Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Interação *Phytophthora nicotianae* - porta-enxerto de citros (tangerina Sunki e citrumelo Swingle): efeito no sistema radicular, aspectos fisiológicos e bioquímicos

André Boldrin Beltrame

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

Piracicaba
2010

André Boldrin Beltrame
Engenheiro Agrônomo

Interação *Phytophthora nicotianae* - porta-enxerto de citros (tangerina Sunki e citrumelo Swingle): efeito no sistema radicular, aspectos fisiológicos e bioquímicos

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

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

Piracicaba
2010

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

Beltrame, André Boldrin
Interação *Phytophthora nicotianae* - porta-enxerto de citros (tangerina Sunki e citrumelo Swingle): efeito no sistema radicular, aspectos fisiológicos e bioquímicos / André Boldrin Beltrame. - - Piracicaba, 2010.
137 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Bioquímica vegetal 2. Doenças de plantas 3. Fisiologia vegetal 4. Gomose 5
Porta-enxertos 6. Sistema radicular 7. Tangerina I. Título

CDD 634.3
B453i

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

Aos meus pais João Américo e Helenice
irmãs Aline e Camila
e namorada Ana Elisa

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sérgio F. Pascholati pela paciência, oportunidade e orientação.

Ao Pesquisador Científico MSc. Eduardo Feichtenberger que colaborou de forma essencial para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos colegas Alexander, Ana Paula, Ariana, Cíntia, Dalilla, Ely, Fernando, Frank, Fúvia, Greicy, Josué, Joy, Julia, Isolada, Leonardo, Luciana Oharomari, Luciana Iurkiv, Maria Cristina, Maria Eugenia, Marisa, Marizete, Maurício, Nikolas, Nívea, Roberto, Rosemaie, Simone, Silvia e Ueliton, Wilma pelo apoio e aprendizagem.

Aos amigos Cristiana, José Vitor, Marcos, Marina, Oscar e Rodrigo pela amizade e convívio.

Aos Professores Dr. Robson Marcelo Di Piero (Universidade Federal de Santa Catarina) e Dr. Odair José Kuhn que (Universidade Federal do Pampa) foram fundamentais na minha formação.

Aos Professores Dr. Angelo Jacomino (ESALQ/USP) e Dr. Wolfgang Oßwald (Universidade Técnica de Munique), aos Eng. Agrônomo Antonio Ricardo Violante (Cutrale, São João da Boa Vista) e MSc. Antonio Juliano Ayres (Citrosol, Mendonça) e ao FUNDECITRUS (Araraquara) e Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” (Cordeirópolis) pela disponibilização de laboratório e/ou fornecimento de material para a realização desse trabalho.

Aos funcionários e professores do Departamento de Fitopatologia e Nematologia.

Ao CNPq e a CAPES pelas bolsas de estudos.

SUMÁRIO

RESUMO 9
ABSTRACT 11
1 INTRODUÇÃO 13
2 DESENVOLVIMENTO 15
2.1 Revisão bibliográfica 15
2.1.1 Citros 15
2.1.2 Doenças causadas por *Phytophthora* spp. em citros 17
2.1.3 Mecanismos de resistência das plantas 21
2.1.4 Espécies reativas de oxigênio e sinalização 22
2.1.5 Rotas metabólicas 26
2.1.6 Fenóis 29
2.1.7 Enzimas envolvidas na defesa de plantas 32
2.1.7.1 Proteínas relacionadas à patogênese 32
2.1.7.1.1 Glucanases 33
2.1.7.1.2 Quitinases 35
2.1.7.1.3 Peroxidases 36
2.1.7.2 Fenilalanina amônia-liase 38
2.1.7.3 Polifenoloxidase 39
2.1.8 Alterações fisiológicas provocada por patógenos 41
2.2 Material e métodos 45
2.2.1 Obtenção das plantas hospedeiras 45
2.2.2 Seleção do isolado de *Phytophthora nicotianae* 46
2.2.3 Produção de inóculo, inoculação dos porta-enxertos, quantificação da troca gasosa, da biomassa do sistema radicular e detecção do patógeno 47
2.2.4 Inoculação das plântulas sob condições de câmara de crescimento, quantificação da troca gasosa e do consumo de água 49
2.2.5 Etileno 49
2.2.6 Extração de DNA de radicelas de plântulas de citros 50
2.2.7 Detecção e quantificação de *P. nicotianae* em raízes de plântulas de citros 50

2.2.8 Obtenção de extrato de folhas e de raízes....51
2.2.9 Carboidratos....51
2.2.10 Proteínas....53
2.2.11 Atividade de superóxido dismutase....53
2.2.12 Atividade de catalase....53
2.2.13 Atividade de quitinase....54
2.2.14 Atividade de β-1,3-glucanase....54
2.2.15 Atividade da guaiacol peroxidase....55
2.2.16 Atividade de polifenoloxidase....55
2.2.17 Atividade de fenilalanina amônia-liase....55
2.2.18 Fenóis totais....56
2.2.19 Lignina....56
2.3 Resultados e discussão....57
2.3.1 Seleção do isolado de *Phytophthora nicotianae*....57
2.3.2 Avaliação da troca gasosa e da biomassa do sistema radicular....59
2.3.3 Detecção e quantificação de *P. nicotianae* em raízes de plântulas de citros....66
2.3.4 Etileno....69
2.3.5 Carboidratos....71
2.3.6 Proteínas....79
2.3.7 Superóxido dismutase, catalase e guaiacol peroxidase....80
2.3.8 Glucanase e quitinase....84
2.3.9 Fenilalanina amônia-liase, polifenoloxidase, compostos fenóis totais e lignina....88
3 CONCLUSÕES....95
REFERÊNCIAS....97
ANEXO....135

RESUMO

Interação *Phytophthora nicotianae* - porta-enxerto de citros (tangerina Sunki e citrumelo Swingle): efeito no sistema radicular, aspectos fisiológicos e bioquímicos

Doenças causadas por *Phytophthora* spp. ocorrem em todas as regiões produtoras de citros do mundo e as manifestações mais comuns são a podridão do pé e de raízes. A principal medida de controle desses patógenos é a exclusão, porém em áreas contaminadas o mesmo pode ser obtido através do uso de produtos químicos ou com o plantio de copas enxertadas sobre porta-enxertos resistentes, que onera menos o custo de produção. Os porta-enxertos menos suscetíveis a *Phytophthora nicotianae* são o citrumelo Swingle e o *Poncirus trifoliata*. Apesar de sua importância, pouco se sabe sobre as alterações fisiológicas e bioquímicas da interação citros - *P. nicotianae*. Dessa maneira, o trabalho visou analisar e comparar alterações fisiológicas e bioquímicas provocadas por *P. nicotianae* em dois porta enxertos de citros: tangerina Sunki (suscetível) e citrumelo Swingle (resistente). Para tanto, porta-enxertos das duas variedades com nove ou dois meses de cultivo tiveram as raízes inoculadas com *P. nicotianae*. As plantas mais velhas foram mantidas sob condições de campo por nove meses e as mais novas foram mantidas por uma semana a 28 ^{o}C sob 12 h de luz. Periodicamente, avaliou-se a biomassa do sistema radicular e a colonização pelo patógeno, bem como parâmetros fisiológicos: troca gasosa, consumo de água e produção de etileno; do metabolismo primário: carboidratos e proteínas; e secundário: atividades da superóxido dismutase, catalase, quitinase, β-1,3-glucanase, guaiacol peroxidase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase, fenóis totais e lignina. Observou-se nos porta-enxertos inoculados aos nove meses de cultivo que *P. nicotianae* comprometeu o sistema radicular e a troca gasosa apenas de tangerina Sunki a partir do quarto e quinto meses após a inoculação, respectivamente. A concentração de carboidratos em raízes de tangerina Sunki foi reduzida pelo patógeno a partir do terceiro mês após a inoculação, enquanto que em citrumelo Swingle só foram detectadas diferenças no terceiro e no quinto meses após a inoculação. Além disso, análises em HPLC, que envolveram os porta-enxertos com dois meses de cultivo, mostraram que as concentrações de sacarose e glicose em raízes de citrumelo Swingle foram afetadas pelo patógeno. Ademais, *P. nicotianae* estimulou a produção de etileno em plântulas de tangerina Sunki seis e sete dias após a inoculação, bem como reduziu a troca gasosa e o consumo de água nesse porta-enxerto a partir do quarto e quinto dia após a inoculação, respectivamente. Conclui-se que *P. nicotianae* reduz o sistema radicular de tangerina Sunki, o que diminui as trocas gasosas e afeta o balanço hídrico e estimula a síntese de etileno. Além disso, inicialmente *P. nicotianae* altera o metabolismo de carboidratos em raízes de citrumelo Swingle, seguida por reduções mais severas nas concentrações de açúcares em raízes de tangerina Sunki. Finalmente, não foram verificadas alterações relevantes no metabolismo secundário, que pudessem auxiliar na elucidação dos mecanismos de resistência de citrumelo Swingle a *P. nicotianae*.

Palavras-chave: Tangerina Sunki; Citrumelo Swingle; Gomose de Phytophthora

ABSTRACT

Phytophthora nicotianae - citrus rootstocks (Sunki tangerine and Swingle Citrumelo) interactions: effect on root system, physiological and biochemical aspects

Phytophthora diseases affect citrus plantations all over the world and the main symptoms are foot and root rot. Exclusion is the most important control method for these diseases, but they can be controlled in infected areas by using chemical control, or by planting scion grafted on resistant rootstocks, which is less costly. The less susceptible rootstocks to *Phytophthora nicotianae* are Swingle citrumelo and *Poncirus trifoliata*. Besides the importance of citrus-*P. nicotianae* interactions, it is still poorly understood its physiology and biochemistry. In this way, the objectives of this work were to analyze and to compare physiological and biochemical changes caused by *P. nicotianae* in two citrus rootstock: Sunki tangerine (susceptible) and Swingle citrumelo (resistant). Initially, nine and two months-old plants of both genotypes had their roots inoculated with *P. nicotianae*. The oldest plants were kept under field conditions during nine months and the youngest ones were incubated at 28 ^{o}C under 12 h of light for one week. Periodically, it was analyzed root biomass and pathogen colonization as well as physiological parameters: gas exchange, water consumption and ethylene production; primary metabolism: carbohydrates and protein; and secondary metabolism: superoxide dismutase, catalase, chitinase, β-1,3-glucanase, guaiacol peroxidase, polyphenoloxydase, phenylalanine ammonia-lyase activities, total phenolics and lignin content. *P. nicotianae* reduced the root system and gas exchange of Sunki tangerine on the oldest rootstocks after the fourth and fifth months after the inoculation, respectively. This rootstock also showed reduction on the root carbohydrate content from the third month after the inoculation to the end of the experiment. On the other hand, the pathogen just changed this parameter on Swingle citrumelo on the third and fifth months after the inoculation. More over, HPLC analysis on two month-old plants indicated that sucrose and glucose concentration on Swingle citrumelo root system were affected by the pathogen. *P. nicotianae* also stimulated the ethylene production on Sunki tangerine six and seven days after the inoculation as well as decreased gas exchange and water consumption from the fourth to fifth days after the inoculation, respectively. It was concluded that *P. nicotianae* reduces the root system of Sunki tangerine, which decreases the gas exchange and water balance and increases ethylene synthesis. Moreover, initially *P. nicotianae* changes the carbohydrate metabolism in Swingle citrumelo root system, which is followed by severe reductions on sugar content on Sunki tangerine root. It was not found relevant changes on the secondary metabolism that could explain the mechanisms of resistance in Swingle citrumelo against *P. nicotianae*.

Keywords: Sunki tangerine; Swingle Citrumelo; Phytophthora gummosis

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de citros do mundo e seus pomares são compostos principalmente por quatro variedades de copa: laranjas Pêra, Natal, Valência e Hamlin; e uma variedade de porta-enxerto representado pelo limão Cravo.

A estreita base genética e extensão do parque citrícola são fatores que proporcionam várias epidemias desde os anos de 1930, quando o *Citrus tristeza virus* (CTV) eliminou 90% do parque citrícola paulista. Atualmente, milhares de plantas são erradicadas dos pomares brasileiros em virtude do *Huanglongbing* (HLB).

A gomose, causada por diferentes espécies de *Phytophthora*, é uma importante doença veiculada pelo solo. Essa interação apresenta plantas hospedeiras com diferentes níveis de resistência aos patógenos (FOURIE, 2004; MEDINA FILHO et al., 2003). *Phytophthora* spp. pode causar danos de até 30% na produção (GRAHAM; MENGE, 2000). Segundo Muniz, Queiroz e Menezes (2004), a gomose de Phytophthora é a principal doença em todos os municípios produtores de laranja do estado do Alagoas. É importante lembrar que, como *Phytophthora* spp. produzem estruturas de resistência, a eliminação desses patógenos dos solos é extremamente difícil. Assim, a exclusão é o principal método de controle de doenças provocadas por *Phytophthora* spp.

Patógenos provocam alterações fisiológicas e bioquímicas em seus hospedeiros, que prejudicam o desenvolvimento das plantas. A escoparona, fitoalexina produzida por diversas espécies de citros, é um importante componente da resistência de citros a *Phytophthora citrophthora*, mas não a *Phytophthora nicotianae* (FOURIE, 2004). Diversos trabalhos foram realizados a fim de compreender os mecanismos de resistência de citros a *P. nicotianae* (FOURIE, 2004; TEIXEIRA, 2005), no entanto os mesmos ainda não foram totalmente esclarecidos (FOURIE, 2004). Além disso, alterações no metabolismo primário e na fisiologia de plantas de citros, tanto nas interações de resistência quanto de suscetibilidade, provocadas por *P. nicotianae*, também não foram totalmente elucidadas.

Em vista disso, o objetivo do presente trabalho foi analisar e comparar alterações fisiológicas e bioquímicas em dois porta-enxertos de citros: tangerina Sunki, suscetível, e citrumelo Swingle, resistente a *P. nicotianae*.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 Citros

O Brasil é o maior produtor de laranja e de suco de laranja do mundo. Durante a safra 2007/08, a produção foi de 15,912 milhões de toneladas de laranja e 1,186 milhões de toneladas de suco de laranja. Porém, o estado de São Paulo, que é responsável por mais de 80% da produção brasileira, desde 2000 perdeu mais de 20% da área dos laranjais. Isso ocorreu em decorrência ao aumento de custo de produção, pela elevação do custo de fertilizantes e os altos custos de controle de doenças; além disso, a maior exigência do consumidor por frutas de qualidade tem diminuído o lucro dos citricultores (FNP, 2009).

O gênero *Citrus*, que pertence a família Rutaceae, tem o sudeste do continente asiático como centro de origem e os primeiros registros datam de 8000 a.C. Entre 300 e 400 a.C., Alexandre “o Grande” introduziu plantas de citros na Europa, e por volta de 1530, foram trazidas pelos portugueses ao Brasil. Atualmente, elas são cultivadas entre os paralelos 44° N e 41° S. Porém, as principais regiões produtoras concentram-se entre os paralelos 20° N e 20° S (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005; KIMBALL, 1999).

As plantas de pomares cítricos comerciais são constituídas por dois indivíduos unidos através de enxertia e que crescem e produzem como uma única planta, sendo que um dos indivíduos constitui a copa e o outro o porta-enxerto. Os principais grupos de copa são laranjas, tangerinas, limões, limas ácidas e pomelos, dos quais a laranja doce é o que apresenta maior expressividade na maioria dos países citrícolas. No Brasil, as variedades comerciais mais produzidas são Pêra, Natal, Valência e Hamlin (PIO et al., 2005).

As principais características dos frutos de laranja são pequeno número de sementes por fruto, massa, teor de suco, sólidos solúveis (°Brix), acidez titulável, *ratio* (°Brix/acidez titulável) e época de colheita, além da coloração da casca e do suco, aroma agradável, casca fina e lisa e concentração de vitamina C (PIO et al., 2005; STUCHI; SEMPIONATO; DA SILVA, 1996).

