógeno se encontra distribuído por todo o córtex das plântulas (Figuras 4E a H). No entanto, visualizou-se maior quantidade aparente de hifas no tecido das raízes do genótipo suscetível. Similares foram os resultados obtidos por Miller e Maxwell (1984), onde a extensão da colonização de raízes de plântulas de alfafa por *P. megasperma* f. sp. *medicaginis* foi superior em hospedeiros suscetíveis que em resistentes 12 e 24 horas após a inoculação por zoósporos.

Também se pode notar, nas secções de raízes de plântulas de tangerineira Sunki, que as hifas de *P. nicotianae* distribuem-se inter e intracelularmente e que a membrana de algumas das células do córtex da plântula encontram-se plasmolisadas (Figura 4F e H). Além disso, há o início da invasão do cilindro vascular pelo patógeno. Por outro lado, em raízes de plântulas de citrumeleiro Swingle o tecido se apresenta organizado estruturalmente e com células túrgidas, encontrando-se poucas hifas, em geral, nos espaços intercelulares tanto no córtex como no cilindro vascular (Figura 4E e G). Diferenças no processo de colonização de *P. nicotianae* foram igualmente observadas por Widmer; Graham e Mitchell (1998) em raízes de plântulas de laranjeira Azeda (suscetível) e de Trifoliata (resistente) inoculadas com zoósporos do patógeno. Os autores relatam hifas do patógeno colonizando até a terceira camada das células corticais mais externas da espécie suscetível e, confinadas aos espaços intercelulares nos tecidos da espécie resistente, um dia após a inoculação.

Nas secções de tecido das plântulas resistentes, nota-se que as hifas intercelulares formaram pequenos *pegs* para invadir as células do tecido do hospedeiro (Figura 4G). As mesmas estruturas haviam sido visualizadas desde o primeiro dia após a inoculação nas secções de raízes das plântulas suscetíveis (Figura 4B). Estruturas semelhantes foram observadas por Le Berre, Engler e Panabières (2008) em secções de raízes de plantas de tomateiro inoculadas com zoósporos de *P. nicotianae*. Após dois dias, os autores relatam que o patógeno havia invadido o tecido da planta e que frequentemente havia a formação de pequenos “ganchos”, os quais eram indícios da penetração nas células do hospedeiro. Essas estruturas deram às hifas a aparência de arame farpado, assim como ocorrido no presente estudo.

Após quatro dias foram visualizadas hifas do patógeno distribuídas por toda epiderme, córtex e cilindro vascular nas secções de raízes de tangerineira Sunki (Figura 4J e L). Além da grande quantidade de hifas intra e intercelulares no tecido de tangerineira Sunki, grande parte das células vegetais se encontraram plasmolisadas. Em tangerineira Sunki, estruturas de reprodução do patógeno do tipo zoosporângios, próximos da epiderme, foram visualizadas quatro dias após a inoculação e em citrumeleiro Swingle, somente após seis dias (Figura 5 A e B). No cilindro vascular de tangerineira Sunki notou-se a presença de hifas de grosso calibre no interior dos vasos do floema (Figura 4J). A presença de hifas no cilindro vascular também foi observada em raízes de plântulas suscetíveis de alfafa um dia após inoculação com *P. megasperma* f. sp. *medicaginis* (MILLER; MAXWELL, 1984). Da mesma forma, em raízes suscetíveis de cedro do Oregon (*Chamaecyparis lawsoniana*) hifas de *P. lateralis* concentraram-se na região do cilindro vascular, presentes nos vasos e células parenquimáticas do floema (OH; HANSEN, 2007).

Em raízes de citrumeleiro Swingle, após quatro dias, hifas do patógeno encontraram-se distribuídas pela epiderme, córtex e cilindro vascular das plântulas. Contudo, em menor proporção e de forma menos danosa que em raízes de plântulas de tangerineira Sunki, pois a maior parte das células do hospedeiro encontrava-se túrgida e as membranas íntegras (Figura 4I e K). Nota-se também que poucas hifas invadiram o interior das células do córtex das raízes do genótipo resistente, havendo maior porcentagem de hifas intercelulares nos tecidos. Em plântulas de Trifoliata (resistente) observou-se menor porcentagem de hifas intracelulares de *P. nicotianae* no tecido radicular, dois dias após a inoculação quando comparada a espécie suscetível (WIDMER, GRAHAM; MITCHELL, 1998). Da mesma forma, o crescimento de hifas em raízes de plântulas resistentes e suscetíveis de alfafa ocorreu inter e intracelularmente (MILLER; MAXWELL, 1984). Contudo, hifas intracelulares foram mais comuns no tecido do hospedeiro suscetível.

Após seis dias, observa-se a desorganização dos tecidos das raízes em ambos os genótipos (Figuras 4M a P). Porém com menor número de hifas e células plasmolisadas em raízes de plântulas de citrumeleiro Swingle (Figura 4M e O). Igualmente, a taxa de colonização de *P. nicotianae* foi significativamente maior em plântulas de laranjeira Azeda (susceptível) do que em plântulas de Trifoliata (resistente), três dias após inoculação (WIDMER, GRAHAM; MITCHELL, 1998). Em raízes de plântulas de tangerineira Sunki, observar-se muitas vezes o rompimento da parede de células e a desorganização do tecido vegetal devido à massiva

colonização pelo patógeno, gerando aberturas e condições para o desenvolvimento de bactérias (Figura 4P).

Figura 4 – Secções longitudinais de raízes de porta-enxerto de citros inoculadas com *Phytophthora nicotianae*. (A-D) um dia após a inoculação (dai), (E-H) dois dai, (I-L) quatro dai e (M-P) seis dai. (A, C, E, G, I, K, M, O) Citrumeleiro Swingle. (B, D, F, H, J, L, N e P) Tangerineira Sunki. Setas = hifas. * = região do tecido vegetal danificado que foi invadido por bactérias. Barra = 50μm

Figura 4 – Secções longitudinais de raízes de porta-enxerto de citros inoculadas com *Phytophthora nicotianae*. (A-D) um dia após a inoculação (dai), (E-H) dois dai, (I-L) quatro dai e (M-P) seis dai. (A, C, E, G, I, K, M, O) Citrumeleiro Swingle. (B, D, F, H, J, L, N e P) Tangerineira Sunki. Setas = hifas. * = região do tecido vegetal danificado que foi invadido por bactérias. Barra = 50μm

Figura 5 – Secções longitudinais de raízes de citros inoculadas *Phytophthora nicotianae*. (A) Tangerineira Sunki quatro dias após a inoculação (dai). (B) Citrumeleiro Swingle seis dai. Setas = esporângios produzidos pelo patógeno. Barra = 100μm

Esses fatos indicam diferenças na colonização e na reprodução do patógeno, a nível histológico, entre os dois genótipos e demonstram, em parte, a reação de resistência e suscetibilidade dos materiais. Da mesma forma, Oh e Hansen (2007) observaram que cistos de *P. lateralis* germinaram, penetraram e colonizaram raízes suscetíveis e tolerantes de cedro do Oregon, porém esses passos aparentaram ser menos frequentes e mais lentos em raízes de plântulas resistentes que em raízes de plântulas suscetíveis. Resultados diferentes foram obtidos por Halsall (1978) que não encontrou alterações na penetração e desenvolvimento das hifas de *P. cinnamomi* no tecido cortical de raízes de espécie de eucalipto resistente e outra suscetível.

Todavia, não foi possível esclarecer por meio dessa metodologia por que plântulas de citrumeleiro Swingle são mais resistentes, uma vez que não foram observadas estruturas relacionadas à defesa da planta. Da mesma forma, Widmer, Graham e Mitchell (1998), por meio de análises histológicas, não encontraram respostas celulares relacionadas à defesa, como formação de calose ou hipersensibilidade, em raízes de Trifoliata (resistente) durante a colonização das células corticais por *P. nicotianae*. Entretanto, assim como nesse estudo, os autores observaram menor colonização inter e intracelular do patógeno em raízes do hospedeiro resistente, quando comparado ao hospedeiro suscetível. Widmer; Graham e Mitchell (1998) sugerem que a presença de fatores putativos de resistência em Trifoliata inibiu o crescimento de *P. nicotianae*. Graham (1995) sugere que a resistência em Trifoliata é expressa por meio da

redução da podridão de raiz e conversão da infecção de *P. nicotianae* em propágulos com o avanço da idade das raízes.

Devido ao fato de o híbrido citrumeleiro Swingle apresentar como um de seus parentais a espécie Trifoliata, mecanismos de resistência podem ser similares. Mais estudos devem ser realizados para identificar se esse(s) fator(es) de resistência são constitutivos dos tecidos das raízes ou expressos local ou sistematicamente após a inoculação (WIDMER; GRAHAM; MITCHELL, 1998).