O porta-enxerto, por sua vez, induz alterações no crescimento e no tamanho da copa, precocidade de produção, maturação e massa dos frutos, coloração da casca e do suco, teor de açúcares, de ácidos solúveis totais, permanência dos frutos na planta e sua conservação após a

colheita, absorção e síntese de nutrientes, transpiração e composição química das folhas, tolerância à salinidade, à seca, ao frio, a doenças e pragas. Além disso, as influências da copa sobre o porta-enxerto são menos evidentes, mas ocorrem no desenvolvimento do sistema radicular, resistência ao frio, à seca e a doenças e pragas (POMPEU JUNIOR, 1991).

Antes de 1940, 90% dos pomares citrícolas do Brasil eram enxertados sobre laranja Azeda, pois a mesma apresenta boas características agronômicas e resistência a *Phytophthora* spp., porém, é suscetível ao *Citrus tristeza virus* (CTV). Os demais porta-enxertos utilizados eram lima da Pérsia, limões Cravo e Rugoso e laranja Caipira. Nessa época, a tristeza do citros dizimou os pomares paulistas e inviabilizou uso de laranjas Azeda e de lima da Pérsia como porta-enxerto, por serem intolerantes ao vírus. Devido a essa virose, a laranja Azeda foi substituída por porta-enxertos tolerantes ao CTV, como o limões Cravo e Rugoso, tangerinas Cleópatra e Sunki e laranja Caipira. O limão Cravo apresentou-se como preferido pelos citricultores. Em vista disso, a gomose de Phytophthora ganhou importância. O declínio e a morte súbita dos citros, que incide mais fortemente nas laranjeiras enxertadas sobre limão Cravo, apareceram nas décadas de 1970 e 1990, respectivamente, e promoveram o uso de porta-enxertos resistentes a essas enfermidades, como as tangerinas Sunki e Cleópatra, que são moderadamente suscetíveis a gomose e citrumelo Swingle, resistente a gomose. Mesmo assim, o limão Cravo continua sendo o principal porta-enxerto da citricultura paulista (BERGAMIN FILHO; KIMATI, 1995; POMPEU JUNIOR, 1991, 2005).

No Brasil, as características desejáveis para um porta-enxerto são tolerância a seca, declínio, morte súbita dos citros e tristeza; resistência a gomose de Phytophthora e nematóides; nanicantes e que formem com as copas plantas longevas e produtivas de frutos de alta qualidade (POMPEU JUNIOR, 2005).

A tangerina Sunki é originária de China e sua presença nos pomares brasileiros começou a ser registrada em 1985 (POMPEU JUNIOR, 2005). Ela é resistente ao declínio (BERETTA; POMPEU JUNIOR; DERRICK, 1992), tolerante a tristeza (BORDIGNON, 2003), xiloporose, frio (POMPEU JUNIOR, 2005), morte súbita dos citros (MACHADO et al., 2004), além de ser intolerante á exocorte (POMPEU JUNIOR, 2005) e suscetível a gomose de Phytophthora (MEDINA FILHO et al., 2004). Os frutos produzidos sobre esse porta-enxerto são menores e amadurecem mais tardiamente do que os obtidos sobre outros porta-enxertos. Quando plantada

em solos argilosos, induz a produção de frutos e sólidos solúveis semelhante ou superior às laranjeiras enxertadas sobre limão Cravo ou tangerina Cleópatra (POMPEU JUNIOR, 2005).

Por sua vez, o citrumelo Swingle, um híbrido entre pomelo Duncan e trifoliata, foi produzido na Flórida em 1907 por Walter S. Swingle e introduzido no Brasil em 1948 pelo IAC, porém o interesse por esse porta-enxerto começou em 1988 (POMPEU JUNIOR, 2005). Ele apresenta tolerância a xiloporose, exocorte (POMPEU JUNIOR, 2005), morte súbita dos citros (MACHADO et al., 2004) e tristeza (GARNSEY; BARRETT; HUTCHISON, 1987), além de ser resistente a gomose (MEDINA FILHO et al., 2004), declínio (BERETTA; POMPEU JUNIOR; DERRICK, 1992) e nematóide dos citros (*Tylenchulus semipenetrans*) (O'BANNON; FORD, 1978). Laranjeiras enxertadas sobre citrumelo Swingle produzem frutos de alta qualidade, com alto teor de sólidos solúveis, de tamanho médio, porém é incompatível com as copas de tangor Murcott, limões Siciliano e Eureka e laranja Pêra. Além disso, induz a maturação de frutos mais tardiamente do que outros porta-enxertos (POMPEU JUNIOR, 2005; STUCHI, SEMPIONATO, DA SILVA, 1996).

2.1.2 Doenças causadas por *Phytophthora* spp. em citros

As podridões de raízes, causada por P*hytophthora* spp., são muito importantes na cultura dos citros (GRAHAM; MENGE, 2000; FEICHTENBERGER, 2001). Estima-se que esses patógenos podem causar danos de 10 a 30% na produção (GRAHAM; MENGE, 2000). No entanto, com a utilização de mudas certificadas, *Phytophthora* spp. perderam a importância no estado de São Paulo (LARANJEIRA et al., 2005). Entre 2000 e 2003, foi observado uma redução de 50% no número de viveiros contaminados por *Phytophthora* spp., mesmo assim, *Phytophthora* spp. foi constatada em 25,5% dos viveiros paulistas em 2003 (FUNDECITRUS, 2004). É importante lembrar que mudas contaminadas com *Phytophthora* spp. não podem ser comercializadas no estado de São Paulo (LARANJEIRA et al., 2005). Porém, segundo Muniz; Queiroz e Menezes (2004), no estado do Alagoas, não existe legislação para a produção de mudas de citros, com isso, os viveiristas produzem mudas em campo aberto e, as vezes, na mesma área do plantio comercial, o que facilita a contaminação das mudas por pragas. Nesse estado, segundo os mesmos autores, gomose de Phytophthora é a principal doença.

Atualmente, as espécies de *Phytophthora* estão classificadas no Reino Stramenopila, sendo que mundialmente existe o relato de 13 espécies de *Phytophthora* como patógenos de citros: *P. arecae*, *P. boehmeriae*, *P. cactorum*, *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. citricola*, *P. citrophthora*, *P. drechsleri*, *P. hibernalis*, *P. megasperma*, *P. nicotianae* (sin. *P. parasitica*), *P. palmivora* e *P. syringae*. No Brasil, as espécies mais importantes são *P. nicotianae* e *P. citrophthora*, das quais a primeira é predominante nas principais áreas produtoras. Além disso, já foi encontrada *P. palmivora* em plantas de viveiros e em cultivos comerciais brasileiros (ERWIN; RIBEIRO, 1996; FEICHTENBERGER et al., 2005).

Espécies de *Phytophthora* produzem estruturas de resistência, como clamidósporos, oósporos e zoósporos encistados. Em condições de alta umidade e aeração, essas estruturas podem germinar e produzir esporângios ou microesporângios, respectivamente. Os microesporângios podem germinar diretamente ou produzir zoósporos, enquanto que os esporângios são sempre formados sobre o solo ou superfície dos órgãos atacados (LARANJEIRA et al., 2005). Outras características desses patógenos são parede celular composta por β-glucana e celulose, não sintetizam esteróis, apresentam fase vegetativa diplóide, possuem micélio cenocítico e hialino, a reprodução assexual consiste na produção de zoósporos biflagelados, enquanto que a união da estrutura sexual feminina (oogônio) com a masculina (anterídio) origina o esporo sexual (oósporo) (ERWIN; RIBEIRO, 1996).

A temperatura ótima de crescimento de *P. nicotianae* é de 27 a 32 °C. Os esporângios são apicais, papilados globosos e medem 27 a 60 x 18 a 40 µm. Os clamidósporos medem entre 22 e 30 µm e são formados sob condições desfavoráveis ao crescimento micelial, ou seja, baixa disponibilidade de oxigênio, nutrientes, níveis de CO_2 altos, temperaturas entre 15 e 18 °C e desenvolvimento de raízes reduzido ou nulo. *P. nicotianae* é heterotálica, ou seja, necessita de tipos de compatibilidade sexual distintos (A^1 e A^2) em um mesmo local. Os oogônios e os oósporos medem 28,9 ± 2 µm e entre 22,9 e 32,2 µm, respectivamente e os anterídios são anfígenos (ERWIN; RIBEIRO, 1996; FEICHTENBERGER et al.; 2005).

A gomose é o principal sintoma que ocorre no campo, e é caracterizada pelo escurecimento e morte de tecidos internos da casca e do lenho na região das lesões, formação de calo nas bordas das lesões, exsudação de goma em lesões no tronco e no colo, seca e fendilhamento da casca, podridão do colo e radicelas. Como sintomas reflexos observa-se o

amarelecimento uniforme e progressivo de folhas, redução do desenvolvimento de folhas novas, murcha e queda de folhas, frutificações freqüentes e espontâneas, produção de frutos pequenos, morte progressiva dos ponteiros, seca de ramos e morte da planta (FEICHTENBERGER et al., 2005; LARANJEIRA et al., 2005; GRAHAM; MENGE, 2000).

Outro sintoma é a podridão parda de frutos, de maior importância quando a colheita é realizada em épocas de chuvas e em frutos localizados na parte inferior das copas das plantas, causada a partir de propágulos localizados na superfície de solos que são levados por respingos até a superfície de frutos. A doença pode ocorrer em todas as regiões citrícolas do mundo e em todas as variedades de frutos, porém os limões são mais afetados. As podridões são secas de cor marrom-parda e os frutos afetados cheiram forte a ranço. Em condições de alta umidade, o micélio se forma sobre a casca do fruto infectado. Caso o fruto seja infectado pouco antes da sua colheita, os sintomas se expressam na pós-colheita (FEICHTENBERGER et al.; 2005; LARANJEIRA et al., 2005).

Esses patógenos também podem atacar sementes tanto antes quanto após a germinação das mesmas, comprometendo o estande das sementeiras. Eles também infectam tecidos jovens localizados na base do caulículo, onde aparecem lesões deprimidas e escuras, que podem levar as plântulas à morte em condições de umidade e temperatura elevadas. Finalmente, os sintomas em folhas e brotos novos são caracterizados por lesões escuras e encharcadas (FEICHTENBERGER et al., 2005; LARANJEIRA et al., 2005).

Segundo o FUNDECITRUS (2004), as principais medidas de controle são a exclusão do patógeno, uso de porta-enxerto resistente e evitar o plantio em áreas de alta umidade e/ou sujeita a encharcamento.

As principais variedades de citros estão agrupadas em cinco grupos em função da suscetibilidade às infecções de troncos por *P. nicotianae*: suscetibilidade muito alta - limões verdadeiro; alta - laranjas doce, limas ácidas, limões rugosos e pomelos; moderada - tangerinas Sunki e Cleópatra, limão Cravo, tangelo Orlando, limão Volkameriano, citranges Troyer e Carrizo; baixa - *Citrus macrophylla* e laranja Azeda; muito baixa - citrumelo Swingle e trifoliata (FEICHTENBERGER et al., 2005).

Outras medidas importante de controle são altura de enxertia a pelo menos 15 cm do solo, evitar ferimentos de tronco e raízes principais, utilizar água de irrigação livre de *Phytophthora*

spp., utilizar adubos orgânicos para favorecer a microbiota antagônica a *Phytophthora* spp. e controle químico curativo com fosetil-Al ou preventivo com fosetil-Al, ou fosfitos (FEICHTENBERGER et al., 2005).

Em vista da importância da gomose de Phytophthora, vários trabalhos analisam a resistência de porta-enxertos de citros ao patógeno. É importante lembrar que muitos fatores interferem na interação citros - *Phytophthora* spp., como a espécie e o isolado do patógeno (ALVAREZ et al., 2009; MUNIZ; QUEIROZ; MENEZES, 2004), características do solo e do clima (ALVAREZ et al., 2009; BRIGHT et al., 2004), método de inoculação empregado (SIVIERO, 2001), aspectos nutricionais da planta (ORBOVIĆ et al., 2008), ausência ou presença de outros patógenos na planta (DANDURAND; MENGE,1993; SHAKED; ASHKENASI; OREN, 1984), salinidade e pH do solo (BLAKER; McDONALD, 1986; TSAO; MARTIN, 1963), estado vegetativo da planta (ALVAREZ et al., 2009).

Plantas de *P. trifoliata* apresentaram menor tamanho de lesão de tronco do que plantas de citranges Benton e Troyer, laranja doce Parramatta, tangerina Cleópatra e limão Rugoso quatro semanas após a inoculação de *P. citrophthora* (BROADBENT; GOLLNOW, 1993). Zitko, Timmer e Sandler (1991) verificaram que plantas de citrumelo Swingle apresentaram menor podridão de raízes, redução da massa seca do sistema radicular e do colo do que plantas de laranjas Doce e Azeda dois meses após a inoculação de *P. nicotianae*. Em outro experimento, foi verificado que plantas de trifoliata Davis A e laranja Azeda desenvolveram lesões menores no tronco do que limão Cravo e tangerina Sunki, 22 dias após a inoculação de *P. nicotianae* (MEDINA FILHO et al., 2003).

Avaliando a taxa de sobrevivência, redução de raízes e parte aérea, massa de raízes e de parte aérea, diâmetro e do caule e altura das plantas, comparando-se plântulas com o sistema radicular inoculado e não inoculado com *P. nicotianae*, Medina Filho et al. (2004) mostraram que os clones de trifoliatas Davis A e Rich 16-6 e o citrumelo Swingle são altamente resistentes; a laranja Azeda, tangerina Suen Kat, limões Cravo e Volkameriano são resistentes; e as tangerinas Sunki e Cleópatra mostraram-se suscetíveis ao patógeno. Siviero (2001) estudou e comparou diferentes métodos de inoculação de *P. nicotianae* em plantas de citros. Esse pesquisador demostrou que as lesões provocadas por esse patógeno em citrumelo Swingle, independente do método de inoculação, foram pelo menos 30% menores do que em tangerina Sunki.

2.1.3 Mecanismos de resistência das plantas

As plantas são constantemente atacadas por inimigos em potenciais, porém, apresentam diferentes meios para se defenderem dos mesmos. Para isso, elas possuem barreiras estruturais, como ceras, cutícula, tricomas, bem como substâncias químicas envolvidas no processo de defesa. Essas substâncias, tais como flavonóides, glicosídeos cianogênicos, e inibidores protéicos são encontradas em altas concentrações antes da chegada do patógeno. Esses mecanismos de resistência são conhecidos como pré-formados, passivos ou constitutivos (AGRIOS, 2005; SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008). Plantas de batata (*Solanum berthaultii*) que apresentam tricomas glandular do tipo B, ou seja, multicelular com material globular viscoso em sua extremidade, eram resistentes a *Phytophthora infestans*. Essa resistência estava ligada a exsudação de um éster de sacarose pelos tricomas (GIBSON, 1976; HOLLEY; KING; SINGH, 1987). Segundo Biles et al. (1993), a espessura de cutícula de frutos de pimentão é responsável pela resistência dos mesmos a *Phytophthora capsici*. Os flavonóides presentes em óleos de frutos de laranjas azeda e doce e de tangerina Clementina inibiram o crescimento de *Penicillium digitatum*, *Geotrichum* sp. e *P. citrophthora* (DEL RÍO et al., 1998). A resistência de colza a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Leptosphaeria maculans* (anamorfo *Phoma lingam*) *Botrytis cinerea*, *P. digitatum*, *Cladosporium* sp. e *Phytophthora brassicae* estava associada com sua capacidade de produzir glicosinolatos (DUBUIS et al., 2005). Por outro lado, as plantas também apresentam mecanismos de resistência pós-formados, ativos ou induzíveis, isto é, são ativados ou aumentam o nível de compostos pré-existentes após a infecção pelo patógeno. Esses mecanismos estão envolvidos na formação de barreiras estruturais, tais como halo, papila, camada de cortiça, lignificação, glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, bem como na síntese de compostos que funcionam como barreiras bioquímicas, como espécies reativas de oxigênio, proteínas relacionadas à patogênese e fitoalexinas (AGRIOS, 2005; SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008).