4.2 Estudo histológico por microscopia confocal

A análise das secções transversais de raízes de plântulas de tangerineira Sunki não inoculadas com *P. nicotianae* não submetidas e submetidas ao protocolo de imunomarcacão indicaram a presença de intensa autofluorescência de cor verde nos tecidos vegetais (Figura 6A, C). As secções de raízes não submetidas ao protocolo também revelaram a presença de fraca autofluorescência vermelha, na faixa de emissão do corante Alexa Flúor 633 (Figura 6B). Mais adiante ambas as fluorescências foram constatadas igualmente em secções de citrumeleiro Swingle.

As secções de raízes de tangerineira Sunki não inoculadas e submetidas ao protocolo de imunomarcacão apresentaram poucos pontos de cor vermelho intensa em algumas regiões da epiderme (Figura 6D). Esses pontos indicam a presença de baixa marcação inespecífica dos anticorpos nesta região. Deste modo, houve boas condições de análise uma vez que foi observada baixa marcação inespecífica. No entanto, quando se comparam os tecidos não inoculados com aqueles de raízes inoculadas com *P. nicotianae*, fica evidente a diferença na intensidade da fluorescência vermelha que indica forte marcação específica da elicítina nos tecidos inoculados (Figura 7).

Figura 6 – Secções transversais de raízes de plântulas de tangerineira Sunki não inoculadas. (A) e (C) Fluorescência excitada pelo comprimento de onda de 488 nm e detectada nos intervalos de 496 a 611 nm. (B) e (D) Fluorescência excitada pelo comprimento de onda de 633 nm e detectada no intervalo de 641 a 655 nm. (A) e (B) Plântulas não submetidas ao protocolo de imunomarcção. (C) e (D) Plântulas submetidas ao protocolo de imunomarcção. Barra = 100 μ m

Cortes transversais dos tecidos das raízes de citrumeleiro Swingle e tangerineira Sunki, um dia após a inoculação com zoósporos de *P. nicotianae*, indicaram baixa presença de elicítina nos tecidos radiculares de ambos os genótipos, principalmente na epiderme e camadas celulares mais externas do córtex (Figura 7A e B). Esses resultados estão de acordo com o esperado, pois a elicítina se localiza onde, pelas análises em microscópio de luz, se encontram presentes as primeiras estruturas do patógeno.

Dois dias após a inoculação, a marcação específica da elicítina se intensificou no tecido das raízes de ambos os genótipos, principalmente na epiderme e por todo o córtex (Figura 7C e D). Além disso, pôde-se observar maior intensidade da marcação na epiderme e em alguns locais no córtex nas secções de raízes de plântulas de tangerineira Sunki quando comparado às de citrumeleiro Swingle. Esses dados também estão de acordo com os resultados obtidos no item 4.1, onde se observou maior número de estruturas do patógeno em raízes de plântulas de tangerineira Sunki e, conseqüentemente, esperar-se-ia maior produção de elicítina em suas células.

Quatro dias após a inoculação, a diferença na quantidade de elicítina presente entre os tecidos das raízes dos porta-enxertos tornou-se mais evidente. Observou-se maior marcação específica da elicítina de *P. nicotianae* nos tecidos das raízes de plântulas de tangerineira Sunki em relação às de citrumeleiro Swingle (Figura 7E e F). Esses dados corroboram os obtidos pelas análises histológicas em microscopia de luz, onde a epiderme, o córtex e o cilindro vascular das raízes de plântulas de tangerineira Sunki apresentaram-se maciçamente colonizados por hifas de *P. nicotianae* enquanto que quantidades menores de estruturas do patógeno foram visualizadas nos tecidos de raízes do genótipo resistente. Assim, seria de se esperar maior concentração de elicítina no tecido das raízes das plântulas suscetíveis quando comparado ao tecido das raízes das plântulas resistentes.

Em geral, a presença da elicítina nos tecidos das raízes das plântulas resistentes foi menor e mostrou pouco incremento em função do tempo (Figura 7). Os tecidos das raízes das plântulas suscetíveis, além de apresentarem maior marcação de elicítina em relação ao genótipo resistente, apresentaram evidente aumento na concentração de elicítina em função do tempo (Figura 7). Essa constatação, assim como já revelado pela microscopia de luz, indica maior colonização das raízes de tangerineira Sunki em comparação às de citrumeleiro Swingle. No entanto, a simples detecção da elicítina não indica necessariamente a presença do patógeno na mesma região, uma vez que esse composto é excretado para fora da hifa e se difunde pelos tecidos da planta hospedeira (BRUMMER et al., 2002; DEVERGNE et al., 1992).

Figura 7 – Fluorescência excitada pelo comprimento de onda de 633 nm e emitida no intervalo de 641 a 655 nm em secções transversais de raízes de citros inoculadas com *Phytophthora nicotianae* e submetidas ao protocolo de imunomarcacão. (A) e (B) um dia após a inoculação (dai), (C) e (D) dois dai e (E) e (F) quatro dai. (A, C e E) Citrumeleiro Swingle. (B, D e F) Tangerineira Sunki. Barra = 100 μ m

Elicitinas são proteínas extracelulares que possuem a capacidade de espalharem-se sistemicamente nas plantas, podendo induzir mecanismos de resistência, mas também podem comprometer a integridade de plantas suscetíveis (MANTER; KELSEY; KARCHESY, 2007; TYLER, 2002). Em plantas suscetíveis, elicinas de diferentes espécies de *Phytophthora* induziram sintomas de necrose e decréscimo das trocas gasosas e da taxa fotossintética (FLEISCHMANN et al., 2005; MANTER; KELSEY; KARCHESY, 2007; PERNOLLET et al., 1993). A elevação da concentração de elicina nas raízes de tangerineira Sunki observado nesse trabalho pode ser um dos fatores que causaram os comportamentos observados por Beltrame (2010) em seus experimentos. O autor observou redução da taxa fotossintética, condutância estomática e transpiração em plântulas de tangerineira Sunki cinco dias após serem inoculadas com *P. nicotianae*, enquanto que plântulas de citrumeleiro Swingle não apresentaram alterações perceptíveis.

Outro aspecto no qual a microscopia confocal confirmou os resultados dos estudos em microscopia de luz foi por meio da análise das imagens procedentes da fluorescência natural dos tecidos (Figura 8). Observou-se desorganização estrutural dos tecidos e o rompimento de células em raízes de tangerineira Sunki, mais evidentes no quarto dia (Figura 8F). Enquanto que em raízes de citrumeleiro Swingle a integridade celular foi mantida, mesmo após quatro dias da inoculação (Figura 8E).

Os estudos histológicos e de imunomarcção em microscopia confocal demonstraram, que plântulas de citrumeleiro Swingle mostraram-se mais resistente à *P. nicotianae* que plântulas de tangerineira Sunki, concordando com as reações observadas para esses genótipos no campo (MEDINA-FILHO et al., 2004; FEICHTENBERGER et al., 2005).

Figura 8 – Sobreposição da autofluorescência dos tecidos vegetais e da fluorescência emitida pelo anticorpo secundário de secções transversais de raízes de citros inoculadas com *Phytophthora nicotianae*. (A) e (B) um dia após a inoculação (dai), (C) e (D) dois dai e (E) e (F) quatro dai. (A), (C) e (E) Citrumeleiro Swingle e (B), (D) e (F) Tangerineira Sunki. Barra = 100 μ m

4.3 Análise de superfície das raízes de citros

Os zoósporos de *P. nicotianae* foram atraídos para as raízes de citrumeleiro Swingle e tangerineira Sunki. Por meio da morfologia externa, as partes constituintes que podem ser visualizadas nas raízes são a coifa, a zona lisa ou de crescimento, a zona pilífera e a zona de ramificação (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; HAYASHI, 2006). Tanto no genótipo suscetível como no resistente verificou-se maior presença de cistos de *P. nicotianae* na zona de crescimento da raiz (Figura 9). A atração dos zoósporos por essa região também ocorreu em raízes de plântulas de abacate resistentes e suscetíveis a *P. cinnamomi* (AVELLING; RIJKENBERG, 1989; HO; ZENTMYER, 1977) e em raízes de plântulas de alfafa suscetíveis e resistentes a *P. megasperma* f. sp. *medicaginis* (MILLER; MAXWELL, 1984).

Figura 9 – Superfície de raiz de tangerineira Sunki 1 hora após a inoculação com zoósporos de *Phytophthora nicotianae*. (A) Destaque da região da coifa e ausência de cistos. (B) Destaque da região pilífera e ausência de cistos. (C) Destaque da região de crescimento e setas indicam cistos. Barra = 100 μ m

A contagem dos cistos formados em ambos os genótipos foi possível até 4 horas após a inoculação com zoósporos de *P. nicotianae*. No tempo seguinte avaliado, de 12 horas, não foi possível distinguir seguramente as estruturas do patógeno presentes na superfície das raízes dos porta-enxertos.