Diversos trabalhos mostram que diferentes espécies de *Phytophthora* podem induzir a resposta de defesas das plantas. Mithöfer et al. (2002) verificaram a formação de calose em radículas de plantas de soja inoculadas com *Phytophthora sojae*. Estudando duas cultivares de soja com diferentes níveis de resistência a *P. sojae*, Ranathunge et al. (2008) mostraram que as

raízes da cultivar Conrad (resistente) acumulavam suberina mais rapidamente do que o híbrido OX760-6 (suscetível). Por sua vez, Furuse et al. (1999) evidenciaram que a agregação citoplasmática em protoplastos de tubérculos de batata resistentes à *P. infestans* ocorria 10 min após o tratamento dos mesmos com eliciador extraído da parede celular do patógeno. Espécies de *Phytophthora* também podem induzir a produção de compostos de defesa. Após a inoculação de *P. sojae*, a cultivar de soja Nannong 493 - 1, que apresenta resistência intermediária, acumulou mais rapidamente H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) do que a cultivar Hefeng, que é suscetível (CHEN et al., 2008). Alexander et al. (1993) mostraram que plantas de fumo que superexpressavam uma isoenzima da classe 1 das proteínas relacionadas à patogênese (PR-1) eram mais resistentes a *P. nicotianae* var. *nicotianae* e a *Peronospora tabacina*. Ademais, três isoenzimas de PR-1, isoladas de folhas de tomate, reduziram *in vivo* e *in vitro* a germinação de zoósporos de *P. infestans* (NIDERMAN et al., 1995).

2.1.4 Espécies reativas de oxigênio e sinalização

O reconhecimento do patógeno por parte da planta é necessário para que ela ative suas respostas estruturais e bioquímicas de defesa. Esse reconhecimento é dado por meio de um eliciador, que, segundo Terry e Joyce (2004), é uma molécula ou um agente físico capaz de estimular a resposta de defesa das plantas. Diversos eliciadores foram caracterizados a partir de diferentes espécies de *Phytophthora*, como β-glucanas (KEEN; YOSHIKAWA; WANG, 1983), glicoproteínas (GAULIN et al., 2002), elicitina (KELLER et al., 1999) e outras proteínas liberadas em meio de cultivo (MISHRA; SHARMA; MISRA, 2009) ou associadas a parede celular (MEIJER et al., 2006).

Os eliciadores são reconhecidos por receptores do hospedeiro. Após o reconhecimento, que no caso de *Phytophthora* spp. pode ocorrer tanto no apoplasto quanto no citosol de células do hospedeiro (SCHORNACK et al., 2009), uma cascata de sinais é acionada, seguida da ativação dos mecanismos de defesa das plantas. Um dos primeiros eventos na interação planta - patógeno é a explosão oxidativa, que se constitui na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (•OH) (YOSHIOKA;

BOUTEAU; KAWANO, 2008). Um dos resultados da explosão oxidativa é a reação de hipersensibilidade (RH), um mecanismo de defesa imediato da célula infectada (KOMBRINK; SCHMELZER, 2001), que é sucedido pela ativação da resistência sistêmica adquirida (RSA). A fonte de EROs, durante a RH, é composta pelo complexo NADPH oxidase, que está localizado na membrana plasmática, e pela modulação da atividade de enzimas antioxidantes (VRANOVÁ; INZÉ; BREUSEGEM, 2002). As alterações observadas nas células vegetais em virtude da RH incluem o aumento rápido e transitório de agentes oxidantes, influxo de íons de cálcio (Ca_2^+), envolvendo canais de cálcio, localizados na membrana plasmática, e de potássio (K^+) e efluxo de íons de hidrogênio (H^+) e de cloro (Cl^-) (que promove a alcalinização do apoplasto e acidificação do citoplasma), eventos de fosforilação e desfosforilação envolvendo MAP kinases, peroxidação de lipídeos, produção de oxido nítrico e de EROs, destruição de compartimentos, espessamento da parede celular, além da biossíntese de compostos de defesa (Figura 1) (ALI et al., 2007; FRITIG; HEITZ; LEGRAND, 1998; LATTANZIO; LATTANZIO; CARDINALI, 2006).

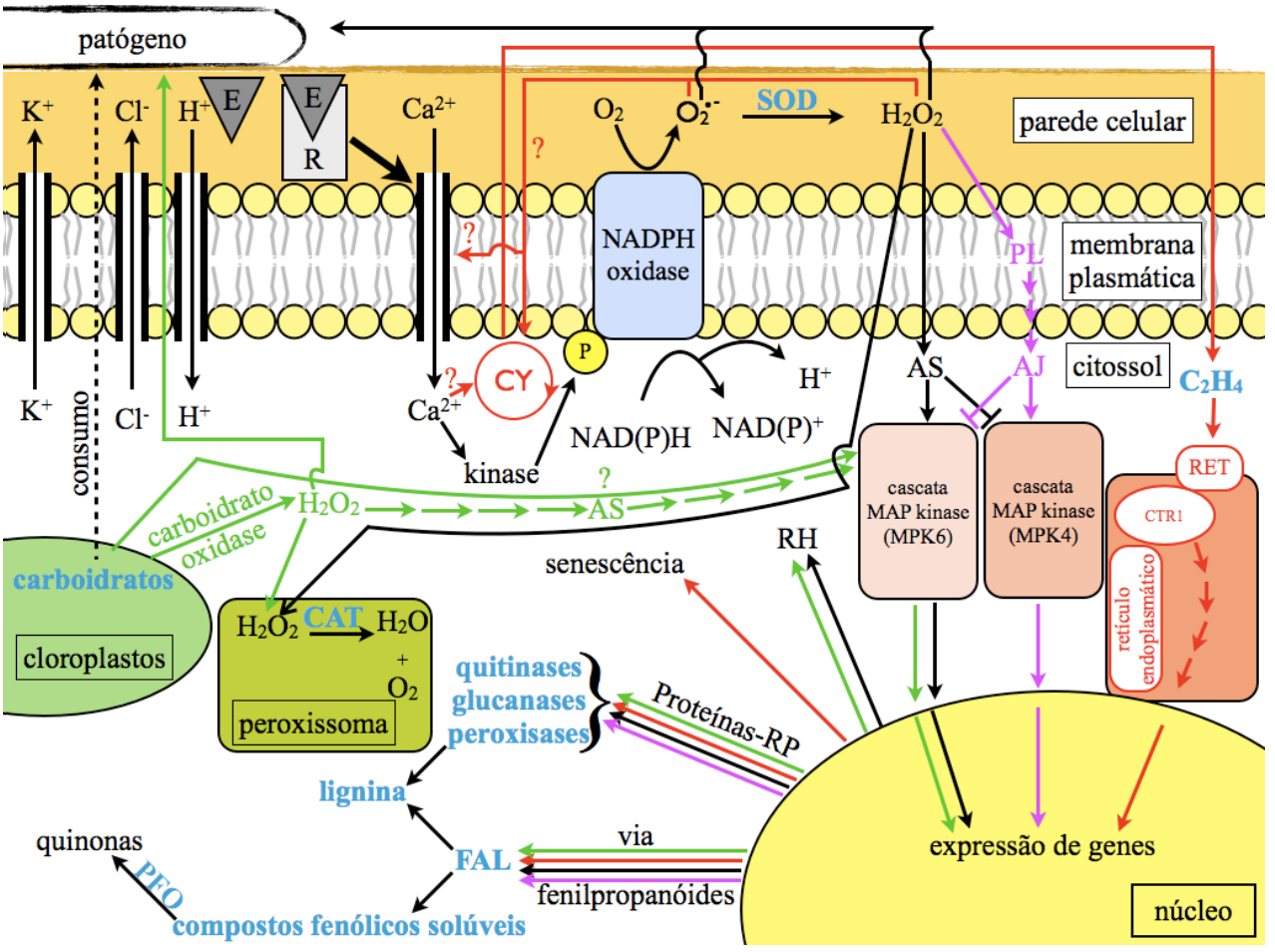

Figura 1 - Alterações metabólicas em plantas provocadas por patógenos. Legenda: E = eliciador; R = receptor; CY = ciclo de Yang; SOD = superóxido dismutase; RET = receptor do etileno; PL = peroxidação de lipídeos; CTR 1 = proteína quinase ligada ao RET; AS = ácido salicílico; AJ = ácido jasmônico; RH = reação de hipersensibilidade; CAT = catalase; FAL = fenilalanina amônia-liase; PFO = polifenoloxidase

As EROs provocam danos celulares em virtude de causarem oxidação de proteínas, quebras na cadeia de DNA, distúrbios na homeostase intracelular de íons cálcio e peroxidação de lipídeos que compõem a membrana plasmática (AGUIRRE et al., 2005). Porém, também atuam de várias maneiras durante a resposta de defesa das plantas, pois podem agir diretamente sobre patógenos, fortalecer a parede celular de plantas, efetuar a peroxidação de lipídeos presentes na membrana plasmática e na regulação da expressão gênica (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008), além de estarem envolvidas direta ou indiretamente com as vias do ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno (Figura 1) (BOSTOCK, 2005). É importante lembrar que durante o metabolismo celular normal, existe a produção de EROs (TAIZ; ZEIGER,

2006).

Em vista disso, para minimizar o efeito do estresse oxidativo, as plantas possuem sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Os mecanismos antioxidativos não enzimáticos são compostos por glutationa, ascorbato, tocoferol, flavonóides, alcalóides e carotenóides. Já os mecanismos antioxidativos enzimáticos incluem glutationa redutases, glutationa-S-transferase, peroxidases, além de superóxido dismutases e catalases, que são enzimas chaves na detoxificação do $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 (Figura 1) (APEL; HIRT, 2004; SCANDALIOS, 2005).

As superóxido dismutases (E.C 1.15.1.1, SOD) são metaloproteínas que convertem $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e O_2. De acordo com o cofator metálico, as SOD são divididas em quatro tipos: Cu/Zn - SOD (localizadas no citosol ou cloroplastos), Mn - SOD (encontradas nas mitocôndrias), Fe - SOD (encontradas em cloroplastos e em procariotos) e Ni - SOD (presentes em *Streptomyces* ssp.) (SCANDALIOS, 2005). A atividade dessa enzima pode ser alterada devido a estresses abióticos, como seca (WANG et al., 2005), SO_2, salinidade (TSENG; LIU; YUI, 2007), herbicida e metais pesados (LEE et al., 2007), O_3 (SANT'ANNA et al., 2008) ou estresses bióticos.

Plantas de beterraba açucareira transgênicas, que expressavam um gene envolvido na síntese de Cu/Zn - SOD de tomate, foram mais resistentes a *Cercospora beticola* do que plantas da linhagem selvagem (TERTIVANIDIS et al., 2004). Análises moleculares mostraram que o gene da Mn - SOD de algodoeiro foi expresso duas horas após a inoculação da raça 18 (avirulenta) de *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. Por outro lado, a inoculação da raça 20 do patógeno (virulenta) estimulou a expressão do gene da Mn -SOD de algodoeiro mais tardiamente e em menor intensidade do que na interação incompatível (VOLOUDAKIS et al., 2006). Estudando duas cultivares de milheto, Babitha et al. (2006) verificaram que *Sclerospora graminicola* induziu a atividade de Mn - SOD apenas em folhas do genótipo resistente (IP 18293). Plantas de girassol inoculadas com a raça 100 de *Plasmopara halstedii* (incompatível) acumularam mRNA envolvido na síntese de SOD três horas após a inoculação. Por outro lado, esse gene só foi expresso em plantas de girassol inoculadas com a raça compatível (710), 48 h após a inoculação (HERBETTE et al., 2003).

As catalases (E.C 1.11.1.6, CAT) são metaloproteína constituídas por quatro grupos heme que convertem H_2O_2 em H_2O e O_2, sendo encontradas em organismos aeróbicos (SCANDALIOS, 2005). Nas plantas estão presentes nos peroxissomos e glioxissomas (RESENDE; SALGADO;

CHAVES, 2003). Essas enzimas estão divididas em três classes: classe 1 - encontradas em tecidos fotossintéticos. São responsáveis por remover o H_2O_2 produzido durante a fotorespiração; classe 2 - encontradas nos tecidos vasculares; classe 3 - encontradas em sementes e plantas jovens e são responsáveis pela remoção do H_2O_2 produzido durante a catálise de ácidos graxos no glioxisomas (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003). A CAT, além de estar relacionada com a expressão de genes em plantas (VANDENABEELE et al., 2004), também aumenta a resistência das mesmas a estresses abióticos, como metais pesados (GUAN et al., 2009), estresse hídrico (LUNA et al., 2004), frio (DU et al., 2008) e estresse salino (SAWADA et al., 2007).

Em diferentes interações planta-patógeno, a atividade dessa enzima também é alterada. Plantas de tomate inoculadas com *B. cinerea* apresentaram maior atividade de CAT um e dois dias após a inoculação em relação às plantas não inoculadas (KUŻNIAK, SKŁODOWSKA, 2005). Messias (2008) verificou que plantas de soja, cultivares BRS132 e IAC17, inoculadas com *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV) mostraram aumento na atividade dessa enzima nove e 14 dias após a inoculação do vírus, respectivamente. Plantas transgênicas de canola, que receberam o gene que expressa uma CAT de *Escherichia coli*, foram mais resistentes a infecção por *Peronospora parasitica* e *Erysiphe polygoni* do que plantas da linhagem selvagem (EL-AWADY et al., 2008).

2.1.5 Rotas metabólicas

Diferentes rotas metabólicas envolvidas na síntese de compostos de defesa podem ser ativadas, como aquelas dependentes do ácido salicílico (AS), do ácido jasmônico (AJ) ou do etileno (BOSTOCK, 2005). De modo geral, as plantas respondem mais aos patógenos biotróficos com a ativação da rota do AS, porém ativam a rota do etileno ou do AJ quando atacadas por patógenos necrotróficos ou herbívoros (KOORNNNEEF; PIETERSE, 2008). Essas rotas ativam diferentes proteínas kinases, além de poderem ter ação antagônicas (Figura 1) (TENA et al., 2001).

O AS é um hormônio vegetal envolvido na germinação de sementes, crescimento, florescimento, respiração (KLESSING; MALAMY, 1994), fotossíntese, condutância estomática, e transpiração de plantas (KHAN; PRITHIVIRAJ; SMITH, 2003; KUHN, 2007), bem como na

ativação da RSA e desencadeamento da RH, produção de fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (PR-1, β-1,3-glucanase, quitinases, peroxidases, ribonucleases e defensinas) (KUHN, 2007; SMITH; DE MORAES; MESCHER, 2009).

O AS é formado pela via do ácido shiquímico, sendo que a partir do ácido t*rans*-cinâmico, dois caminhos são possíveis. Um envolve a descarboxilação do ácido *trans*-cinâmico em ácido benzóico, seguida por duas hidroxilações até a síntese do AS. Alternativamente, o ácido *trans*-cinâmico pode ser metabolizado na via dos fenilpropanóides (LEE; LEÓN; RASKIN, 1995).

Halim et al. (2007) verificaram que plantas de batata transgênicas que expressam o gene *nah*G, responsável pela síntese da salicilato hidroxilase (enzima que converte o AS em catecol), eram mais suscetíveis a *P. infestans* do que a linhagem selvagem. Além disso, a aplicação de ácido 2,6 dicloroisonicotínico (INA, um análogo do AS) restabeleceu a resistência das plantas transgênicas de batata ao patógeno. Por sua vez, plantas de pimentão tratadas com acibenzolar-S-metil (outro análogo do AS) apresentaram redução de 45% dos sintomas provocados por *P. capsici* (BAYSAL; TURGUT; MAO, 2005).

O AJ e seus derivados estão distribuídos amplamente nos tecidos vegetais (BOSTOCK, 1999) e estão envolvidos em vários eventos fisiológicos, tais como desenvolvimento de frutos e flores, maturação de pólen, crescimento e senescência de raízes e fotossíntese (SMITH; DE MORAES; MESCHER, 2009); além de induzir os eventos tipicamente associados a RSA, como a síntese de proteínas-RP (β-1,3-glucanase, osmotina e defensinas) (JAYARAJ et al., 2004; PENNINCKX, et al.,1996), proteínas ricas em prolina (CREELMAN; TIERNEY; MULLET, 1992), fenilalanina amônia-liase (GUNDLACH et al., 1992) e fitoalexinas (PRINSLOO; MEYER, 2006).

Os jasmonatos são sintetizados pela via do octadecanóide. Certos estímulos ativam as fosfolipases que liberam o ácido linolênico da membrana plasmática, o qual é oxigenado pelas lipoxigenases (LOX) e dão origem ao 13 (S)-hidroperóxido de ácido linoléico (13-HPOT). Uma aleno óxido sintase (AOS) e uma aleno óxido ciclase (AOC) convertem o 13-HPOT em ácido 12-oxo-fitodienoico (AOFD), sendo que o AJ é formado pela redução do AOFD seguido por três passos da β-oxidação (CHEONG; CHOI, 2007).

A aplicação de 1.000 μg mL^{-1} de AJ ou de seu éster, metil jasmonato, em plantas de batata e tomate proporcionou a redução dos sintomas locais e sistêmico de requeima, causada por *P.*

infestans (COHEN; GISI; NIEDERMAN, 1993). Plântulas de fumo, cultivar 46-8, são resistentes a raça 0 de *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, mas são suscetíveis a raça 1 do patógeno. Estudos mostraram que raízes de plântulas inoculadas com o zoósporos da raça 0 do fitopatógeno estimularam a expressão do gene e a atividade da lipoxigenase mais rapidamente do que raízes de plântulas inoculadas com a raça 1 (VÉRONÉSI et al., 1996). Ueeda, Kubota e Nishia (2006) verificaram que plantas da cultivar SCM334 de pimentão, resistentes a *P. capsici*, apresentaram acúmulo de AJ nas folhas 1 h após a inoculação do patógeno e, esse acúmulo foi crucial para o desencadeamento da RH.

O etileno, por sua vez, é um hormônio vegetal gasoso envolvido na germinação de sementes, diferenciação de tecidos, formação de primórdios radiculares, elongação de raízes, iniciação do florescimento, síntese de antocianinas, abertura de flores, senescência, maturação de frutos, produção de compostos voláteis (GRICHKO; GLICK, 2001), nodulação (NUKUI et al., 2000), além de ser requerido para a expressão de proteínas-RP (quitinase e β-1,3-glucanase) (YANG et al., 2005), fenilalanina amônia-liase (RIOV; MONSELISE; KAHAN, 1969) e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (MENOSSI; MARTÍNEZ-IZQUIERDO; PUIGDOMÈNECH, 1997).

O etileno é produzido no ciclo de Yang, cujo primeiro passo é catalisado por S-adenosil-L-metionina sintetase, no qual adenosil liga-se com L-metionina, o que resulta em S-adenosil-L-metionina (SAM). No passo seguinte, SAM é convertido em ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) e 5-metiladenosina, reação catalisada pela ACC sintetase. Finalmente, o ACC é oxidado em etileno pela ACC oxidase (GRICHKO; GLICK, 2001). Esse ciclo pode ser ativado por diferentes fatores, como aumento na concentração de cálcio e de EROs no citosol (WANG; LI; ECKER, 2002). Assim, o etileno sintetizado se liga a receptores transmembrana (ETR1, ETR2, ERS1, ERS2, EIN4), localizados na membrana do retículo endoplasmático, o que leva a transdução de sinais com o auxilio de proteínas kinases (CTR1). Em seguida, genes relacionados à defesa e/ou senescência são expressos (Figura 1) (XU et al., 2007; WANG; LI; ECKER, 2002).

O desequilíbrio na produção desse hormônio pode levar a várias alterações, como crescimento exagerado das raízes, abscisão foliar, clorose, epinastia e aumento na permeabilidade da membrana (STANGARLIN; LEITE, 2008). Fatores abióticos, como temperaturas extremas

(HERSHKOVITZ et al., 2009), seca (BELTRANO; RONCO; MONTALDI, 1999), ferimentos (GODOY, 2008) e metal pesado (ARTECA; ARTECA, 2007); e bióticos, como ataque de patógenos, podem alterar a síntese de etileno em plantas.

Alguns autores mostraram a importância do etileno na resposta de defesa de plantas a ataques de patógenos. De acordo com Knoester et al. (1998), plantas de fumo (cultivar Samsun NN) transgênicas, insensíveis ao etileno, são mais suscetíveis a um isolado pouco virulento de *Pythium sylvaticum* do que a linhagem selvagem. Aplicação de etileno (50 μL L^{-1}) ou de ACC (3 mM), dois dias após a inoculação, reduz os sintomas do *Tobacco mosaic virus* (TMV) em folhas de plantas de fumo (Samsun NN) em 39% e 38%, respectivamente. Porém, as folhas tratadas amarelecem mais rapidamente do que as folhas controle, indicando que o etileno acelera o processo de senescência (KNOESTER et al., 2001). Além disso, plantas de fumo transgênicas (cultivar Samsun NN) insensíveis ao etileno são mais suscetíveis a *B. cinerea*, *Cercospora nicotianae* e *Erwinia carotovora* do que a linhagem selvagem (GERAATS et al., 2003).

Todavia, segundo Geraats et al. (2002), pelo fato do etileno promover senescência, clorose e necrose, ele poderia aumentar a severidade da doença por acelerar os sintomas durante o ataque do patógeno. Nesse sentido, Barmore e Brown (1985) mostraram que frutos de laranja Valência expostos a 50 μL L^{-1} do hormônio são mais suscetíveis a *Diplodia natalensis* do que frutos expostos a 1 μL L^{-1}. Esses autores também detectaram menor concentração de lignina nos frutos expostos a maior concentração do hormônio. Além disso, existe relação positiva entre a produção de etileno em frutos de tangerina Fortune e a suscetibilidade dos mesmos a *Alternaria alternata* pv. *citri* (ORTUÑO et al., 2008). Geraats et al. (2003) mostraram que plantas de fumo transgênicas (cultivar Samsun NN) insensíveis ao etileno, são mais resistentes a *P. tabacina* do que as plantas da linhagem selvagem.

2.1.6 Fenóis

Os fenóis são produzidos ao acaso ou em locais estratégicos por células distribuídas pelos tecidos de plantas. Esses compostos, que perfazem mais de 10.000 estruturas diferentes, apresentam um anel benzeno ligado à uma (fenol) ou mais (polifenóis) hidroxilas (TAIZ; ZEIGER, 2006; LATTANZIO; LATTANZIO; CARDINALI, 2006). De acordo com a cadeia do

esqueleto carbônico, as principais classes desse grupo químico incluem: C_6 (fenóis simples), C_6-C_1 (ácidos fenólicos), C_6-C_2 (ácidos fenilacéticos), C_6-C_3 (coumarinas, fenilpropanos), C_6-C_4 (naftoquinonas), C_6-C_1-C_6 (xantonas), C_6-C_2-C_6 (estilbenos), C_6-C_3-C_6 (flavonóides, isoflovanóides), $(C_6$-$C_3)_2$ (lignanas, neolignanas), $(C_6$-C_3-$C_6)_2$ (biflavonóides), $(C_6$-$C_3)_n$ (ligninas), $(C_6)_n$ (catecol, melaninas) e $(C_6$-C_3-$C_6)_n$ (taninos) (LATTANZIO; LATTANZIO; CARDINALI, 2006). Eles são sintetizados por diferentes rotas metabólicas, porém a via do ácido shiquímico é responsável pela síntese da maioria dos compostos fenólicos em plantas (TAIZ; ZEIGER, 2006). Em sete passos metabólicos, essa rota converte o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato em corismato, o precursor de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) (HERRMANN; WEAVER, 1999). As enzimas envolvidas na síntese de fenóis estão associadas ao retículo endoplasmático, o que permite, logo após a produção desses compostos, que eles sejam armazenados em vesículas na sua forma original ou glicosilada. A compartimentalização é fundamental para o funcionamento das células, pois os fenóis são tóxicos e devem ser mantidos em sua forma reduzida e a descompartimentalização dos mesmos pode levar a sua rápida oxidação, pela ação das polifenoloxidases, em resposta a uma infecção. Os fenóis, que se mantêm livres no citoplasma, podem ter ação tóxica tanto sobre o patógeno, quanto sobre a célula vegetal, o que contribui para a RH (ISAAC, 1992).

Compostos fenólicos apresentam ação sobre fungos e bactérias, pela inibição da germinação de esporos, do crescimento micelial e afetar a produção e/ou atividade de enzimas microbianas (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008). Esses compostos podem ser pré-formados, ou seja, presentes antes da chegada dos patógenos (LO; NICHOLSON, 2008). Valle (1957) verificou que as concentrações dos ácidos caféico e clorogênico, presentes em folhas sadias de batateira, cultivar Aquila, resistente a *P. infestans*, eram capazes de inibir o crescimento micelial e a germinação de zoósporos do patógeno *in vitro*. Os ácidos caféico, ferúlico, *p*-cumárico, cinâmico e hidroxibenzóico inibiram a germinação de zoósporos de *Phytophthora megakarya* e *P. palmivora*. O ácido caféico também inibiu o crescimento micelial desses patógenos *in vitro*, bem como reduziu os sintomas provocados por *P. megakarya* em folhas de cacaueiro e em pêra (WIDMER; LAURENT, 2006).

Além disso, outros compostos fenólicos são formados em resposta a tentativa de ingresso de patógenos no interior da planta, ou seja, são pós-formados (LO; NICHOLSON, 2008). Os

compostos pós-formados apresentam dois modos de ação, a primeira é o rápido acúmulo dos mesmos no local de infecção, para reduzir o crescimento do patógeno nos tecidos do hospedeiro e a segunda envolve a ativação do metabolismo *de novo* e a síntese de compostos relacionados ao estresse, como as fitoalexinas (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992). *Phytophthora colocasiae* induziu o aumento em mais de 50% na concentração de compostos fenólicos em folhas de cultivares resistente (DP-25, Duradim e Jhankri) de inhame e de apenas 11,5% na cultivar suscetível (N-118) (SAHOO et al., 2008). Já Báidez et al. (2006) mostraram que *Phytophthora megasperma* alterou a composição de compostos fenólicos em oliveiras. Ademais, vários compostos sintetizados após o processo de infecção inibiram o crescimento *in vitro* do patógeno.

Por sua vez, as fitoalexinas, sintetizadas pelo metabolismo secundário de plantas, apresentam baixa massa molecular e são produzidas em resposta a estresses físicos, químicos ou biológicos (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008). Ademais, dentre as diferentes respostas de defesa, a síntese dessa classe de compostos normalmente é o último evento (HARTLEB; HEITEFUSS; HOPPE, 1997). As fitoalexinas são biocidas, cuja ação sobre fungos inclui a granulação citoplasmática, desorganização dos conteúdos celulares, ruptura da plasmalema e inibição das enzimas fúngicas, o que reflete na inibição da germinação, crescimento do tubo germinativo, e do micélio (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008). Por exemplo, estudando interações entre cultivares de soja incompatíveis (Haro 1272 e Kingwa) e compatíveis (Harosoy) a raça 1 de *P. sojae*, Mohrm e Cahill (2001) verificaram que a gliceolina era o principal fator de restrição do patógeno nas interações incompatíveis.

Outro composto fenólico muito importante é a lignina, um heteropolímero formado principalmente por três tipos de álcoois hidroxicinâmicos, que se diferenciam pelo grau de metoxilação e são sintetizados na via dos fenilpropanóides. Os principais monômeros formadores da lignina são os álcoois *p*-coumaril, coniferil e sinapil (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003). Com relação a sua síntese, os álcoois hidroxicinâmicos se polimerizam pela remoção de átomos de hidrogênio, cuja reação é catalisada pela siringaldazina peroxidase (CHRISTENSEN et al., 1998).

De acordo com Boerjan, Ralph e Baucher (2003), a síntese de lignina foi essencial para a adaptação das plantas no ambiente terrestre, sendo crucial para a integridade estrutural da parede celular e rigidez de troncos, além de evitar o colapso do xilema que transporta água e sais

minerais sob pressão negativa (JONES; ENNOS; TURNER, 2001). Além disso, ela é o segundo biopolímero mais abundante na Terra e corresponde a aproximadamente 30% de todo o carbono orgânico presente na biosfera terrestre (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003). Apesar disso, apenas um pouco mais de uma centena de fungos são capazes de degradar a lignina (AGRIOS, 2005).

O processo de lignificação é observado em muitas espécies de plantas em resposta à infecção por agentes patogênicos, como fungos, bactérias, nematóides e vírus (STICHER; MAUCHI-MANI; MÉTRAUX, 1997). A lignificação pode impedir o desenvolvimento de patógenos através do estabelecimento de uma barreira mecânica, bem como modificar a parede celular de células vegetais, tornando-as mais resistentes a ação de enzimas hidrolíticas, o que dificulta a difusão de toxinas em direção ao hospedeiro e a liberação de nutrientes para os patógenos (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008).

Investigações histológicas mostraram que *X. campestris* pv. *campestris* induziu maior acúmulo de lignina ao redor de hidatódios em folhas de repolhos resistentes (cultivares Hancock e Green Cup) do que em cultivares suscetíveis (Strukton e Perfect Ball), 10 dias após a inoculação (GAY; TUZUN, 2000). Folhas cotiledonares de soja, cultivar Williams, tratadas com glucanas extraídas da parede celular da raça 1 de *P. megasperma* f. sp. *glycinea* (interação incompatível) apresentaram acúmulo de polímero fenólico, com características semelhantes a lignina e a suberina, 16 horas após o tratamento (GRAHAM; GRAHAM, 1991). Estudos com suspensão de células de pimentão mostraram que a cultivar Smith-5, resistente a *P. capsici*, acumulou mais lignina do que a cultivar susceptível Wonder (EGEA et al., 2001).

2.1.7 Enzimas envolvidas na defesa de plantas

2.1.7.1 Proteínas relacionadas à patogênese

Os mecanismos de defesa das plantas contra patógenos provocam mudanças na atividade de enzimas chave do metabolismo secundário, que restringem o desenvolvimento de patógenos e, em sua maior parte, correspondem a proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP). É importante lembrar que estresses abióticos, tais como frio, ferimento, seca, excesso de sal, metal pesado, radiação UV, bem como processos fisiológicos, tais como senescência de folhas e frutos e

maturação de frutos, também proporcionam o acumulo de proteínas-RP, recebendo, nesses casos, a denominação de proteínas de estresse (VAN LOON; REP; PIETERSE; 2006; LINTHORST, 1991).

As proteínas-RP agem diretamente sobre o patógeno e estão agrupadas em 17 famílias (VAN LOON; REP; PIETERSE; 2006). Elas apresentam algumas características que as distinguem das demais proteínas vegetais, tais como estabilidade em pH baixos, em torno de 2,8 (quase a totalidade das demais proteínas das plantas precipitam nessa condição), resistência à ação de proteases ácidas, estabilidade sob altas temperaturas (em torno de 60-70 ^{o}C), podendo ser localizadas no vacúolo, parede celular e/ou apoplasto, e apresentam massa molecular variando entre 8 e 50 kDa (STINTZI et al., 1993; MARTINS, 2008).

Nas plantas elas foram localizadas na epiderme de folhas, mesofilos, células-guarda de estômatos, tricomas glandulares, idioblastos, vasos condutores e em zonas de abscisão (VAN LOON; REP; PIETERSE; 2006). Diferentemente das fitoalexinas, que são produzidas apenas em células sadias adjacentes ao local de infecção, as proteínas-PR também podem acumular em locais distantes desse local, em resposta a ativação da RSA (DELANEY, 1997; RYALS et al., 1996).

As formas extracelulares possuem uma ação imediata na defesa das plantas, pela degradação das hifas invasoras, sendo que a liberação de eliciadores oligossacarídeos não específicos, devido à ação lítica dessas enzimas, pode conduzir a ativação de outros mecanismos de defesa locais ou sistêmicos nas plantas. Além disso, as formas intracelulares podem atuar tardiamente nas reações de defesa, caso o patógeno consiga penetrar na célula vegetal (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008).

2.1.7.1.1 Glucanases

As β-1,3-endoglucanases (E.C 3.2.1.39) são classificadas como PR-2 e apresentam a capacidade de hidrolisar polímeros de β-1,3-glucana. A maioria apresenta atividade de endoglucanase e libera oligômeros compostos por duas a seis unidades de glicose pela ação hidrolítica sobre β-1,3-glucana, laminarina (extraída da alga *Laminaria* sp.) ou *curdlan* (extraído de *Alcaligenes faecalis*) (MARTINS, 2008). Essas enzimas já foram encontradas em plantas (NAZEEM et al., 2008), algas (CORDEIRO et al., 2006), mixomicetos (MIYAIRI et al., 1994),

fungos (El-KATATNY et al., 2001), bactérias (LIN et al., 2009), cianobactérias (TAMOI; KUROTAKI; FUKAMIZO, 2007), actinomicetos (HONG et al., 2002) e oomicetos (McLEOD; SMART; FRY, 2003).