No primeiro tempo avaliado, 1 hora após a inoculação, observou-se número aparentemente maior de cistos de *P. nicotianae* sobre raízes de plântulas de tangerineira Sunki do que sobre raízes de plântulas de citrumeleiro Swingle (Figuras 10A a D). Porém tal diferença não foi significativa (Tabela 1). Nesse tempo, visualizaram-se poucos cistos germinados, com pequenos tubos germinativos na superfície das raízes de ambos os genótipos. Widmer; Graham e Mitchell (1998) relataram que zoósporos de *P. nicotianae* germinaram e penetraram nas células da hipoderme das raízes de plântulas de laranjeira Azeda (suscetível) e de Trifoliata (resistente) 1 hora após a inoculação.

Na avaliação 2 horas após a inoculação, a diferença entre o número de cistos na superfície das raízes de ambos os genótipos foi significativa (Tabela 1). Pôde-se observar maior número de cistos sobre a superfície das raízes de plântulas de tangerineira Sunki quando comparadas à superfície das raízes de citrumeleiro Swingle (Figuras 10E a H). Aveling e Rijkenberg (1989) notaram menor atração de zoósporos de *P. cinnamomi* a raízes de cultivar tolerante de abacate, quando comparado ao cultivar suscetível, no entanto, não foram realizadas estimativas quantitativas. Em mirtilo (*Vaccinium* sp.) a atração de zoósporos de *P. cinnamomi* foi maior em raízes da espécie suscetível, quando comparada à resistente, 1 hora após a inoculação (MILHOLLAND, 1975). Sobre a superfície de raízes de plântulas resistentes a *P. lateralis* de cedro do Oregon observou-se menor número de cistos do patógeno do que sobre a superfície de raízes do genótipo suscetível (OH; HANSEN, 2007). Todavia, o número de zoósporos de *P. cinnamomi* sobre a superfície de raízes de plântulas suscetíveis e resistentes de eucalipto foi similar (HALSALL, 1978).

Exsudatos de raiz apresentam vasta gama de compostos de baixo peso molecular. Dessa forma é provável que a atração ocorra devido à atração em direção a substâncias liberadas pelas raízes e difundidas por meio da fase líquida quando em substrato (CARLILE, 1983). Desse modo, a atração dos zoósporos de *P. nicotianae* às raízes de citrumeleiro Swingle e de tangerineira Sunki pode ser outro fator importante que determine os comportamentos de resistência e suscetibilidade. Zoósporos foram atraídos por uma variedade de compostos

químicos que incluem aminoácidos, açúcares, álcoois, aldeídos e compostos fenólicos (CAHILL; HARDHAM, 1994). Zoósporos de *P. cinnamomi* foram atraídos por 32 dos 65 compostos testados por Cahill e Hardham (1994), sendo as substâncias mais atrativas os álcoois, aminoácidos e isovaleraldeídos. Em soja, zoósporos de *P. sojae* foram atraídos por isoflavonas exsudadas de raízes dessas plantas (MORRIS; WARD, 1992). Zoósporos de *P. palmivora* foram atraídos por isovaleraldeídos, valeraldeídos e anti-isovaleraldeídos (CAMEROM; CARLILE, 1981; CARLILE, 1983).

A formação de tubo germinativo pelos cistos foi mais evidente 2 horas após inoculação em ambos os genótipos (Figura 10G e H, setas azuis). Além disso, como constatado em outros patossistemas envolvendo espécies de *Phytophthora*, houve formação de apenas um tubo germinativo por cisto (AVELLING; RIJKENBERG, 1989; MILLER; MAXWELL, 1984).

Após 4 horas da inoculação com zoósporos de *P. nicotianae*, observou-se que a maioria dos cistos se encontrava germinada sobre a superfície das raízes de ambos os porta-enxertos e consequentemente, grande parte estava colapsada (Figuras 10I a L). O elevado número de cistos colapsados na superfície de raízes de plântulas de tangerineira Sunki pode indicar que a penetração do patógeno no hospedeiro tenha ocorrido. Dessa forma, os cistos vazios colapsaram quando submetidos ao vácuo no microscópio eletrônico de varredura. Além disso, após a penetração, os cistos tendem a perder sua propriedade adesiva e desprendem-se do tecido do hospedeiro (TYLER, 2002). Esse fator pode justificar a redução da média de zoósporos com o passar do tempo na superfície de raízes de plântulas de tangerineira Sunki (Tabela 1). Consequentemente, pode explicar a ausência de diferença significativa entre o número de cistos na superfície de raízes de plântulas de citrumeleiro Swingle e de tangerineira Sunki quatro horas após a inoculação (Tabela 1).

Todavia, em plântulas de citrumeleiro Swingle, a redução da média de zoósporos ao longo do tempo não ocorreu (Tabela 1). Essa situação pode indicar que a maioria dos cistos de *P. nicotianae* ainda não completou as fases de germinação e penetração nos tecidos desse hospedeiro. O que revela maior lentidão desses processos em relação aos tecidos das raízes de plântulas de tangerineira Sunki. Desse modo, os cistos ainda não se desprenderam da superfície da plântula hospedeira, mantendo sua média estável ao longo dos tempos analisados (Tabela 1). Da mesma forma, o atraso nas fases de pré-penetração e penetração podem ser mais uma

evidência que explique a diferença na interação de *P. nicotianae* com os porta-enxertos de citrumeleiro Swingle e de tangerineira Sunki.

A contagem após 12 horas da inoculação foi dificultada devido à presença de poucos cistos visíveis (Figuras 10M a N) e de muitas hifas do patógeno sobre a superfície das raízes de citros (Figuras 10O a P).

Figura 10 – Superfície de raízes de citros inoculadas com *Phytophthora nicotianae*. (A-D) uma hora após a inoculação (hai), (E-H) duas hai, (I-L) quatro hai e (M-P) doze hai. (A, C, E, G, I, K, M, O) Citrumeleiro Swingle. (B, D, F, H, J, L, N e P) Tangerineira Sunki. Setas amarelas = cistos. Setas azuis = cistos com tubos germinativos. Setas vermelhas = hifas

Figura 10 – Superfície de raízes de citros inoculadas com *Phytophthora nicotianae*. (A-D) uma hora após a inoculação (hai), (E-H) duas hai, (I-L) quatro hai e (M-P) doze hai. (A, C, E, G, I, K, M, O) Citrumelo Swingle. (B, D, F, H, J, L, N e P) Tangerineira Sunki. Setas amarelas = cistos. Setas azuis = cistos com tubos germinativos. Setas vermelhas = hifas

Tabela 1 – Média do número de cistos de *Phytophthora nicotianae* avaliados em área de 1600 μm^2 de raízes de porta-enxerto de citrumeleiro Swingle e de tangerineira Sunki inoculados com suspensão de zoósporos

Genótipos	Tempo (horas)			CV%
	1	2	4	
Citrumeleiro Swingle	5,7 A a	4,7 B a	4,7 A a	17
Tangerineira Sunki	7,5 A a	7,0 A a	5,4 A b	29

Valores seguidos de letras maiúsculas iguais não diferem entre si nas colunas pelo teste de Tukey a 5%.

Valores seguidos de letras minúsculas iguais não diferem entre si nas linhas pelo teste de Tukey a 5%.

A aparência do tubo germinativo do patógeno sobre a superfície das raízes foi similar, em ambos os porta-enxertos. Houve a formação de estruturas semelhantes à apressórios em alguns casos e em outros não (Figura 11). Estruturas semelhantes também foram observadas em raízes resistentes e suscetíveis de plântulas de cedro do Oregon inoculadas com *P. lateralis* (OH; HANSEN, 2007). Características químicas e físicas da superfície do hospedeiro podem influenciar no direcionamento do tubo germinativo e na diferenciação de estruturas de infecção de alguns fungos fitopatogênicos (HOCH; STAPLES, 1991). Widmer, Graham e Mitchell (1998) observaram dilatações na ponta de tubos germinativos de *P. nicotianae* no local de contato com a parede celular de raízes de citros de plântulas de Trifoliata e de laranjeira Azeda. Os autores acreditam que essas estruturas não se tratam de apressórios, indicativo de penetração mecânica. Segundo os autores, a penetração se dá por meios enzimáticos e não mecânicos por não observarem em microscopia eletrônica de transmissão rompimentos na parede celular no local de penetração do patógeno, onde há a formação dessas estruturas. Estruturas semelhantes a apressórios também foram observadas durante a penetração de tubos germinativos de *P. cinnamomi* em raízes de abacate de plântulas tolerantes e suscetíveis (AVELLING; RIJKENBERG, 1989).

Figura 11 – Superfície de raízes de citros inoculadas com *Phytophthora nicotianae*. (A) Cistos com dilatação na ponta dos tubos germinativos. (B) Cistos com tubo germinativo sem a dilatação em sua ponta. Setas = tubo germinativo dos cistos

4.4 Detecção de compostos fenólicos e lignina por microscopia de luz em tecido fresco

A avaliação dos controles histoquímicos, tanto das secções de raízes não inoculadas quanto das raízes inoculadas de ambos os genótipos, caracterizou a coloração natural, levemente marrom das células da epiderme desses tecidos (Figura 12). Portanto, esse fator não deve ser confundido como resposta positiva aos reagentes.