Plantas apresentam quatro classes estruturais de β-1,3-endoglucanases que se diferenciam na estrutura e sequência de aminoácidos. A classe I é composta por proteínas básicas, localizadas no vacúolo e com massa aproximada de 33 kDa. As proteínas da classes II e III são básicas e encontradas no apoplasto, bem como possuem entre 34 e 36 kDa, além de duas isoformas da classe II com 41 kDa expressas em flores de plantas de fumo. A classe IV é composta por apenas uma proteína extracelular, que é localizada em anteras de flores de plantas de fumo e tem a função de degradar a calose durante o desenvolvimento do grão de pólen (LEUBNER-METZGER, 2003).

As β-1,3-endoglucanases estão envolvidas em vários processos fisiológicos e de desenvolvimento, como divisão celular (SCHEP; GROTHA; KUTSCHERA, 2001), germinação de pólen (DOBLIN et al., 2001), desenvolvimento e germinação de sementes (BUCHNER et al., 2002; LEUBNER-METZGER et al., 1995), florescimento, maturação de frutos, abscisão (SIMMOSN, 1994), bem como em respostas a estresses abióticos, como ferimentos (WU; BRADFORD, 2003), O_3 (SCHRAUDNER et al., 1992), radiação UV (El GHAOUTH; WILSON; CALLAHAN; 2003) e ataques de patógenos.

Plantas de tomate transgênicas, que superexpressaram um gene de β-1,3- glucanase de plantas de fumo eram mais resistentes a *Ralstonia solanacearum* do que a linhagem selvagem (CHEN; LIU; ZOU, 2006). Estudos conduzidos com diferentes genótipos de trigos mostraram que a resistência do cultivar RL6082/Lr35 a *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* ocorria em função de altos níveis de β-1,3-endoglucanases constitutiva (ANGUELOVA-MERHAR; VANDER WESTHUIZEN; PRETORIUS, 1999). Já plantas de fumo mutantes, deficientes na produção de β-1,3-endoglucanases, eram mais resistentes ao TMV (BEFFA et al., 1996). Plantas de pimenta-de-macaco (*Piper colubrinum*) (resistente) e o cultivar Kalluvally (tolerante) de pimenta-do-reino (*Piper nigrum*), apresentaram aumento na atividade de glucanases 1 e 2 dias após a inoculação de *P. capsici*, respectivamente. Por outro lado, plantas de pimenta-do-reino cultivar Panniyur-1 (suscetível) não mostraram mudanças na atividade dessa enzima (NAZEEM et al., 2008). Hipocótilos de plântulas de soja (cultivar Jangyup) foram inoculados com as raças 2 e 4 de *P.*

megasperma f. sp. *glycinea*, o que resultou em interações incompatível e compatível, respectivamente. A atividade de glucanases aumentou mais rapidamente em hipocótilos inoculados com a raça 2 do que com a raça 4 (YI; HWANG, 1996).

2.1.7.1.2 Quitinases

As quitinases (E.C 3.2.1.14) são proteínas-RP que pertencem as famílias PR-3, 4, 8 e 11 e hidrolisam polímeros de quitina. A diferença existente entre essas classes de quitinases é a especificidade para com o substrato que elas hidrolisam, bem como as propriedades físico-químicas das mesmas (KASPRZEWKA, 2003). As quitinases da família PR-8, por exemplo, apresentam atividade de lizosima, ou seja, agem sobre bactérias. As quitinases que apresentam atividade sobre quitosana são classificadas na família PR-11 (MARTINS, 2008).

Com base na seqüência de aminoácidos, as quitinases estão classificadas nas famílias 18, 19 e 20 das enzimas hidrolíticas e, as quitinases de plantas, estão agrupadas em sete classes. A família 18 inclui as quitinases de bactérias, fungos, vírus, animais, algas e as classes III e V de plantas. A família 19 é composta por enzimas das classes I, II, IV, VI, VII de plantas e actinomicetos. A família 20 agrupa quitinases de bactérias, actinomicetos e humanos (DAHIYA et al., 2006; SHIROTA et al., 2008). As quitinases fazem parte do trato digestivo de vertebrados, são requeridas para a degradação parcial da cutícula velha de insetos e crustáceos, estão envolvidas com a patogênese de vírus, nutrição e morfogênese de fungos, parasitismo de bactérias e defesa de plantas (KASPRZEWKA, 2003; PATIL et al., 2000; TAIRA et al., 2002; WEN et al., 2002).

Na fisiologia das plantas, essas enzimas estão envolvidas na nodulação em raízes (SANTOS et al., 2008), senescência (LERS et al., 1998), embriogênese (HELLEBOID et al., 2000), florescimento (HAMEL et al., 1997), germinação de sementes (CORDERO; RAVENTOS; SAN SEGUNDO, 1994) e amadurecimento de frutos (ROBINSON; JACOBS; DRY, 1997).

Como ocorre para as β-1,3-glucanases, vários estresses abióticos, como O_3 (SCHRAUDNER et al., 1992), radiação UV (El GHAOUTH; WILSON; CALLAHAN, 2003), ferimentos (WU; BRADFORD, 2003), metal pesado (BÉKÉSIOVÁ et al., 2008), seca e salinidade (HONG; HWANG, 2002); e bióticos podem alterar a atividade de quitinases.

Experimentos envolvendo plantas que superexpressaram quitinases mostraram que folhas

de cacaueiro e de plantas de fumo transgênicas eram mais resistentes a *Colletotrichum gloeosporioides* e a *R. solanacearum*, respectivamente, do que as linhagens selvagens (DANA; PINTOR-TORO; CUBERO, 2006; MAXIMOVA et al., 2006). Além disso, diversos trabalhos mostraram que *Phytophthora* spp. induziram o aumento da atividade de quitinases em plantas (SCHRODER; HAHLBROCK; KOMBRINK, 1992; YI; HWANG, 1996), porém como a parede celular de *Phytophthora* spp. não apresenta quitina em sua constituição, esses autores não souberam explicar o papel dessa enzima no mecanismo de defesa nas interações estudadas.

É importante lembrar que, por serem hidrolases de parede de fungos, as quitinases e β-1,3-endoglucanases podem apresentar efeito antifúngico sinergístico (JONGEDIJK et al., 1995, MARTINS, 2008).

2.1.7.1.3 Peroxidases

As peroxidases (PR-9) são glicoproteínas antioxidantes que catalisam a oxiredução entre H_2O_2 e vários agentes redutores. São capazes de catalisar grande número de reações, como a produção ou catálise de H_2O_2 (ASADA, 1992; CHOI et al., 2007), formação de lignina e suberina (QUIROGA et al., 2000), catabolismo de auxinas (LAGRIMINI et al., 1997), cicatrização de ferimentos (MUNZ et al., 1997) e oxidação de compostos fenólicos (TAKAHAMA; ONIKI, 1992), além de estarem envolvidas nos processos de senescência (VELJOVIC-JOVANOVIC et al., 2006), germinação de sementes (SCHOPFER; PLACHY; FRAHRY, 2001) e florescimento (LOKHANDE et al., 2003).

Elas estão presentes em microrganismos, como fungos (RUIZ-DUENÃS et al., 2009), bactérias (BRENOT et al., 2004), plantas superiores (BOUDJEKO et al., 2005), algas (HEO et al., 2005) e animais (IWATA et al., 2006).

De acordo com as propriedades estruturais e catalíticas, as peroxidases são classificadas em três superfamílias: peroxidases animais, catalase e peroxidases vegetais. As peroxidases vegetais estão subdivididas em três classes. A classe I é constituída por enzimas intracelulares, como a citocromo *c* peroxidase (E.C 1.11.1.5, CCP) de plantas, bactérias e leveduras; e a ascorbato peroxidase (E.C 1.11.1.11, APX). A classe II é formada por enzimas extracelulares de fungos, como a lignina peroxidase (E.C 1.11.1.14, LiP) e peroxidase dependente de manganês

(E.C 1.11.1.13, MnP). A classe III é constituída por peroxidases (E.C 1.11.1.7, POX) que são secretadas no apoplasto ou acumuladas no vacúolo, apresentam uma ampla variedade de substratos e são responsáveis pela maioria das reações de oxiredução estimuladas pelas variações ambientais, ferimentos ou reações infecciosas (HIRAGA et al., 2001).

O guaiacol (*o*-metoxifenol) é o substrato usualmente utilizado para determinar a atividade das POXs. Essa reação, que ocorre na presença de H_2O_2, leva a formação do tetraguaiacol (HIRAGA et al., 2001; SAKURAGAWA; TANIAI; OKUTANI, 1998).

Vários fatores abióticos, como sal (KOCA; OZDEMIR; TURKAN, 2006), seca (VELJOVIC-JOVANOVIC et al., 2006), ferimento (MUNZ et al., 1997), metal pesado (SHARMA, 2009) e temperatura (LOKHANDE et al., 2003) podem alterar a atividade de peroxidases em plantas. Além disso, a expressão das peroxidases nas plantas esta relacionada com a infecção de patógenos, pois atuam no reforço da parede celular a partir da formação da lignina (CHRISTENSEN et al., 1998), suberina (QUIROGA et al., 2000) e papilas (BROWN et al., 1998), possibilitam a ligação entre glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (COOPER; VARNER, 1983), estão envolvidas na peroxidação de lipídeos (LÉON; LAWTON; RASKIN, 1995) e aumentam a produção de EROs (DAVLETOVA et al., 2005) e de fitoalexinas (KRISTENSEN; BLOCH; RASMUSSEN, 1999).

Łojkowska e Hołubiwska (1992) verificaram a relação entre resistência de híbridos somáticos de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum* x *Solanum brevidens*) a *E. carotovora* e a atividade de peroxidase. Plantas de fumo transgênicas que expressavam o gene Shpx2, que codifica uma peroxidase, eram mais resistentes a infecções por *P. parasitica* var. *nicotianae* e *Cercospora nicotianae* (WAY et al., 2001). Graham e Graham (1991) estudaram a interação incompatível *P. megasperma* f. sp. *glycinea* (raça 1) - soja (cultivar Williams), e verificaram que glucanas extraídas da parede celular do patógeno estimularam a atividade de peroxidase em folhas cotiledonares do hospedeiro quatro horas após a inoculação. Além disso, em cultivares resistentes de *Xanthosoma sagittifolium* a atividade de peroxidase aumentou 41% 2 dias após a inoculação de *Pythium myriotylum*. Porém, em cultivares suscetíveis, a atividade dessa enzima aumentou apenas 13% (BOUDJEKO et al., 2005). Em outro trabalho, Egea et al. (2001) verificaram a existência de correlação positiva entre a resistência de três cultivares de pimentão a *P. capsic*i e a excreção de peroxidases a partir de suspensão de células inoculadas com o patógeno.

2.1.7.2 Fenilalanina amônia-liase

A fenilalanina amônia-liase (E.C 4.3.1.5, FAL), enzima chave da via da rota dos fenilpropanóides, catalisa a reação de desaminação do aminoácido L-fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico e amônia (RITTER; SCHULZ, 2004; SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008), além de ser o ponto de ramificação entre o metabolismo primário (via do ácido shiquímico) e secundário (HERRMANN; WEAVER, 1999).

O ácido *trans*-cinâmico origina vários fenilpropanóides simples, como os ácidos *p*-cumárico, caféico, ferúlico, sinápico, que estão presentes em altas concentrações no interior de células vegetais na forma de conjugados com açúcares, ou associados a carboidratos presentes na parede celular ou ácidos orgânicos. Esses compostos simples dão origem a lignina, suberina, coumarinas, flavonóides, antocianinas e fitoalexinas. Além disso, o ácido *trans*-cinâmico pode originar os ácidos benzóico e salicílico que não pertencem a classe dos fenilpropanóides (DIXON; PAIVA; 1995).

Nas plantas esses compostos realizam diferentes funções, como suporte mecânico, ação antioxidante, absorção da radiação UV, fatores antinutritivos, proteção contra patógenos e moléculas sinalizadoras (DIXON; PAIVA, 1995).

Na área médica, por sua vez, os fenilpropanóides são usados como agentes antioxidantes, antitumoral, antiviral, antibacteriano, antiinflamatório, cicatrizante, e podem ser encontrados em temperos, vinho, cerveja, óleo essencial e própolis (KORKINA, 2007).

A FAL é uma enzima tetramérica composta por quatro subunidades diferentes (RITTER; SCHULZ, 2004) e esta presente em fungos (SU et al., 2008), actinomicetos (BEZANSON et al., 1970), plantas (SCHRODERT et al., 1992), algas (CHEN et al., 2003), cianobactérias (MOFFITT et al., 2007) e bactérias (XIANG; MOORE, 2005), porém está ausente em animais (RITTER; SCHULZ, 2004, SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008). Nas plantas, esta localizada no citoplasma das células, mas também pode estar associada a estruturas membranosas (DIXON; PAIVA, 1995).

A atividade da FAL pode ser alterada por ferimento (LÓPEZ-GÁLVEZ; SALTVEIT; CANTWELL, 1996), radiação UV (El GHAOUTH; WILSON; CALLAHAN, 2003), O_3 (PAOLACCI et al., 2001), metal pesado (DAI et al., 2006), baixa concentração de nitrogênio,

fosfato e ferro (DIXON; PAIVA; 1995), bem como devido a ataque de patógenos.

A inoculação de *Arabidopsis thaliana* com o isolado avirulento de *P. syringae* pv. *tomato* MM1065, induziu a expressão do mRNA da FAL 6 h após a inoculação. Porém, ela não foi induzida pelo isolado ES4326 do patógeno *P. syringae* pv. *maculicola* (DONG et al., 1991). Folhas de fumo que tiveram a atividade da FAL inibida, desenvolveram lesões maiores provocadas por TMV do que as folhas controle (MASSALA; LEGRAND; FRITIG, 1980). Zeyen et al. (1995) verificaram que a supressão da atividade da FAL, tanto inibiu a RH, quanto reduziu a resistência de folhas de cevada a infecção por *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. Schrodert et al. (1992) estudaram a resistência raça-específica existente na interação batata - *P. infestans*, e verificaram o acúmulo mais rápido de mRNA que expressava a FAL na interação incompatível (batata cultivar Datura - *P. infestans* raça Pi 4) do que na interação compatível (batata cultivars Datura - *P. infestans* raça Pi 1). Além disso, hipocótilos de plântulas de soja, cultivar Harosoy 63, tratados com ácido abscísico ficaram suscetíveis a raça 1 de *P. megasperma* f. sp. *glycinea*, sendo verificado aumento mais rápido e intenso na atividade da FAL nos hipocótilos controle (WARD; CAHILL; BHATTACHARYYA, 1989).

2.1.7.3 Polifenoloxidase

As polifenoloxidases (E.C 1.10.3.1, PFOs) são enzimas que contém dois átomos de cobre no centro de reação, sendo capazes de inserir um átomo de oxigênio em um grupo hidroxila existente de um composto fenólico, seguida pela oxidação do difenol na quinona correspondente (Figura 1). Essa reação tem o O_2 como principal agente oxidante (MAYER et al., 2006).

A enzima esta presente na forma latente em membranas de tilacóides de cloroplastos, bem como em plastídeos e mitocôndria, ou seja, elas não estão em contato com compostos fenólicos que estão armazenados no vacúolo. Durante a senescência ou injúria de células ocorre a ruptura dos cloroplastos e vacúolos, quando as PFOs oxidam os fenóis (MURATA et al., 1997; YORUK; MARSHALL, 2003). Vários fatores induzem a ativação da PFO, como congelamento, senescência (LIEBEREI; BIEHL, 1978), ácidos graxos, detergente, variação no pH, álcoois (ONSA et al., 2000) e metil jasmonato (MAYER, 2006).

Na área da ciência dos alimentos, as PFOs são muito importante, pois o escurecimento de

produtos vegetais, cogumelos e crustáceos ocorre pela oxidação de compostos fenólicos em quinonas, que eventualmente se polimerizam e dão origem a melanina. Essas reações mudam as características nutricionais, organolépticas, bem como diminuem a aceitação do produto pelo consumidor, a vida de prateleira e o valor comercial (JOLIVET et al., 1998; YORUK; MARSHALL, 2003).

Essas enzimas estão presentes em crustáceos (CHEN et al., 1997), fungos (ESPIN et al., 2000), plantas (SAHOO et al., 2008), cianobactérias (SHASHIREKHA; UMA; SUBRAMANIAN, 1997), actinomicetos (SUZUKI et al., 2003) e bactérias (HERNÁNDEZ-ROMERO; SOLANO; SANCHEZ-AMAT, 2005). A atividade da PFO pode ser alterada por ferimento (THIPYAPONG; HUNT; STEFFENS, 1995), O_3 (TINGEY; FITES; WICKLIFF, 1976), temperaturas extremas (STEWART et al., 2001), bem como por ataques de insetos e patógenos (YORUK; MARSHALL, 2003).

Híbridos somáticos de batateira com maior atividade de PFO também são mais resistentes a *E. carotovora* (ŁOJKOWSKA; HOŁUBOWSKA, 1992). A atividade de PFO constitutiva em tubérculos de batata, cultivar BR6316-7, é o principal fator de resistência dos mesmos contra *Fusarium sambucinum* (RAY; HAMMERSCHMIDT, 1998). Por sua vez, sementes de tomates e de pimentão tratadas com *Pseudomonas fluorescens* geraram plantas mais resistentes a *Pythium aphanidermatum*, sendo que essa resistência foi relacionada com aumentos na atividade de PFO (RAMAMOORTHY; RAGUCHANDER; SAMIYAPPAN, 2002). Sahoo et al. (2008) verificaram que *P. colocasiae* induziu o aumento em pelo menos 40% na atividade de PFO em folhas de cultivares resistente (DP-25, Duradim e Jhankri) de inhame e de apenas 17% na cultivar suscetível (N-118).

As quinonas, por sua vez, são muito importantes nos processos de respiração e fotossíntese que ocorrem nas mitocôndrias e nos cloroplastos, respectivamente. Durante a respiração, a ubiquinona participa na transferência de elétrons do NADH e do $FADH_2$, gerados durante o ciclo do ácido cítrico, para o complexo III (citocromos bc_1). Já na fase dependente de luz da fotossíntese, as plastoquinonas A e B são responsáveis por transferir elétrons do fotossistema II para o complexo de citocromos 6/f (TAIZ; ZEIGER, 2006). Além disso, as quinonas fazem parte do processo de defesa vegetal, visto que são mais tóxicas a microrganismos do que os fenóis em sua forma original (AGRIOS, 2005). Por exemplo, plumbagina, uma naftoquinona isolada de

Nepenthes ventricosa × *Nepenthes maxima*, inibiu o desenvolvimento de *A. alternata*, *Aspergillus niger*, *Bipolaris oryzae*, *Fusarium oxysporum*, *P. capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer* e *Sclerotinia sclerotiorum* (SHIN; LEE; CHA, 2007).

2.1.8 Alterações fisiológicas provocada por patógenos

Aproximadamente 95% da massa seca de uma planta é composta por carbono fixado pelo processo de fotossíntese. Além do crescimento, produção e manutenção dos órgão da plantas, o carbono pode ser armazenado e/ou perdido por meio de ataque de pragas e patógenos, senescência ou exsudado pelo sistema radicular (MEDINA et al., 2005).

Os processos que fazem parte da fotossíntese podem ser classificados como difusivos, fotoquímicos e bioquímicos. O primeiro diz respeito ao fluxo de CO_2 entre a atmosfera e o mesofilo, que é regulado pela abertura estomática. O segundo envolve a absorção de energia radiante, hidrólise e liberação de O_2, com posterior produção de adenosina trifosfato (ATP) e nicotinamida adenina dinucleotídeo de piridina fosfato reduzida (NADPH), que armazena energia e apresenta poder redutor, respectivamente. Durante os processos bioquímicos, o CO_2 é incorporado a ribulose-1,5-bifosfato por intermédio da ribulose bifosfato carboxilase-oxidase (RUBISCO) formando duas moléculas de 3-fosfoglicerato. Em seguida, esse composto é reduzido a gliceraldeído-3-fosfato, uma triose, com a utilização de ATP e de NADPH gerados durante o processo fotoquímico. A partir do gliceraldeído-3-fosfato, pode ocorrer a regeneração da ribulose-1,5-bifosfato, completando o ciclo de Calvin, ou a síntese de sacarose, no citoplasma, ou de amido, no cloroplasto (SHARKEY, 1985; TAIZ; ZEIGER, 2006). O amido é preferencialmente sintetizado quando as plantas apresentam crescimento reduzido ou não estão em produção. Por outro lado, quando há drenos (brotação, frutos) a sacarose, uma diose não redutora formada por uma molécula de glicose e uma de frutose, é sintetizada (GIFFORD et al., 1984).

Em plantas de citros, baixas disponibilidade hídrica e temperatura prejudicam o processo de fotossíntese (RIBEIRO, 2006). Além desses parâmetros, outros fatores também podem afetar a taxa fotossintética dessa classe de plantas, como o estado nutricional, porta-enxerto, relação dreno/fonte, umidade do solo, e a ocorrência de pragas e doenças (MEDINA et al., 2005). A destruição de tecido verde por patógenos pode alterar diferentes etapas da fotossíntese, que podem

ocorrer em virtude de alterações de meios físicos e/ou metabólicos. Os meios físicos compreendem: mudança na absorção de CO_2, redução na interceptação da radiação solar e redução ou destruição das moléculas de clorofila ou cloroplastos; por sua vez, o aumento na respiração do hospedeiro e/ou fungo, inibição na cadeia de transporte de elétrons, redução na quantidade ou atividade das enzimas do ciclo de Calvin, acúmulo de carboidratos e seqüestro de fósforo inorgânico do citoplasma do hospedeiro pelo fungo são os mecanismos metabólicos (STANGARLIN; LEITE, 2008).

Visto que a superfície da folha é coberta por cutícula, que é impermeável ao CO_2, o mesmo deve penetrar na planta através dos poros estomáticos. Porém, por eles também ocorre perda de água para a atmosfera através da transpiração. Nesse sentido, segundo Cowan (1977) a abertura estomática não age de forma a apenas evitar a desidratação dos tecidos, mas de forma a maximizar a razão entre a taxa de assimilação de CO_2 pela taxa de transpiração. Quando a água e o CO_2 tentam atravessar os estômatos, os mesmos impõe uma resistência estomática, sendo essa a principal limitação de difusão do CO_2. Quando o poro estomático esta aberto, a resistência de difusão dos gases é mínima, porém, com o fechamento do poro estomático, a resistência estomática cresce, dificultando a entrada do CO_2 (MEDINA et al., 2005). O inverso da resistência estomática é a condutância estomática, que foi definida por Taiz e Zeiger (2006) como a medida do fluxo de água e CO_2 através dos estômatos. É importante lembrar que existe uma relação positiva entre a condutância estomática e a fotossíntese, que pode ser causa ou conseqüência da razão entre o CO_2 atmosférico (C_s) e intercelular (C_i) (LAWSON, 2009).

Já a transpiração, ou seja, perda de água na forma de vapor, é a forma mais eficiente para dissipar o calor proveniente do sol (TAIZ; ZEIGER, 2006). A taxa de transpiração provoca mudanças no potencial de água da folha, bem como em sua temperatura, a qual afeta os processos fisiológicos e bioquímicos de folhas, bem como a absorção de nutrientes (FARQUHAR; SHARKEY, 1982; YOO et al., 2009). Aparentemente, a regulação estomática da transpiração representa um mecanismo de preservação de água em situações de baixa disponibilidade hídrica (MEDINA; MACHADO; GOMES, 1999). Em vista disso, segundo Nobel (1999) menores aberturas estomáticas levam a redução na transpiração e, conseqüentemente, aumento da temperatura dos tecidos, o que afeta a fotossíntese.

Para a água ser transpirada, a mesma deve ser absorvida pela raiz na região apical

radicular, que inclui a zona de pelos radiculares. Nesse processo, um contato íntimo entre o solo e a superfície radicular é necessário. Após a absorção, a água pode fluir da epiderme até a endoderme por três rotas: apoplástica - na qual a água move exclusivamente pela parede celular sem atravessar qualquer membrana; transmembrana - a água atravessa a membrana plasmática para entrar e sair da célula; simplástica - a água move de uma célula para outra através dos plasmodesmas. Na endoderme, o movimento de água via apoplasto é obstruído pelas estrias de Caspary, sendo distribuída através da planta via xilema (TAIZ; ZEIGER, 2006). Além disso, desde a absorção até a transpiração, a água move do solo para a planta e para a atmosfera ao longo de uma redução contínua do potencial de água (ψ) e se a taxa de transpiração for maior do que a taxa de absorção, a planta irá dessecar (JACKSON; SPERRY; DAWSON, 2000). É importante lembrar que as plantas de citros são ineficientes na absorção de água em decorrência da pequena abundância de pelos radiculares, a maior parte das raízes se encontram próxima a superfície do solo, além de apresentarem uma pequena relação parte aérea/raízes (MEDINA et al., 2005).

O uso eficiente da água (UEA), por sua vez, é o acúmulo de biomassa de uma cultura por unidade água transpirada (ABBATE et al., 2004). O UEA instantâneo pode ser calculado através de análises de troca gasosa dividindo a taxa fotossíntética pela transpiração (TAMBUSSI; BORT; ARAUS, 2007). Segundo Araus et al. (2002), a água é um fator abiótico que tem um grande impacto na produção em várias regiões áridas do mundo e, de acordo com Tambussi, Bort e Aurus, (2007), o UEA é um parâmetro crucial em locais onde a água é escassa.

No caso de citros, a taxa de fotossíntese, expostas a luz saturante (fluxo fotossintético de fótons de 800 μmol de quanta m^{-2} s-^{1}), pode chegar a 12 μmol CO_2 m^{-2} s^{-1} quando a abertura estomática esta entre 0,25 e 0,3 mol CO_2 m^{-2} s^{-1} e C_i aproximado de 250 μmol CO_2 mol^{-1}e UEA ao redor de 3 μmol mol^{-1} (MEDINA et al., 2005). Segundo esses mesmos autores, a fotossíntese e o UEA de plantas de citros são baixo e alto, respectivamente, quando comparadas com outras plantas C_3, sendo que isso ocorre pela alta resistência estomática e do mesofilo que dificultam mais a perda de água do que a entrada de CO_2.

É importante lembrar que patógenos veiculados pelo solo também podem afetar esses processos fisiológicos. Essas alterações podem ser devido a redução no sistema radicular e bloqueio ou destruição dos vasos condutores que aumentam a resistência do fluxo de água através da planta (ISAAC, 1992).

Plântulas de *Camellia sinensis* da cultivar TRI-2024 (suscetíveis) e da cultivar TRI-2025 (resistentes) apresentaram redução na fotossíntese, transpiração, condutância estomática e UEA dois anos após a inoculação de *Phomopsis theae*. Porém, essas reduções foram mais pronunciadas na cultivar suscetível. Esses parâmetros de troca gasosa também foram afetados em plantas de *C. sinensis* infectadas por *Exobasidium vexans*, *Pestalotiopsis theae*, *Colletotrichum camelliae*, *Capnodium theae* ou *Cephaleuros parasiticus* (PONMURUGAN; BABY; RAJKUMAR, 2007). Ribeiro, Machado e Oliveira (2003) verificaram que plântulas de laranja Pêra, inoculadas com *Xylella fastidiosa*, apresentaram redução na taxa fotossintética, transpiração e condutância estomática sete meses após a inoculação. Moreshet et al. (1998) verificaram que plantas irrigadas de pomelo enxertados sobre citrange Troyer e infectadas com *Citrus exocortis viroid* (CEVd) apresentaram menor absorção de água e condutância da folha do que plantas sadias seis anos após a inoculação. Plantas de feijão inoculadas com *Uromyces appendiculatus*, *Phaeoisariopsis griseola* ou *Colletotrichum lindemuthianum* apresentaram redução na fotossíntese, condutância estomática, transpiração e Ci a partir do sétimo dia após a inoculação (BASSANEZI et al., 2002). O *Potato virus* Y (PVY) provocou redução na fotossíntese em folhas de plantas de batata a partir do vigésimo dia após a inoculação (ZHOU et al., 2004). Johnstone (2005) verificou que *Pythium dissotocum* reduziu a fotossíntese, transpiração e condutância estomática em plantas de alface 16 dias após a inoculação, sendo que o C_i e o UEA sofreram redução e aumento, respectivamente, 25 dias após a inoculação.

É importante lembrar que patógenos normalmente retiram seus nutrientes do hospedeiro e utilizam no seu próprio metabolismo (PASCHOLATI, 1995). Então, além de provocarem alterações no processo de fotossíntese, os patógenos também podem provocar reduções nos teores de açúcares (Figura 1), sintetizados a partir do processo de fotossíntese, e de proteínas totais nos tecidos das plantas (PONMURUGAN; BABY; RAJKUMAR, 2007).

Carboidratos oxidases, por sua vez, podem gerar H_2O_2 (Figura 1) e estão envolvidas no processo de defesa de plantas contra patógenos. Uma carboidrato oxidase inibiu o crescimento *in vitro* de vários patógenos e plantas de fumo que superexpressavam um gene dessa enzima ficaram mais resistentes a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (CUSTERS et al, 2004).

A glicose oxidase, além de proporcionar o acúmulo de H_2O_2, também estimula a via do AS, a síntese de PR-1 (DIEZEL et al., 2009) e o acúmulo de calose (SCHULTHEISS et al., 2003).

Além disso, suspensões de células de plantas de fumo cultivadas em diferentes concentrações de glicose oxidase apresentaram correlação positiva entre a quantidade de enzima, o acúmulo de H_2O_2 e da atividade de ascorbato peroxidase. A adição de catalase na suspensão de células reduziu a concentração de H_2O_2, porém não interferiu na atividade da ascorbato peroxidase (de PINTO et al., 2006).

Finalmente, plantas com alta concentração de açúcares também podem ativar a cascata MAPK e a expressão de genes relacionados à defesa, como proteínas-RP e FAL (Figura 1) (EHNESS et al., 1997; THIBAUD et al., 2004).

2.2 Material e métodos

2.2.1 Obtenção das plantas hospedeiras

Plantas de limão Gênova, suscetível a *P. nicotianae*, enxertadas sobre limão Volkameriano, com seis meses de idade, foram cedidas pelo Eng. Agrônomo Antonio Ricardo Violante (Cutrale, São João da Boa Vista, SP). Ademais, porta-enxertos de tangerina Sunki (*Citrus sunki*), suscetível a *P. nicotianae* e citrumelo Swingle (*Citrus paradisi* × *Poncirus trifoliata*), resistente a *P. nicotianae*, com seis meses de cultivo, foram obtidos em viveiro de mudas localizado no município de Casa Branca, SP. Os porta-enxertos foram transplantados para recipientes plásticos de 4,5 L, preenchidos com mistura autoclavada composta por terra, areia e matéria orgânica (2:1:2; v/v/v) e mantidos no campo experimental do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP, localizado a 22° 42' 27" S e 47° 37' 52" W, a 513 m de altitude, os quais serão chamadas de porta-enxertos no texto do presente trabalho.

Por sua vez, sementes de citrumelo Swingle e de tangerina Sunki, cedidas pelo Fundecitrus (Araraquara, SP) e Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” (Cordeirópolis, SP), tiveram os tegumentos removidos e foram desinfestadas com hipoclorito de sódio (2,5%), sob agitação por 15 min, seguida de três lavagens em água destilada autoclavada. Logo após, dez sementes foram inseridas no interior de placas de Petri, as quais continham 15 mL de substrato ágar-água (1,5%). As placas foram vedadas com filme plástico e incubadas a 28 °C, sob escuro, sendo que após 15 dias, as sementes germinadas foram transferidas para bandejas de isopor com 96 células e preenchidas com vermiculita ou substrato Plantmax®. Finalmente, as plântulas das duas

variedades de porta-enxerto, com 60 dias de cultivo, foram cedidas pelo MSc. Antonio Juliano Ayres (Citrosol, Mendonça, SP). Essas plantas serão chamadas de plântulas no texto do presente trabalho.