Figura 12 – Secções longitudinais a fresco de raízes de citros sem adição de corantes (controles histoquímicos), seis dias após o início do experimento. (A) e (C) Raízes não inoculadas, respectivamente, de citrumeleiro Swingle e de tangerineira Sunki. (B) e (D) Raízes inoculadas com *Phytophthora nicotianae*, respectivamente, de citrumeleiro Swingle e de tangerineira Sunki

A análise das secções de raízes de ambos os genótipos inoculados com *P. nicotianae* e avaliados na presença de cloreto férrico não evidenciaram alterações na coloração dos tecidos quando comparados aos respectivos controles (Figura 13 e 14). Da mesma forma, análises histológicas de lesões em ramos de laranja Pêra provocados pelo vírus da leprose dos citros foram negativas para a presença de compostos fenólicos (MARQUES et al., 2007).

No entanto, estudos envolvendo a extração e a análise bioquímica de amostras de raízes de plantas de citrumeleiro Swingle e de tangerineira Sunki realizados por Beltrame (2010) evidenciaram a presença de compostos fenólicos em plantas desses genótipos. Dessa forma, esses compostos provavelmente se encontram presentes, contudo em níveis não detectáveis por meio da metodologia utilizada no presente estudo.

Segundo Schwan-Estrada, Stangarlin, Pascholati (2008), os compostos fenólicos são conhecidos como substâncias fungitóxicas, antibacterianas e antiviróticas e abrangem extenso grupo de substâncias que possuem anel aromático contendo pelo menos uma hidroxila. Os compostos são: fenóis simples e outros glicosilados, ácidos fenol-carboxílicos, derivados dos ácidos benzóico e cinâmico, α -pirones, ligninas, flavonóides e quinonas. Ainda de acordo com os autores, esses compostos ocorrem geralmente na forma de glicosídeos e estão localizados usualmente nos vacúolos celulares das plantas. Em citros, esses compostos são produtos do metabolismo secundário, que se acredita ser resultante da interação planta-ambiente (ZAAT; BRUSSEL; TAK, 1987). Os principais compostos fenólicos encontrados em citros são os flavonóides, antocianinas e coumarinas (ZAAT; BRUSSEL; TAK, 1987).

Cahill et al. (1989) analisaram a presença de compostos fenólicos nas raízes de uma série de espécies vegetais suscetíveis e resistentes a *P. cinnamomi*. Os autores encontraram em secções não coradas de raízes da espécie resistente *Eucalyptus calophylla* um concentrado de material marrom semelhante a fenol nos vasos. Contudo, em tecido de *Gahnia radula*, espécie resistente ao patógeno, os autores não observaram acúmulo de material fenólico.

Figura 13 – Secções longitudinais a fresco de raízes de citrumeleiro Swingle coradas com cloreto fêrrico. (A) e (B) um, (C) e (D) três e (E) e (F) seis dias após o início do experimento. (A), (C) e (E) Raízes não inoculadas. (B), (D) e (F) Raízes inoculadas com *Phytophthora nicotianae*

Figura 14 – Secções longitudinais a fresco de raízes de tangerineira Sunki coradas com cloreto férrico. (A) e (B) um, (C) e (D) três e (E) e (F) seis dias após o início do experimento. (A), (C) e (E) Raízes não inoculadas. (B), (D) e (F) Raízes inoculadas com *Phytophthora nicotianae*

Com relação à aplicação do corante cloreto de zinco iodado sobre as secções de raízes, não foi observada coloração alaranjada que indicasse a alteração de lignina presente nas secções de tecidos não inoculados e inoculados com *P. nicotianae* de ambos os genótipos (Figura 15 e

16). A coloração negro-azulada presente nas secções de raiz, tanto dos tratamentos controles quanto dos tratamentos inoculados de ambos os genótipos, evidencia o amido presente no interior das células. Além disso, na região do cilindro vascular dos dois porta-enxertos, inoculados e não inoculados, observou-se leve coloração alaranjada devido à presença natural de lignina na composição das paredes de determinadas células que compõe essa região. Os resultados estão de acordo com análises bioquímicas realizadas por Beltrame (2010) que, durante nove meses, indicaram a ausência de diferença na concentração de lignina em raízes de plantas de citrumeleiro Swingle e de tangerineira Sunki não inoculadas e inoculadas com *P. nicotianae*.

A lignificação pode impedir o desenvolvimento de fungos no tecido vegetal ao estabelecer barreira mecânica contra o avanço e crescimento do patógeno, por meio de modificação da parede celular, tornando-a mais resistente ao ataque de enzimas hidrolíticas. Também por meio do incremento da resistência das paredes à difusão de toxinas produzidas pelos patógenos, impedindo que nutrientes do hospedeiro sejam utilizados pelo invasor (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008).

A detecção de lignina em secções de raízes de um grupo de espécies suscetíveis e resistentes a *P. cinnamomi* foi examinada por Cahill et al. (1989). A lignificação das paredes celulares ocorreu mais comumente nas raízes das espécies resistentes, todavia, também foram observadas em algumas espécies suscetíveis. Apesar de a lignificação ser considerada um mecanismo de resistência de plantas, ela não foi eficaz em determinadas espécies analisadas por esses autores. Em *Themeda australis*, a lignificação das células corticais ocorreu rapidamente em resposta a invasão por *P. cinnamomi*, contudo, as áreas lignificadas foram ultrapassadas, não evitando o crescimento de *P. cinnamomi*.

Figura 15 – Secções longitudinais a fresco de raízes de citrumeleiro Swingle coradas com cloreto de zinco iodado. (A) e (B) um, (C) e (D) três e (E) e (F) seis dias após o início do experimento. (A), (C) e (E) Raízes não inoculadas. (B), (D) e (F) Raízes inoculadas com *Phytophthora nicotianae*

Figura 16 – Secções longitudinais a fresco de raízes de tangerineira Sunki coradas com cloreto de zinco iodado. (A) e (B) um, (C) e (D) três e (E) e (F) seis dias após o início do experimento. (A), (C) e (E) Raízes não inoculadas. (B), (D) e (F) Raízes inoculadas com *Phytophthora nicotianae*

As amostras emblocadas, seccionadas e coradas com azul de toluidina indicaram tecidos livres da presença do patógeno e com células túrgidas, nas plântulas não inoculadas (Figura 17) e, apresentaram tecidos danificados, com presença de hifas, quando inoculados com zoósporos de

P. nicotianae (Figura 18). Dessa forma, os resultados foram os mesmos obtidos nas análises presentes no item 4.1, com exceção apenas dos resultados observados em raízes de plântulas de citrumeleiro Swingle um dia após a inoculação. Nas secções histológicas desse tratamento não foram detectadas hifas do patógeno no interior das raízes. Contudo notou-se o desenvolvimento dessas estruturas sobre a superfície das raízes do hospedeiro (Figura 18A). A ausência de hifas de *P. nicotianae* no interior das raízes de citrumeleiro Swingle pode ter ocorrido por essas se encontrarem em baixa porcentagem no tempo analisado, dificultado o procedimento. Também pode ter sido devido à diferença de idade entre os tecidos analisados no item 4.1 e esses, que foram com plântulas, respectivamente, de dois e seis meses.

Além disso, em secções de raízes de plântulas não inoculadas e inoculadas de ambos os genótipos e em todos os tempos analisados, observou-se que a primeira camada de células do córtex, logo abaixo da epiderme, apresentou coloração diferenciada. Trata-se de uma possível hipoderme. A hipoderme advém do tecido meristemático fundamental e possui como principal função a reserva de água (MADISON, 1977 apud BATAGIN et al., 2009).

A utilização do azul de toluidina também permite a localização de compostos fenólicos, os quais são destacados como pequenas vesículas de coloração verde no interior das células da planta (NEUMÜLLER; HARTMANN, 2008). No entanto, a presença desses compostos não foi identificada nos tecidos de citrumeleiro Swingle e tangerineira Sunki não inoculados e inoculados com *P. nicotianae*. Na espécie de eucalipto suscetível a *P. cinnamomi*, *Eucalyptus marginata*, observou-se a deposição de material fenólico no córtex, mais particularmente no córtex mais interno (CAHILL et al., 1989). Ao serem coradas com azul de toluidina, as estruturas apresentaram coloração verde brilhante e geralmente preenchiam toda a célula, ocorrendo na forma de glóbulos.

A não identificação de compostos fenólicos e lignina nos tecidos radiculares dos porta-enxertos inoculados com *P. nicotianae* nos períodos analisados, permite inferir que o período considerado não foi suficiente para que a inoculação de *P. nicotianae* induzisse a síntese desses ou que a quantidade produzida não foi capaz de ser detectada por meio desse método.

Figura 17 – Secções longitudinais de raízes de citros não inoculadas e coradas com azul de toluidina, seis dias após o início do experimento. (A) e (B) Citrumeleiro Swingle. (C) e (D) Tangerineira Sunki

Figura 18 – Secções longitudinais de raízes de citros inoculadas com *Phytophthora nicotianae* e coradas com azul de toluidina. (A) e (B) um dia após a inoculação (dai), (C) e (D) três dai e (E) e (F) seis dai. (A), (C) e (E) Citrumelo Swingle. (B), (D) e (F) Tangerineira Sunki. Setas = hifas

4.5 Detecção de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência

Os cromatogramas do HPLC das amostras de raízes de plântulas de tangerineira Sunki e de citrumeleiro Swingle não inoculadas e inoculadas com *P. nicotianae* revelaram a presença de compostos fenólicos (Figura 19). Todavia, a composição quantitativa dos compostos fenólicos não foi significativamente diferente entre raízes de plântulas não inoculadas e inoculadas de ambos os genótipos (Tabela 2). Sendo assim, somente os cromatogramas gerados pelo HPLC das raízes não inoculadas de ambos os genótipos foi exposto para exibição dos picos (Figura 19).

A ausência de diferença na composição quantitativa de compostos fenólicos para ambos os genótipos indica que o processo infeccioso desencadeado por *P. nicotianae* não induziu a produção desses compostos fenólicos em raízes de plântulas de citrumeleiro Swingle e de tangerineira Sunki no tempo estudado. Resultados semelhantes foram obtidos por Beltrame (2010), que não encontrou alterações significativas na concentração de fenóis totais em plântulas não inoculadas e inoculadas com *P. nicotianae* de citrumeleiro Swingle, durante nove meses de estudo.

Entretanto, constatou-se diferença qualitativa na composição dos compostos fenólicos entre os genótipos, principalmente após 158 minutos de eluição das amostras (Figura 19). Assim, para raízes de plântulas de citrumeleiro Swingle, alguns picos referentes a compostos fenólicos mais apolares foram determinados após esse tempo, mostrando que esse genótipo possui composição fenólica qualitativamente diferente de raízes de plântulas de tangerineira Sunki. Com a integração dos picos, os compostos fenólicos analisados no canal de fluorescência de 320 nm foram calculados como equivalentes em apigenina e ácido clorogênico e aqueles analisados no canal de 350 nm foram calculados como equivalentes em rutina (Tabela 2).

Figura 19 – Cromatogramas gerados pelo HPLC do extrato metanólico de raízes não inoculadas de plântulas de (A) citrumeleiro Swingle e de (B) tangerineira Sunki. EA = equivalentes em apigenina; EAC = equivalentes em ácido clorogênico e ER = equivalentes em rutina

O ácido clorogênico é um composto fenólico amplamente distribuído em diferentes partes de muitas espécies de plantas e, geralmente, ocorrendo nos tecidos em quantidades facilmente detectáveis (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008). Corresponde a mecanismo de defesa pré-formado das plantas por atuar de forma direta ao ser oxidado e, pode também funcionar como intermediário metabólico na formação de compostos fenólicos insolúveis, como a lignina (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008). Devido a essas características, o ácido clorogênico tem sido considerado um composto importante na resistência das plantas contra fitopatógeno (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008).

A apigenina e a rutina são flavonóides pertencentes ao grupo das flavonas e estão entre os principais flavonóides isolados em citros (BENAVENTE-GARCÍA et al., 1997). Esses compostos fenólicos constituem ampla classe de metabólitos secundários sintetizados por várias espécies vegetais, especialmente em espécies de citros (BENAVENTE-GARCÍA et al., 1997; RAO, 1990). São comumente encontrados nas raízes, sementes e diversos órgãos vegetais (GRAHAM, 1991; RAO, 1990). Nas relações fungo-plantas, esses compostos atuam como fitoalexinas e como substâncias anti-fúngicas (BAPTISTA; SIQUEIRA, 1994).

Tabela 2 – Composição quantitativa de compostos fenólicos de raízes (mg/g matéria seca) calculados como equivalentes em ácido clorogênico, apigenina e rutina dos genótipos de citros citrumeleiro Swingle e tangerineira Sunki, não inoculados (controle) e inoculados com *Phytophthora nicotianae*

Tratamentos	Apigenina	Ácido clorogênico	Rutina
Citrumeleiro Swingle controle	18,63 b	6,99 b	26,35 a
Citrumeleiro Swingle inoculado	17,54 b	6,34 b	24,59 ab
Tangerineira Sunki controle	28,41 a	17,38 a	14,60 c
Tangerineira Sunki inoculado	29,39 a	18,85 a	16,75 bc
CV%	10,94	11,28	16,23

Valores nas colunas seguidos de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Devido a ausência na alteração da composição dos fenóis nas amostras não inoculadas e inoculadas de ambos os genótipos, os valores foram agrupados e a média desses compostos foi calculada para cada genótipo. Os valores das médias permitiram concluir que raízes de plântulas de tangerineira Sunki apresentaram maior concentração de equivalentes em apigenina e ácido clorogênico que raízes de plântulas de citrumeleiro Swingle (Tabela 3). Essas últimas, por sua

vez, apresentaram maior concentração em equivalentes em rutina que raízes de plântulas de tangerineira Sunki (Tabela 3).

O flavonóide apigenina acumulou-se em cotilédones de soja quando esses foram expostos a eliciadores de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, contudo, pouco é conhecido sobre seu papel na defesa de plantas contra patógenos (MODOLO et al., 2002). A apigenina obtida de *Citrus* spp. demonstrou-se antagonista eficaz contra a sinalização célula a célula e formação de biofilme das bactérias *Escherichia coli* e *Vibrio harveyi* (VIKRAM et al., 2010). Além disso, esse composto isolado em plantas de soja não apresentou efeito inibitório contra *P. sojae* nas concentrações testadas por Rivera-Vargas, Schmitthenner e Graham (1993).

Em estudo envolvendo a interação entre *Bremia lactucae* (um oomiceto) e alface, a aplicação de solução de rutina nos tecidos de alface atrasou a germinação e penetração do patógeno, conferindo resistência ao hospedeiro (PETŘIVALSKÝ et al., 2007 apud LEBEDA et al., 2008). Báidez et al. (2006) também determinaram que a rutina desempenhou importante papel na resistência de oliveiras a *P. megasperma*, sendo o composto fenólico mais tóxico a esse patógeno encontrado nas raízes dessas plantas.

O ácido clorogênico presente em folhas sadias de plantas de batata conferiu certa resistência contra *P. infestans* (VALLE, 1957 apud ROHRINGER; SAMBORSKI, 1967; VIRTANEN; HIETALA; WAHLROOS, 1957 apud ROHRINGER; SAMBORSKI, 1967). A elevação do nível desse ácido foi observada em raízes de batata doce quando inoculadas com *Ceratocystis fimbriata* e em tubérculos de batata inoculados com *P. infestans* (AKAZAWA; WADA, 1961; FRIEND; REYNOLDS; AVEYARD, 1973). Porém, variedades de *Linum usitatissimum* resistentes ao fungo *Melampsora lini* continham menos ácido clorogênico que variedades suscetíveis (CRUICKSHANK; SWAIN, 1956). O resultado evidencia ausência na correlação entre resistência e quantidade desse fenol, situação que ocorre na maioria dos casos com diversos compostos fenólicos durante a fase de pré-infecção (CRUICKSHANK; SWAIN, 1956).

Tabela 3 – Média da composição quantitativa de compostos fenólicos de raízes (mg/g matéria seca) calculados como equivalentes em ácido clorogênico, apigenina e rutina dos genótipos de citros citrumeleiro Swingle e tangerineira Sunki, considerando-se plantas não inoculadas e inoculadas com *Phytophthora nicotianae*

Genótipos	Apigenina	Ácido clorogênico	Rutina
Citrumeleiro Swingle	18,08 b	6,66 b	25,47 a
Tangerineira Sunki	28,90 a	18,11 a	15,67 b
CV%	10,08	11,27	15,39

Valores nas colunas seguidos de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Apesar da detecção de compostos fenólicos por HPLC nos tecidos desses porta-enxertos, os estudos histológicos com corantes específicos realizados no item 4.6 não revelaram a presença dos mesmos. Esses resultados demonstram que essa última técnica não foi suficientemente sensível para tal finalidade em tecidos de citrumeleiro Swingle e tangerineira Sunki.

Baseando-se nos resultados de quantificação de compostos fenólicos, pode-se inferir que os equivalentes em apigenina e ácido clorogênico não desempenharam papel importante na reação dos genótipos à *P. nicotianae*. Tal constatação é revelada pelo fato do genótipo suscetível apresentar maior quantidade desses compostos que o genótipo resistente. Por outro lado, pode-se inferir que os equivalentes em rutina podem desempenhar papel importante nessa interação, uma vez que o genótipo resistente apresentou quantidade significativamente maior desses compostos. Novos estudos poderiam investigar, de maneira mais aprofundada, o real papel desses compostos na reação de genótipos de citros à *P. nicotianae*.