2.2.2 Seleção do isolado de *Phytophthora nicotianae*

Os isolados de *Phytophthora nicotianae* LRS 05/01, LRS 02/04, LRS 04/04, LRS 05/04 LRS 11/04, LRS 01/06 E LRS 02/06, cedidos pelo Pesquisador Científico Eduardo Feichtenberger (Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Sorocaba, APTA Regional), foram inoculados em plantas de limão Gênova, obtidas de acordo com o item 2.2.1. Para isso, um disco de casca do tronco de 5 mm de diâmetro foi retirado com auxilio de um furador de metal. Em seguida, um disco de igual diâmetro de meio de cultivo, que continha micélio, foi retirado do bordo de colônia de um dos isolados de *P. nicotianae*, cultivado por cinco dias em meio cenoura-ágar (CA - 200 g L^{-1} de cenoura sem casca, homogeneizada em liquidificador e peneirada e 15 g L^{-1} de ágar) e colocado no ferimento, com a face do inóculo voltada para o lenho da planta. Em seguida, o disco da casca do tronco foi recolocado no local da inoculação, fixado com auxílio de esparadrapo cirúrgico e a área inoculada envolvida por gaze, que foi mantida úmida até o momento da avaliação (ROSSETTI, 1947). Cada isolado foi inoculado em três plantas distintas e em cada planta foram realizadas quatro inoculações, sendo as plantas mantidas sob condições de telado.

A avaliação da área lesionada foi efetuada 44 dias após a inoculação. Para tanto, cascas de troncos foram removidas com auxílio de canivete e um pedaço de fita transparente foi colocado sobre cada lesão, que teve o bordo desenhado com auxilio de uma caneta para retroprojetor. Os pedaços de fita foram removidos das lesões e fixados em uma folha de papel sulfite. Em seguida, os desenhos das lesões foram recortados, digitalizados e o tamanho das áreas determinadas com auxilio do software QUANT (versão 1.0). Para a analise estatística, os valores foram transformados $\sqrt{x+0,5}$ e comparados através do teste de Tukey (5%).

Para os testes que envolveram as análises molecular, bioquímica e fisiológica foi utilizado o isolado mais agressivo.

2.2.3 Produção de inóculo, inoculação dos porta-enxertos, quantificação da troca gasosa, da biomassa do sistema radicular e detecção do patógeno

O propágulo utilizado para a inoculação de porta-enxertos foi obtido de acordo com Araujo (1998). Para a produção de zoósporos, 10 discos de micélio com 5 mm de diâmetro foram retirados de bordos de colônias de *P. nicotianae* (LRS 01/06), com sete dias de crescimento em meio CA, e transferidos para placas de Petri de poliestireno que continham 10 mL de meio cenoura-líquido diluído (2 mL de meio cenoura-líquido e 8 mL de água destilada autoclavada). As placas foram mantidas a 24 ºC sob luz fluorescente constante e, após 24 h, para proporcionar estresse nutricional e produção de esporângios, o meio de cenoura-líquido diluído foi removido das placas e substituído por 10 mL de água destilada autoclavada. As placas foram mantidas sob luz fluorescente constante a 24 ºC por 48 h. Em seguida, para a obtenção dos zoósporos, lotes de 12 placas foram mantidas no interior de geladeira por 20 min e, a seguir, a temperatura ambiente por 20 min. Além disso, placas de Petri que continham 15 mL de meio CA receberam um disco de micélio de 0,5 cm, retirado de bordo de colônia de *P. nicotianae* e foram mantidas a 24 ºC sob escuro por 15 dias.

O inóculo foi composto pelo meio CA colonizado por *P. nicotianae* e 75 mL de água destilada, que foram homogeneizados em liquidificador por 30 s e transferidos para recipientes que continham 10 mL da suspensão de zoósporos (3.10^4 zoósporos mL^{-1}).

Para a inoculação, três meses após o transplantio, com auxilio de um bastão de vidro foram feitos no substrato quatro orifícios equidistantes, com 15 cm de profundidade e a 5 cm do colo de cada porta-enxerto. Em seguida, o inóculo (com volume aproximado de 100 mL), preparado como descrito acima, foi espalhado ao redor de cada porta-enxerto. Logo após, para garantir a existência de água livre no solo, e facilitar a movimentação dos zoósporos, o substrato foi inundado com água de torneira, obtida no campo experimental do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP, sendo que a água foi removida após dois dias. As raízes das plantas controle receberam tratamento semelhante, porém sem o patógeno.

Após a inoculação, a troca gasosa foi monitorada, durante nove meses, de acordo com a metodologia descrita por Habermann et al. (2003). Para isso, a medida da concentração de CO_2 e fluxo de vapor d'água foram obtidos em folhas maduras e completamente expandidas localizadas

no terço superior de cada porta-enxertos, com o auxilio de um analisador de gás por infravermelho (LI-COR, modelo LI-6400). A concentração de CO_2 do aparelho foi fixada em 380 ppm, a intensidade luminosa em 1.000 μmol m^{-2} s^{-1} e a temperatura da folha em 27 ºC. As avaliações foram realizadas das 7:30 h às 11:00 h e os parâmetros de fotossíntese, transpiração, condutância estomática e concentração de CO_2 interno foram calculados pelo programa de análise de dados do LI-6400 e armazenados quando o coeficiente de variação foi menor do que 0,5%. Ademais, a eficiência do uso eficiente da água foi calculada pela divisão entre as taxas de assimilação de CO_2 e de transpiração (MEDINA; MACHADO; GOMES, 1999; TAMBUSSI; BORT; ARAUS, 2007).

Após a avaliação da troca gasosa, cada planta teve a massa do sistema radicular determinada com auxilio de uma balança analítica. Ademais, amostras de 0,5 g de radicelas e de folhas que tiveram a troca gasosa determinada, além das folhas imediatamente superiores, foram congeladas a -20 ºC, sendo que cada tratamento foi composto por seis repetições.

As plantas receberam 15 mL de fertilizante 10-10-10 (NPK) 2, 4 e 6 meses após a inoculação e 15 mL de Osmocote® 8 meses após a inoculação. Aplicações de 100 mL por planta de solução nutritiva, preparada de acordo com Furlani (1998) (concentração de nutrientes em mg L^{-1}: NO_3 161,50, NH_4 = 23,00; P = 41,60; K = 233,60; Ca = 102,60; Mg =36,00; S = 48,0; Fe = 1,80; Zn = 0,23; Mn = 0,64; B = 0,50; Cu = 0,13; Mo = 0,02), foram realizadas 1, 3 ,5 e 7 meses após a inoculação. A irrigação foi feita por aspersão e realizada 3 ou 4 vezes por semana.

Os dados meteorológicos, obtidos junto ao Departamento de Engenharia Rural (ESALQ/ USP) e disponíveis em: http://www.leb.esalq.usp.br/automatica/pagina5.html, foram coletados de uma estação meteorológica automática instalada no posto agrometeorológico daquele departamento, localizado a 22º 42' 30" S e 47º 38' 00" W, a 546 m de altitude (ANEXO A).

Finalmente, para a detecção da presença ou ausência do patógeno, amostras de 30 mL de substrato e raízes foram coletadas e inseridas em copos plásticos descartáveis de 200 mL. Cada amostra foi inundada com 60 mL de água destilada autoclavada e, sobre a água, foram depositados 10 discos com 3 mm de diâmetro de folhas de limão siciliano, o qual é suscetível a *P. nicotianae*. Os copos foram vedados com filme plástico e mantidos sob luz fluorescente constante e a temperatura ambiente por quatro dias. Em seguida, os discos de folhas foram transferidos para lâmina para microscópio e a presença de esporângios no bordo dos discos de folhas foi verificada com auxilio de microscópio ótico, sendo utilizado aumento de 100 vezes.

2.2.4 Inoculação das plântulas sob condições de câmara de crescimento, quantificação da troca gasosa e do consumo de água

A determinação da troca gasosa e de consumo de água foram realizadas junto a Seção de Fitopatologia de Plantas Lenhosas no Departamento de Ecologia da Universidade Técnica de Munique em Freising, Alemanha, sob supervisão do Prof. Dr. Wofgang Oßwald, bem como no Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP. Para isso, plântulas de citrumelo Swingle e de tangerina Sunki, com 60 dias de cultivo, obtidas como descrito no item 2.2.1, foram transferidas para frascos plásticos preenchidos com suspensão de zoósporos, obtida conforme descrito no item 2.2.3, ou água destilada autoclavada. Os frascos foram vedados com filme plástico e mantidos no interior de câmara de crescimento a 28 °C e sob fotoperíodo de 12 h.

Após a inoculação de *P. nicotianae*, cinco plântulas de cada tratamento tiveram a troca gasosa avaliada diariamente, como descrito no item 2.2.3. Além disso, o consumo (transpiração + evaporação) de água foi quantificado através da determinação da diferença diária das massas dos conjuntos (frascos + plântulas) (FLEISCHMANN et al., 2005). Finalmente, amostras de folhas e raízes de nove plântulas por tratamento foram coletadas periodicamente, maceradas em nitrogênio liquido e armazenadas a - 75°C.

2.2.5 Etileno

A determinação da produção de etileno foi realizada no Laboratório de Pós-colheita de Produtos Hortícolas do Departamento de Produção Vegetal, ESALQ/USP, sob supervisão do Prof. Dr. Angelo Pedro Jacomino. Para tanto, 0,5 g de folhas das plântulas, obtidas de acordo com o item 2.2.4, foram inseridas em tubos de 16 mL hermeticamente fechados, dos quais 8 mL estavam preenchidos com 1,5% ágar. A tampa de cada tubo continha um septo de silicone. Após 10 h, amostras de 2,5 mL de ar do interior dos frascos foram coletadas com seringa através dos septos e injetadas em cromatógrafo a gás (Thermo Electron Trace 2000 GC), equipado com um detector de ionização de chama (FID) regulado para 250 °C, um injetor regulado para 100 °C e uma coluna Porapack N de 1,8 m regulada para 100 °C, tendo o nitrogênio como gás de arraste. O tempo de corrida de cada amostra foi de 90 s e etileno comercial na concentração de 580 ppm foi utilizado

como padrão. A produção de etileno foi calculada com base no volume do frasco, massa das amostras e o tempo de incubação das amostras. Foram utilizadas cinco plântulas por tratamentos e os resultados expressos em pL de etileno g^{-1} de folha h^{-1}.

2.2.6 Extração de DNA de radicelas de plântulas de citros

O DNA total de raízes de plântulas (item 2.2.4) de citros e do micélio do patógeno, cultivado em meio V8-líquido filtrado (200 mL de suco V8, filtrado através de gaze e papel de filtro 595 ½ Schleicher & Schuell, 800 mL de água destilada e 3 g de $CaCO_3$), incubado a 22 °C e sob agitação por 4 dias, foi extraído em tubos tipo eppendorf de 1,5 mL, de acordo com Lefort e Douglas (1999). Para isso, 20 mg do material liofilizado recebeu 1 mL do tampão de extração (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM EDTA pH 8,0; 0,7 M NaCl; 0,4 M LiCl; 1% (m/v) CTAB), 1% (m/v) PVP, 2% (m/v) SDS e 1% (m/v) β-mercaptoetanol), sendo homogeneizado através de suaves inversões de tubo, incubado em banho-maria a 65 °C por 10 min e resfriado em gelo por 5 min. Em seguida, foi acrescido de 0,5 mL de solução clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 24:1 (v:v), homogeneizado por suaves inversões de tubo e centrifugado por 10 min a 17.000 *g* a 4 °C. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para novo tubo, ao qual foi adicionado igual volume de isopropanol, homogeneizado por suaves inversões e centrifugado por 2 min a 17.000 *g* a 4 °C. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% e novamente centrifugado por 2 min a 17.000 *g* a 4 °C. O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado foi seco a temperatura ambiente. Após, o mesmo foi ressuspenso em 50 µL de água destilada e a quantificação e pureza do DNA foram verificadas a 260 e 280 nm.

2.2.7 Detecção e quantificação de *P. nicotianae* em raízes de plântulas de citros

A quantificação de *P. nicotianae* em raízes de plântulas de citros foi realizada com auxílio dos *primers* ITS3 (5´ GCATCGATGAAGAACGCAGC 3´) e PNIC1 (5´ATTCAAAAGCCAAGCCACCG 3´) que amplificam um fragmento de 455 pb (TOOLEY et al., 1997). A reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa foi realizado em sistema de detecção de seqüências ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems). O fluoróforo usado foi o “SYBR green”,

que se liga a fitas duplas de DNA. Para tanto, 5µL de DNA, extraído como descrito no item 2.2.6, foi adicionado a 12,5 µL de *Master Mix* (Applied Biosystems), 0,5 µL de cada *primer* (10 pmol μL^{-1}), 1 µL de Rox e 5,5 µL de água destilada autoclavada tratada com 0,1% de dietil pirocarbonato (DEPC). As condições térmicas da PCR quantitativa foram 95°C por 15 min para a separação das fitas duplas e 40 vezes 94 °C por 15 s, 55 °C por 15 s, 72 °C por 15 s; além de 72 °C por 5 min. Para a construção da reta padrão, uma diluição em série de DNA extraído de micélio de *P. nicotianae*, que continha de 8,8 a $8{,}8.10^5$ pg DNA mL^{-1}, foi incorporada em cada análise. Todas as amostras foram analisadas em triplicatas e os resultados foram expressos em pg DNA de *P. nicotianae* mg^{-1} de tecido seco de raiz.

2.2.8 Obtenção de extrato de folhas e de raízes

Amostras de folhas e raízes de porta-enxertos de citros, obtidas como descrito no item 2.2.3, foram maceradas na presença de nitrogênio líquido seguida pela adição de 4 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,0) (tampão de extração) e centrifugadas a 20.000 *g* por 25 min, a 4 ^oC. Os sobrenadantes obtidos foram utilizados para a realização das análises bioquímicas. Por sua vez, amostras maceradas de raízes e folhas das plântulas de citros, obtidas de acordo com o item 2.2.4, foram liofilizadas e resuspensas, *overnight* a 4 ^oC, em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,0) acrescido de 1% PVPP na proporção 10 mL g^{-1} de tecido seco, centrifugadas a 20.000 *g* por 25 min a 4 ^oC e os sobrenadantes obtidos foram utilizados para a realização das análises bioquímicas. Além disso, para analisar a atividade da SOD e da CAT, amostras de 150 mg de raízes das plântulas de citros foram maceradas na presença de nitrogênio líquido, seguida pela adição de 1,5 mL de tampão de extração (tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,4); 0,1 mM EDTA; 1% PVPP). Após, o material foi centrifugado a 15.000 *g* por 10 min a 4 ^oC e o sobrenadante recolhido para a realização das análises.

2.2.9 Carboidratos

Para a análise de açúcares solúveis totais (AST), 500 µL de extrato (item 2.2.8) recebeu 500 µL de 5% fenol em água destilada e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado e foi agitado

cuidadosamente. Após 30 min de incubação a temperatura ambiente, a absorbância foi determinada a 490 nm e a concentração de AST determinada com base em uma reta padrão de glicose (DUBOIS et al., 1956). O conteúdo de açúcares redutores (AR) foi determinado pela adição de 1,5 mL de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico (1 g dissolvido em 20 mL 0,5 M HCl e após, adicionado 80 mL 0,5 M NaOH) em 500 µL de extrato (item 2.2.8), que foi incubado em banho-maria a 100 ^{o}C por 5 min. Após o resfriamento, foi determinada a absorbância a 410 nm e a concentração de AR determinada com base em uma reta padrão de glicose (LEVER, 1972). A determinação de açúcares não redutores (ANR) foi realizada de maneira indireta através do cálculo: ANR = AST - AR (RIBEIRO, 2006). Os resultados desses três grupos de açúcares foram expressos em equivalentes de mg de glicose g^{-1} de amostra.

Além disso, análises para quantificar glicose, frutose, sacarose e amido, presentes em plântulas de citros foram realizadas por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) junto ao Departamento de Ecologia da Universidade Técnica de Munique. Os açúcares solúveis foram extraídos seqüencialmente. Para isso, 15 mg de tecido seco de cada amostra (item 2.2.4) recebeu 1 mL (uma vez) e 0,5 mL (duas vezes) de água destilada aquecida a 60 ºC, sendo incubada por 10 min a 80 ºC e após cada período de incubação foi centrifugada a 10.000 *g* por 4 min. O sobrenadante foi transferido para tubo tipo eppendorf de 2 mL e após os períodos de incubação, foi centrifugado a 20.000 *g* por 5 min. Uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi filtrada através de membrana (0,45 µm) e mantida a - 25ºC até o momento da análise.