4.6 Detecção de etileno

Os resultados apontaram diferenças significativas na produção de etileno entre plântulas não inoculadas e inoculadas de tangerineira Sunki do primeiro ao sexto dia após a inoculação com zoósporos de *P. nicotianae* e ausência de diferença significativa entre os tratamentos de plântulas de citrumeleiro Swingle (Figura 20). A partir do sétimo dia há declínio da quantidade de etileno produzido por plântulas de tangerineira Sunki inoculadas, provavelmente devido ao colapso do sistema radicular das plântulas infectadas.

Em plântulas de tangerineira Sunki, também se notou dois aparentes picos de produção do gás etileno no segundo e sexto dias do experimento (Figura 20). A formação de dois picos de produção desse gás também foi observada em mudas de três meses de idade de faia (*Fagus*

sylvatica) inoculadas com zoósporos de *P. citricola* (PORTZ et al., 2011). Análises moleculares podem auxiliar na identificação de genes expressados durante os picos.

A média da produção de etileno em plântulas de tangerineira Sunki não inoculadas e inoculadas com *P. nicotianae* foi de, respectivamente, 30,21 e 45,16 pmol h⁻¹ gFW⁻¹ durante o experimento (Anexo A). Assim, plântulas de tangerineira Sunki inoculadas apresentaram produção média de 49,5% (ou aproximadamente uma vez e meia) maior de etileno quando comparadas ao tratamento controle. Em plântulas de citrumeleiro Swingle, a média da produção de etileno de plântulas não inoculadas e inoculadas com *P. nicotianae* foi de 21,25 e 21,18 pmol h⁻¹ gFW⁻¹, respectivamente (Anexo A).

Os resultados corroboram os obtidos por Beltrame (2010). O autor observou diferença significativa em folhas destacadas de plântulas de tangerineira Sunki inoculadas com *P. nicotianae*, porém não em folhas destacadas de plântulas de citrumeleiro Swingle inoculadas. No entanto, esse autor observou apenas um pico do gás no genótipo suscetível, que ocorreu seis e sete dias após a inoculação e foi cerca de cinco vezes maior que o tratamento controle do mesmo genótipo. Essa diferença pode estar ligada às diferentes idades das plântulas ou metodologias utilizadas nos experimentos.

A análise somente de folhas de plântulas infectadas realizado por Beltrame (2010) serve como evidência de que esse hormônio é produzido pela plântula e não pelo patógeno. Em condições *in vitro*, bactérias e fungos fitopatogênicos produtores de etileno geralmente não produzem esse gás em concentração suficiente a ponto de causar necroses em plantas (PEGG; CRONSHAW, 1976). Dessa forma, é mais provável tratar-se de um sinal derivado do hospedeiro que regula a morte celular generalizada durante a interação de suscetibilidade em resposta a infecção por patógeno (LUND; STALL; KLEE, 1998).

Figura 20 – Produção de etileno durante dez dias por porta-enxertos de citrumeleiro Swingle e tangerineira Sunki não inoculados (controle) e inoculados com *Phytophthora nicotianae*. * valores significativamente diferentes pelo Teste Tukey a 5% entre plântulas não inoculadas e inoculadas pertencentes ao mesmo genótipo

O etileno é um hidrocarboneto que regula diversos processos morfogênicos nas plantas, como germinação, senescência, abscisão, etc (DUTTA; BIGGS, 1991). Além de ser funcional durante estresses abióticos e bióticos, como temperaturas elevadas, seca, fermentos e infecções por patógenos (GERAATS et al., 2003). Dependendo do sistema, o envolvimento do etileno na patogênese pode tanto induzir mecanismos de defesa na planta hospedeira, como agravar o desenvolvimento de sintomas (DUTTA; BIGGS, 1991; GERAATS et al., 2003). Baldwin e Biggs (1988) demonstraram que a lise da parede celular por enzimas e os produtos da digestão da parede celular em células de frutos de citros induziram a liberação de etileno.

Entretanto, há controvérsias sobre se o etileno produzido pelo hospedeiro seria um sinal que age para ampliar a morte celular durante a resposta de suscetibilidade ou se o aumento da síntese de etileno estaria simplesmente correlacionado com o avanço dos sintomas da doença e não apresentaria significado biológico ao processo (LUND; STALL; KLEE, 1998). Baseado nessas informações, nas análises aqui presentes e nas obtidas no item 4.1, pode-se sugerir que o gás etileno atua sinergicamente com *P. nicotianae* para acelerar o desenvolvimento de sintomas em raízes de plântulas de tangerineira Sunki inoculadas, as quais apresentaram o tecido da raiz mais danificado. Ou trata-se apenas de um gás sendo liberado pela plântula devido ao avanço dos

sintomas da doença. Além disso, a semelhante produção de etileno por plântulas não inoculadas e inoculadas de citrumeleiro Swingle leva a crer que o etileno não está relacionado com a ativação de mecanismos de defesa contra *P. nicotianae* nessas plântulas.

De acordo com Lund, Stall e Klee (1998), tem-se levantado a hipótese de que o etileno derivado do hospedeiro corresponde a importante sinal para o desenvolvimento da doença. Estudos anteriores têm demonstrado, em várias espécies, correlação do tempo entre a evolução do aumento do etileno em resposta à infecção por patógenos e o desenvolvimento de sintomas de clorose e podridão (LUND; STALL; KLEE, 1998). O acúmulo e a elevação da atividade de enzimas de relacionadas à síntese de etileno foram localizados em tecidos cloróticos que circundavam diretamente as lesões primárias em folhas de tabaco em resposta a infecções por tobacco mosaic virus (DE LAAT; VAN LOON, 1983 apud LUND; STALL; KLEE, 1998) e *P. infestans* (SPANU; BOLLER, 1989).

Lund, Stall e Klee (1998) demonstraram que o etileno tem papel no desenvolvimento das doenças em tomateiro infectados com as bactérias *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e com o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* W.C. Snyder & H.N. Hansen, pois plantas deficientes na percepção do etileno apresentaram redução significativa dos sintomas da doença quando infectadas pelos patógenos. A aplicação exógena de etileno estimulou doença provocada por *Botrytis cinerea* Pers. em feijoeiro, pepineiro, tomateiro e roseira (BOLLER, 1991 apud GERAATS et al., 2003). Os resultados desses autores indicam que a engenharia da insensibilidade ao etileno em tecidos vegetativos de diversas plantas pode potencialmente causar tolerância durável a amplo espectro de patógenos virulentos.

Mais estudos devem ser realizados para melhor definição do papel do gás etileno na interação entre *P. nicotianae* e raízes de plântulas de tangerineira Sunki.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos pelas análises em microscopia eletrônica de varredura, microscopia de luz e microscopia confocal permitem inferir que a resistência de citrumeleiro Swingle à *Phytophthora nicotianae* está relacionada à menor atração aos zoósporos, menor colonização, atraso na reprodução do patógeno, menor dano celular, além de menor acúmulo da elicítina do patógeno em seus tecidos radiculares, quando comparado à tangerineira Sunki.

Na tentativa de revelar o papel dos compostos fenólicos nessa reação, os estudos histológicos por meio de corantes específicos falharam na detecção dessas substâncias. As análises por HPLC revelaram que o citrumeleiro Swingle possui quantidade significativamente maior de equivalentes em rutina em seus tecidos, de maneira constitutiva. Todavia, o real papel desses flavonóides não pôde ser esclarecido nesse estudo.

Finalmente, demonstrou-se que a reação de suscetibilidade de tangerineira Sunki à *P. nicotianae* pode estar relacionada à maior produção do gás etileno pelas plântulas desse genótipo quando inoculadas com o patógeno.

Esse estudo permite o direcionamento de futuras pesquisas, no sentido de revelar o real papel dos flavonóides equivalentes em rutina e do gás etileno na interação entre esses porta-enxertos de citros e *P. nicotianae*.

REFERÊNCIAS

- AFEK, U.; SZTEJNBERG, A. Accumulation of scoparone, a phytoalexin associated with resistance of citrus to *Phytophthora citrophthora*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 78, p. 1678-1682, 1988.
- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005 922 p.
- AKAZAWA, T.; WADA, K. Analytical study of ipomeamarone and chlorogenic acid alterations in sweet potato root infected by *Ceratocystis fimbriata*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 36, p. 139-144, 1961.
- ALBRECHT, U.; BOWMAN, K.D. Inducible proteins in citrus rootstocks with different tolerance towards the root rot pathogen *Phytophthora palmivora*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 155, p. 606–615, 2007.
- AMARO, A.A.; MAIA, M.L. Produção e comércio de laranja e de suco no Brasil. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 27, p. 11-23, 1997.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; HAYASHI, A.H. Raiz. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO. (Ed.). **Anatomia vegetal**. Viçosa: Ed. UFV, 2006. p. 267-281.
- AUGUSTÍ, M. **Citricultura**. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 2003. 422 p.
- AVELLING, T.A.S.; RIJKENBERG, F.H.J. Behaviour of *Phytophthora cinnamomi* zoospores on roots of four avocado cultivars. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 125, p. 157-164, 1989.
- BÁIDEZ, A.G.; GÓMEZ, P.; DEL RÍO, J.A.; ORTUÑO, A. Antifungal capacity of major phenolic compounds of *Olea europaea* L. against *Phytophthora megasperma* Drechsler and *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 69, p. 224-229, 2006.
- BALDWIN, E.A.; BIGGS, R.H. Cell-wall lysing enzymes and products of cell-wall digestion elicit ethylene in citrus. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 73, p. 58-64, 1988.
- BAPTISTA, M.J.; SIQUEIRA, J.O. Efeito de flavonóides na germinação de esporos e no crescimento assimbiótico do fungo micorrízico arbuscular *Gigaspora gigantea*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 6, p. 127-134, 1994.
- BASSAN, M.M.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; FREIRE, B.F.S.; CANTUARIAS-ÁVIES, T.E.; BELTRAME, A.B. Reação de híbridos somáticos de citros à infecção por *Phytophthora nicotianae*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, p. 429-435, 2010.

BATAGIN, K.D.; ALMEIRA, C.V.; TANAKA, F.A.O.; ALMEIDA, M. Alterações morfológicas foliares em abacaxizeiros cv. IAC “Gomo-de-mel” micropropagados e aclimatizados em diferentes condições de luminosidade. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 23, p. 89-92, 2009.

BECK, W.; VAN HOEK, R.; ENGELHARDT, H. Application of a diode-array detector in capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, Wheiwheim, v. 14, p. 540-546, 1993.

BEDENDO, I.P.; AMORIM, L. Ambiente e doença. In: AMORIM, L.; KIMATI, H.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. v. 1, p.133-148.

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

BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J.; MARIN, F.R.; ORTUÑO, A.; DEL RÍO, J.A. Uses and properties of *Citrus* flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, p. 4505-4515, 1997.

BENHAMOU, N.; CÔTÉ, F. Ultrastructure and cytochemistry of pectin and cellulose degradation in tobacco roots infected by *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 82, p. 468-478, 1992.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Ministério da Agricultura e Pecuária. In: OLIVEIRA, P. **Em São Paulo, produção de laranja migra para o centro-sul**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/politica-agricola/noticias/2011/09/em-sao-paulo-producao-de-laranja-migra-para-o-centro-sul>> Acesso em: 14 set. 2011.

BRUMMER, M.; AREND, M.; FROMM, J.; SCHLENZIG, A.; OBWALD, W.F. Ultrastructural changes and immunocytochemical localization of the elicitor quercinin in *Quercus robur* L. roots infected with *Phytophthora quercina*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 61, p. 109-120, 2002.

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

CAHILL, D.; LEGGE, N.; GRANT, B.; WESTE, G. Cellular histological changes induced by *Phytophthora cinnamomi* in a group of plant species ranging from fully susceptible to fully resistant. **Phytopathology**, Lancaster, v. 79, p. 417-424, 1989.

CAMARGO, L.E.A. Genética da interação patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L.; KIMATI, H.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. v. 1, p. 119-132.

CAMERON, J.N.; CARLILE, M.J. Binding of isovaleraldehyde, an attractant, to zoospores of the fungus *Phytophthora palmivora* in relation to zoospore chemotaxis. **Journal of Cell Science**, London, v. 49, p. 273-281, 1981.

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

CRUICKSHANK, I. A.M.; SWAIN, T. Study of phenolic compounds in oil-flax (*Linum usitatissimum*). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 7, p. 410-415, 1956.

DAVIES, F. S.; ALBRIGO, L. G. **Citrus**. Wallingford: CAB International, 1994. 254 p.

DEVERGNE, J.C.; BONNET, P.; PANABIÈRES, F.; BLEIN, J.P; RICCI, P. Migration of the fungal protein cryptogein within tobacco plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 99, p. 843-847, 1992.

DORNELLES, C.M.M. **Introdução à citricultura**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1988. 92 p.

DUTTA, S.; BIGGS, R.H. Regulation of ethylene biosynthesis in citrus leaves infected with *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 82, p. 225-230, 1991.

EBEL, J.; GRISEBACH, H. Defense strategies of soybean against the fungus *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*: a molecular analysis. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 13, p. 23-27, 1988.

ERWIN, D.C.; RIBEIRO, O.K. **Phytophthora diseases worldwide**. St. Paul: APS Press, 1996. 562 p.

FAO. FAO Statistics Division. Disponível em:

<<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>> Acesso em: 29 ago. 2011.

FEICHTENBERGER, E. **Manejo ecológico de gomose de *Phytophthora* dos citros**. São Paulo: Rhodia Agro, 1996. 41 p.

_____. Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros. In: LUZ, E.D.M.N.; SANTOS, A.F.; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J.L. **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Livraria Editora Rural, 2001. p. 283-342.

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

FLEISCHMANN, F.; KOEHL, J.; PORTZ, R.; BELTRAME, A.B.; OBWALD, 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, p. 650-658, 2005.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Citros. In: _____. **Agrianual 2010**: anuário de agricultura brasileira. São Paulo, 2010. p. 271-306.

_____. Citros. In: _____. **Agrianual 2011**: anuário de agricultura brasileira. São Paulo, 2011. p. 245-277.

FOLHA DE SÃO PAULO. **OMC decide a favor do Brasil em disputa sobre suco de laranja**. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/mercado/893911-omc-decide-a-favor-do-brasil-em-disputa-sobre-suco-de-laranja.shtml>> Acesso em: 20 ago. 2011.

FRIEND, J.; REYNOLDS, S.B.; AVEYARD, M.A. Phenylalanine ammonia lyase, chlorogenic acid and lignin in potato tuber tissue inoculated with *Phytophthora infestans*. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 3, p. 495-507, 1973.

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. **Fundo de Defesa da Citricultura**. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/Noticias/07.02.11---Incidencia-de-cancro-citrico-cresce-no-Estado-de-Sao-Paulo,166>> Acesso em: 20 ago. 2011a.

_____. **Fundo de Defesa da Citricultura**. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/Noticias/29.11.10---CVC-diminui-no-Estado-de-Sao-Paulo,162>. Acesso em: 20 ago. 2011b.

GERAATS, B.P.J.; BAKKER, P.A.H.M.; LAWRENCE, C.B.; ACHUO, E.A.; HÖFTE, M.; VAN LOON, L.C. Ethylene-insensitive tobacco shows differentially altered susceptibility to different pathogens. **Phytopathology**, Lancaster, v. 93, p. 813-821, 2003.

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

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

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

GRAHAM, T.L. Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exsudate. **Plant Physiology**, Rockville, v. 95, p. 594-603, 1991.

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

HALSALL, D.M. A comparison of *Phytophthora cinnamomi* infection in *Eucalyptus sieberi*, a susceptible species, and *Eucalyptus maculata*, a field resistant species. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 26, p. 643-655, 1978.

HO, H.H.; ZENTMYER, G.A. Infection of avocado and other species of *Persea* by *Phytophthora cinnamomi*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 67, p. 1085-1089, 1977.

HOCH, H.C.; STAPLES, R.C. Signaling for infection structure formation in fungi. In: COLE, G.T.; HOCH, H.C. (Ed.). **Fungal spore and disease initiation in plant and animals**. New York: Plenum Press, 1991. p. 25-46.

JENSEN, W.A. **Botanical histochemistry**. San Francisco: W.H. Freeman, 1962. 408 p.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGrawHill, 1940. 523 p.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137-138, 1965.

LE BERRE, J.Y.; ENGLER G., PANABIÈRES F. Exploration of the late stages of the tomato-*Phytophthora parasitica* interactions through histological analysis and generation of expressed sequence tags. **New Phytologist**, London, v. 177, p. 480-492, 2008.

LEBEDA, A.; SEDLÁŘOVÁ, M.; PETŘIVÁLSKÝ, M.; PROKOPOVÁ, J. Diversity of defence mechanisms in plant-oomycete interactions: a case study of *Lactuca* spp. and *Bremia lactucae*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 122, p. 71-89, 2008.

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

LHERMINIER, J.; BENHAMOU, N.; LARRUE, J.; MILAT, M.L.; BOUDON-PADIEU, E.; NICOLE, M.; BLEIN, J.P. Cytological characterization of elicitor-induced protection in tobacco plants infected by *Phytophthora parasitica* or phytoplasma. **Phytopathology**, Lancaster, v. 93, p. 1308-1319, 2003.

LO, S.C.C.; NICHOLSON, R.L. Compostos fenólicos e a importância nas doenças em plantas. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 285-303.

LOPES, F. **Cresce consumo de suco nos emergentes**. Disponível em: <<http://www.associtrus.com.br/index.php?xvar=mostra-noticia&id=2699&idtipo=1>> Acesso em: 14 set. 2011.

LUND, S.T.; STALL, R.E.; KLEE, H.J. Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 10, p. 371-382, 1998.

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

MANTER, D.K.; KELSEY, R.G.; KARCHESY, J.J. Photosynthetic declines in *Phytophthora ramorum*-infected plants develop prior to water stress and in response to exogenous application of elicitors. **Phytopathology**, Lancaster, v. 97, p. 850-856, 2007.

MARQUES, J.P.R.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W.; APEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Lesões foliares e de ramos de laranjeira-doce causadas pela leprose dos citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p. 1531-1536, 2007.

MASSOLA JR., N.S.; KRUGNER, T.L. Fungos fitopatogênicos. In: AMORIM, L.; KIMATI, H.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. v. 1, p. 149-206.

MAYR, U.; MICHALEK, S.; TREUTTER, D.; FEUCHT, W. Phenolic compounds of apple and their relationship to scab resistance. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 145, p. 69-75, 1997.

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

MILAT, M.L.; RICCI, P.; BLEIN, J.P. Capsidiol and ethylene production by tobacco cells in response to cryptogein, an elicitor from *Phytophthora cryptogea*. **Phytochemistry**, London, v. 30, p. 2171-2173, 1991.

MILHOLLAND, R.D. Pathogenicity and histopathology of *Phytophthora cinnamomi* on highbush and rabbiteye blueberry. **Phytopathology**, Lancaster, v. 65, p. 789-793, 1975.

MILLER, S.A.; MAXWELL, D.P. Light microscope observations of susceptible, host resistant, and nonhost resistant interactions of alfafa with *Pytophthora megasperma*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 62, p. 109-116, 1984.

MODOLO, L.V.; CUNHA, F.Q.; BRAGA, M.R.; SALGADO, I. Nitric oxide synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* elicitor. **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, p. 1288-1297, 2002.

MOREIRA, C.S.; MOREIRA, S. História da citricultura no Brasil. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A.S. **Citricultura brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v. 1, p. 1-21.

MORRIS, B.M.; GOW, N.A.R. Mechanism of electrotaxis of phytopathogenic fungi. **Phytopathology**, Lancaster, v. 83, p. 877-882, 1993.

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

NEUMÜLLER, M.; HARTMANN, W. The phenotypically quantitative nature of hypersensitivity of European plum (*Prunus domestica* L.) against the Plum pox virus and its description using the hypersensitivity index. **Horticultural Science**, Praga, v. 35, p. 50-64, 2008.

NEVES, M.F.; JANK, M.S. **Perspectivas da cadeira produtiva de laranja no Brasil: a agenda 2015**. 2006. Disponível em: <http://www.fundace.org.br/arquivos_diversos/agenda_estrategica/Agenda_Citrus_2015_PENSA_ICONE.pdf> Acesso em: 14 set. 2011.

OH, E.; HANSEN, E.M. Histopathology of infection and colonization of susceptible and resistant Port-Orford-Cedar by *Phytophthora lateralis*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 97, p. 684-693, 2007.

OUTRAS...Citricultura tornou-se rentável a partir do século 20. **Visão Agrícola**, Piracicaba, v. 2, p. 98-99, 2004.

PASCHOLATI, S.F. Fisiologia do parasitismo: como os patógenos atacam as plantas In: AMORIM, L.; KIMATI, H.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011a. v. 1, p. 543-592.

_____. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos In: AMORIM, L.; KIMATI, H.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011b. v. 1, p. 593-636.

PEGG, G.F.; AND CRONSHAW, D.K. The relationship of *in vitro* and *in vivo* ethylene production in *Pseudomonas solanacearum* infection of tomato. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 9, p. 145-154, 1976.

PERNOLLET, J.C.; SALLATIN, M.; SALLÉ-TOURNE, M.; HUET, J.C. Elicitin isoforms from seven *Phytophthora* species: comparison of their physico-chemical properties and toxicity to tobacco and other plant species. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 42, p. 53-67, 1993.

POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A.S. **Citricultura brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v. 1, p. 265-280.

_____. Porta-enxertos. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico; Fundag; Cordeirópolis: Centro Apta Citros Sylvio Moreira, 2005. p. 63-104.

PORTO, G. **Incidência de greening e de plantas eliminadas cai em SP**. Disponível em: <<http://www.canalrural.com.br/canalrural/jsp/default.jsp?uf=1&local=1&id=3182064&action=noticias>> Acesso em: 17 mar. 2011.

PORTZ, R.L.; FLEISCHMANN, F.; KOEHL, J.; FROMM, J.; ERNST, D.; PASCHOLATI, S.F.; OSSWALD, W.F. Histological, physiological and molecular investigations of *Fagus sylvatica* seedlings infected with *Phytophthora citricola*. **Forest Pathology**, Berlin, v. 41, p. 202-211, 2011.

RAO, A.S. Root flavonoids. **Botanical Review**, Lancaster, v. 56, p. 1-84, 1990.

RIVERA-VARGAS, L.I.; SCHMITTHENNER, A.F.; GRAHAM, T.L. Soybean flavonoid effects on and metabolism by *Phytophthora sojae*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 32, p. 851-857, 1993.

ROHRINGER, R.; SAMBORSKI, D.J. Aromatic compounds in the host-parasite interaction. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 5, p. 77-86, 1967.

SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology**, Baltimore, v. 48, p. 247-249, 1973.

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. p. 227-248.

SOARES FILHO, W.S.; VILARINHOS, A.D.; ALVES, A.L.A.C.; SOBRINHO, A.P.C.; OLIVEIRA, A.A.R.; SOUZA, A.S.; LEDO, C.A.S.; CRUZ, J.L.; CASTRO NETO, M.T.; GUERRA FILHO, M.S.; PASSOS, O.S.; MEISSNER FILHO, P.E. **Programa de melhoramento genético de citros da Embrapa Mandioca e Fruticulturas: obtenção de híbridos**. Embrapa, 2003. 37 p. (EMBRAPA. Documentos, 106)

SPANU, P.; BOLLER, T. Ethylene biosynthesis in tomato plants infected by *Phytophthora infestans*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 134, p. 533-537, 1989.

TIMMER, L.W.; GARNSEY, S.M.; GRAHAM, J.M. **Compendium of citrus diseases**. St. Paul: APS Press, 2000. 80 p.

TYLER, B.M. Molecular basis of recognition between *Phytophthora* pathogens and their hosts. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 137-167, 2002.

VAN LOON, L.C.; GERAATS, B.P.J.; LINTHORST, H.J.M. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 11, p. 184-191, 2006.

VIKRAM, A.; JAYAPRAKASHA, G.K.; JESUDHASAN, P.R.; PILLAI, S.D.; PATIL, B.S. Suppression of bacterial cell-cell signaling, biofilm formation and type III secretion system by citrus flavonoids. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 109, p. 515-527, 2010.

WIDMER, T.L.; GRAHAM, J.H.; MITCHELL, D.J. Histological comparison of fibrous root infection of disease-tolerant and susceptible citrus hosts by *Phytophthora nicotianae* and *P. palmivora*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 88, p. 389-395, 1998.

WUTSCHER, H.K. **Citrus rootstocks**. Lake Alfred: University of Florida, 1991.15 p.

YU, L.M. Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 92, p. 4088-4094, 1995.

ZAAT, S.A.J.; BRUSSEL, A.A.N.V.; TAK, T. Flavonoids induce *Rhizobium leguminosarum* to produce nodBABC gene-related factors that cause thick, short roots and root hair responses on common vetch. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 169, p. 3388-3391, 1987.

ANEXOS

Anexo A – Média da produção de etileno por dia ($\text{pmol h}^{-1} \text{gFW}^{-1}$) e média da somatória dos dias da produção de etileno ($\text{pmol h}^{-1} \text{gFW}^{-1}$) de porta-enxertos de citrumeleiro Swingle e de tangerineira Sunki não inoculados e inoculados com *Phytophthora nicotianae*

Dias	Controle		Inoculado	
	Citrumeleiro Swingle	Tangerineira Sunki	Citrumeleiro Swingle	Tangerineira Sunki
1	22,99	38,96	22,02	62,38
2	21,79	37,16	25,43	68,45
3	18,69	22,40	16,41	39,68
4	19,06	26,32	21,95	41,72
5	29,96	34,71	28,45	40,87
6	25,78	31,17	24,40	50,71
7	21,14	31,69	20,34	45,11
8	20,47	30,19	22,85	39,95
9	18,49	25,92	16,14	34,84
10	14,07	23,53	13,79	27,89
Média	21,25	30,21	21,18	45,16
CV%	20,5	18,70	21,62	27,23