A extração do amido foi realizada com o precipitado obtido na extração dos açúcares solúveis, o qual recebeu 400 µL amilase (1.250 U mL^{-1}), foi incubado por 30 min a 60 ºC e centrifugado por 5 min a 10.000 *g*. O sobrenadante foi transferido para novo tubo tipo eppendorf de 2 mL, recebeu uma alíquota de 300 µL amiloglicosidase (3 U mL^{-1}) e incubado *overnight* a 37 ºC. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 20.000 *g* por 5 min e uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi filtrada através de membrana (0,45 µm) e mantida a - 25ºC até o momento da análise.

Os açúcares solúveis presentes em 20 µL de amostra foram analisados em HPLC equipado com uma coluna Aminex HPX-87C (BIORAD, Alemanha), mantida a 85 ºC e os valores registrados com o uso de um detector de índice refrativo. Como fase móvel foi usada água para HPLC e o fluxo foi de 0,6 ml min^{-1}, sendo o tempo de corrida de 20 min por amostra. A glicose

obtida pela degradação do amido foi analisada em 20 µL de amostra com coluna Aminex HPX-87N (Biorad, Alemanha) a 60 ºC e equipada com um detector de índice refrativo. A fase móvel foi composta por 20 mM H_2SO_4, o fluxo foi de 0,6 ml min^{-1} e tempo de corrida de 15 min (SCHLOTER et al., 2005). Os resultados foram expressos em mg açúcar g^{-1} de tecido seco.

2.2.10 Proteínas

O conteúdo de proteínas totais foi quantificado de acordo com Bradford (1976). Para tanto, 800 µL de extrato (item 2.2.8) recebeu 200 µL do reagente de Bradford. Após 5 min, a absorbância foi determinada a 595 nm. A concentração de proteínas foi expressa em equivalentes de mg de albumina de soro bovino (ASB) g^{-1} de amostra, que foi determinada com base em reta padrão de ASB.

2.2.11 Atividade da superóxido dismutase

A atividade da SOD foi determinada de acordo com Gupta et al. (1993), com adaptações, na qual 200 µL de extrato (item 2.2.8) foi acrescido a 1 mL de mistura de reação (tampão fosfato de potássio 5 mM (pH 7,4); 9,9 mM metionina; 57 µM azul de nitrotetrazolium (NBT); 0,025% triton X-100) e, por último, 100 µL de 44 mM riboflavina. Foi determinada a absorbância de cada amostra a 560 nm antes e após a incubação sob luz fluorescente por 20 min a 28 ºC. A atividade da SOD foi calculada de acordo com Asada, Takahashi e Nagate (1974), através da determinação da razão entre as absorbâncias de cada amostra. Nas condições do ensaio, uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a foto-redução do NBT e os resultados foram expressos em Unidades de SOD mg^{-1} de proteína.

2.2.12 Atividade da catalase

A mistura de reação para determinar a atividade de CAT foi composta por 1,45 mL de 0,036% H_2O_2 em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,8), sendo a reação iniciada pela adição de 50 µL de extrato (item 2.2.8). A redução da absorbância a 240 nm, resultante da degradação do

H_2O_2, foi monitorada por 1 min e os valores registrados a cada 6 s. Os resultados foram expressos em unidades de CAT mg^{-1} de proteína, sendo uma unidade correspondente à decomposição de 1 µmol de H_2O_2 por min nas condições do ensaio (BEERS; SIZER, 1952).

2.2.13 Atividade de quitinase

A atividade de quitinase foi avaliada pela liberação de fragmentos solúveis de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta (C*M-Chitin-RBV*). Para isso, 200 µL do extrato (item 2.2.8) foi misturado com 600 µL do tampão de extração e 200 µL do substrato *CM-Chitin-RBV* (4 mg mL^{-1}). Após incubação por 20 min a 40 ^oC, a reação foi paralisada com a adição de 200 µL de 1 M HCl, seguido de resfriamento e centrifugação por 5 min a 10.000 *g*. A absorbância do sobrenadante foi determinada a 550 nm. Os resultados foram expressos em Unidades de Absorbância a 550 nm min^{-1} mg^{-1} de proteína (STANGARLIN; PASCHOLATI; LABATE, 2000).

2.2.14 Atividade de β-1,3-glucanase

A determinação da atividade de β-1,3-glucanase presente em amostras de porta-enxertos foi determinada pela quantificação colorimétrica da glicose liberada do substrato laminarina, de acordo com Kombrink e Hahlbrock (1986). Para isso, 150 µL de extrato (item 2.2.8) recebeu 150 µL de 0,2% laminarina, dissolvida em tampão de extração antes (1) (glucanases hidrolisam laminarina liberam glicose) ou após (2) (glucanases não hidrolisam laminarina) o aquecimento a 37 ºC por 3 h. Após, a concentração de AR foi determinada de acordo com Lever (1972), de acordo como descrito no item 2.2.9. A concentração de AR de cada leitura de aborbância foi determinada com base em uma reta padrão de glicose e a quantidade de glicose liberada pela laminarina foi obtida com base na subtração: (1) - (2). Os resultados expressos em µg de glicose min^{-1} mg^{-1} de proteína.

Por sua vez, a determinação da atividade de β-1,3-glucanase presente em amostras de plântulas foi realizada de acordo com Guzzo e Martins (1996), pela quantificação da liberação de fragmentos solúveis de carboximetilcurdlan-remazol brilhante azul (*CM-curdlan-RBB*). Para isso,

200 µL de extrato (item 2.2.8) recebeu 600 µL do tampão de extração e 200 µL *CM-curdlan-RBB* (4 mg mL^{-1}). Após a incubação a 40 ºC por 4 h, a reação foi paralisada com a adição de 200 µL de 1 M HCl, seguida por resfriamento e centrifugação a 10.000 *g* por 5 min. A absorbância foi determinada a 600 nm e os resultados expressos em Unidades de Absorbância a 600 nm min^{-1} mg^{-1} de proteína.

2.2.15 Atividade da guaiacol peroxidase

A atividade da guaiacol peroxidase foi determinada espectrofotometricamente a 470 nm em uma mistura de reação que consistiu de 2,9 mL do tampão de reação (tampão fosfato de sódio 10 mM (pH 6), 2,3 mM guaiacol e 2,9 mM H_2O_2) e 0,1 mL de extrato (item 2.2.8), onde a guaiacol peroxidase converte o guaiacol em tetraguaiacol. A reação foi monitorada por 1 min, com as medidas de densidade óptica tomadas a cada 6 s. Os resultados foram expressos em Δ abs $_{470\ nm}$ min^{-1} mg^{-1} de proteína (RONCATO; PASCHOLATI, 1998).

2.2.16 Atividade de polifenoloxidase

A atividade da polifenoloxidase foi determinada pela conversão de catecol em quinona, onde 900 µL de 20 mM catecol em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,8) recebeu 100 µL de extrato (item 2.2.8). A reação foi monitorada por 1 min, com as medidas das absorbâncias registradas a cada 6 s a 420 nm e os resultados expressos em Δ abs $_{420\ nm}$ min^{-1} mg^{-1} de proteína (DUANGMAL, APENTEN, 1999).

2.2.17 Atividade de fenilalanina amônia-liase

A atividade da fenilalanina amônia-liase foi determinada pela quantificação do ácido *trans*-cinâmico liberado a partir da fenilalanina (UMESHA, 2006). Para isso,100 µL de extrato (item 2.2.8) recebeu 400 µL de tampão Tris-HCl 25 mM (pH 8,8) e 500 µL de 100 mM fenilalanina em tampão Tris-HCl 25 mM (pH 8,8), sendo incubado a 40 ºC por 4 h. Após, a reação foi paralisada com a adição de 60 µL 5M HCl, seguido de esfriamento. A absorbância foi

determinada a 290 nm e foi subtraída de cada amostra a absorbância do controle, composto por 100 µL do extrato e 900 µL de tampão Tris-HCl 25 mM (pH 8,8) aquecido a 40 ºC por 4 h e acrescido de 60 µL 5 M HCl. A concentração de ácido *trans*-cinâmico das amostras foi determinada com base em uma reta padrão de ácido *trans*-cinâmico e a atividade enzimática expressa em µg de ácido *trans*-cinâmico min^{-1} mg^{-1} de proteína.

2.2.18 Fenóis totais

Amostras de porta-enxerto de citros, obtidas de acordo com o item 2.2.3, foram trituradas na presença de nitrogênio liquido e liofilizadas em centrífuga a vácuo *SpeedVac* por 6 h. Em seguida, 30 mg de cada amostra foi transferida para tubo tipo eppendorf de 2 mL, acrescida de 1,5 mL de metanol 80% e agitada em agitador rotativo *overnight*, protegido da luz e a temperatura ambiente. Após, o extrato metanólico foi centrifugado a 12.000 *g* por 5 min e o sobrenadante foi transferido para novo tubo. O precipitado foi mantido a - 25 ºC para a determinação de lignina. Por sua vez, para a quantificação dos compostos fenólicos solúveis totais, 150 µL do extrato metanólico recebeu 150 µL do reagente Folin-Ciocalteau 0,25 N e foi mantido a temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, acrescentou-se 150 µL de 1 M Na_2CO_3, sendo a mistura homogeneizada e incubada por 10 min a temperatura ambiente. A seguir, a mistura recebeu 1 mL de água destilada e deionizada e foi mantida a temperatura ambiente por uma hora. A absorbância foi determinada a 725 nm e a concentração de fenóis totais determinada com base em uma reta de catecol, sendo os valores expressos em mg de catecol g^{-1} de tecido seco (RODRIGUES et al., 2005).

2.2.19 Lignina

Um volume de 1,5 mL de água destilada foi adicionado ao precipitado proveniente da centrifugação do item 2.2.18, seguido de homogeneização e centrifugação a 12.000 *g* por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco a 60 ºC *overnight*. Em seguida, o precipitado recebeu 1,5 mL de solução composta por ácido tioglicólico e 2 M HCl (1:10 v/v), sendo homogeneizado e incubado em banho-maria a 100 ºC por 4 h. Após, o tubo foi esfriado em gelo

por 10 min e centrifugado a 12.000 *g* por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1,5 mL de água destilada e deionizada e centrifugado a 10.000 *g* por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado recebeu 1,5 mL 0,5 M NaOH. A mistura foi homogeneizada em agitador rotativo *overnight*, seguida de centrifugação a 10.000 *g* por 10 min. O sobrenadante foi transferido para novo tubo, acrescido de 200 µL HCl concentrado e mantido a 4 ºC sob escuro por 4 h. A seguir, a mistura foi centrifugada a 10.000 *g* por 10 min, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspenso em 2 mL de 0,5 M NaOH. A absorbância foi determinada a 280 nm e a concentração de lignina determinada com base em uma reta padrão de lignina, sendo os resultados expressos em mg de lignina g^{-1} de tecido seco (RODRIGUES et al., 2005).

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Seleção do isolado de *Phytophthora nicotianae*

Pode-se observar na Figura 2 que o isolado LRS 01/06 foi o mais agressivo ao limão Gênova ($P < 0,05$). O tamanho médio das lesões provocadas pelo referido isolado foi pelo menos 1,8 vezes maior que o tamanho médio das lesões provocadas pelos outros isolados. Em vista disso, o mesmo foi utilizado para a realização dos experimentos que envolveram aspectos fisiológicos, bioquímicos e moleculares das interações estudadas.

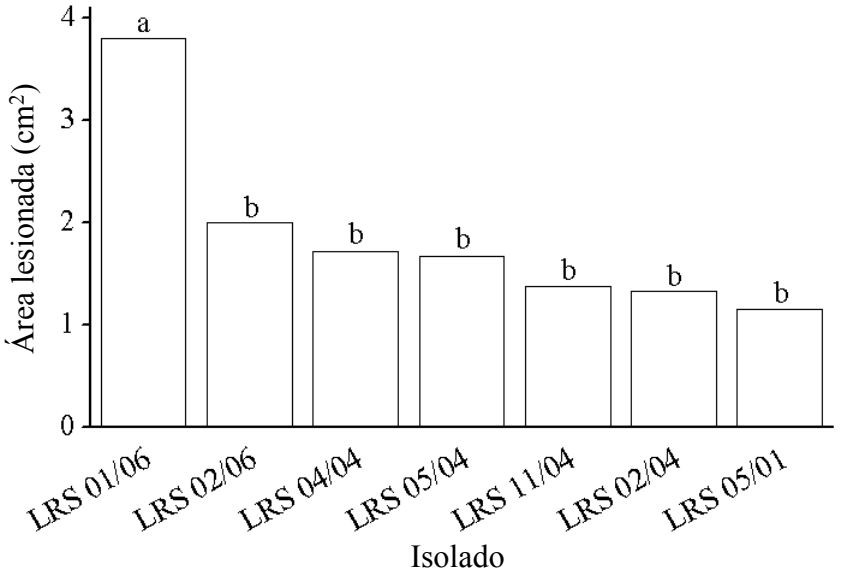

Figura 2 - Área média de lesões provocadas por diferentes isolados de *Phytophthora nicotianae* em plantas de limão Gênova enxertadas sobre limão Volkameriano 44 dias após a inoculação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

Essa diferença de virulência entre isolados de *P. nicotianae* também já foi relatada por outros autores. A inoculação de diferentes isolados de duas espécies de *Phytophthora* em plantas de pimentão, cultivar Califórnia Wonder, mostrou que, entre os isolados de *P. nicotianae*, Png 1, Png 5 e Png 7 foram os mais agressivos, porém não foram verificadas diferenças de virulência entre os isolados de *P. capsici* (ANDRÉS; RIVERA; FERNÁNDEZ, 2003). Csinos e Beltrand (1994) estudaram os sintomas provocados por 32 isolados de *P. parasitica* var. *nicotianae* em quatro cultivares de fumo. Os autores verificaram que a cultivar K326 era a mais suscetível ao patógeno e 371 Gold e Line 1071 eram as mais resistentes. Além disso, os isolados 287, 288 e 289 de *P. parasitica* var. *nicotianae* foram os mais agressivos e os isolados 284, 296, 301 e 304 foram os menos agressivos.

Os isolados D54S e S-BLK-8 de *P. nicotianae* provocaram podridão em 17% e 33% do sistema radicular de plântulas de laranja Doce, respectivamente, o que mostrou que o segundo isolado era mais agressivo do que o primeiro (TIMMER; GRAHAM; ZITKO, 1998). Em outro estudo envolvendo interação citros - *P. nicotianae*, foi verificado que o isolado Pn117 provocou menor infecção de raízes e redução da biomassa do sistema radicular do que os isolados Pn198 e

Pn99 em diferentes porta-enxertos (COLBURN, 2004). Esse autor também verificou expressão de gene relacionado a defesa em plântulas de laranja Azeda tratadas com os ácidos salicílico e jasmônico ou inoculados com o isolado Pn117. Porém, não foi verificado e expressão nas plântulas inoculadas com os isolados P198 e Pn99.

Da mesma maneira, a diferença de agressividade entre os isolados de *P. nicotianae* estudados neste trabalho pode ser devida a expressão diferenciada de genes relacionados a defesa dos porta-enxertos. Porém, não se pode descartar a hipótese de que o isolado LRS 01/06 tem maior quantidade de genes de virulência que codificam, por exemplo, toxinas ou enzimas degradadoras de parede celular.

2.3.2 Avaliação da troca gasosa e do sistema radicular

O patógeno foi detectado em todos os porta-enxertos inoculados, porém o mesmo estava ausente nas plantas controle, evidenciando que a inoculação foi bem sucedida e que os controles estavam livres de *P. nicotianae* (dados não mostrados).

Os porta-enxertos de tangerina Sunki inoculados com *P. nicotianae* apresentaram redução na massa do sistema radicular a partir do quarto mês após a inoculação ($P < 0,05$) (Figuras 3 e 4), bem como redução na taxa fotossintética e condutância estomática a partir do quinto mês após a inoculação ($P < 0,05$) (Figura 5). Também foi observado que a transpiração média de tangerina Sunki inoculada, a partir do quinto mês após a inoculação, foi 46% menor do que as plantas controle. Por outro lado, porta-enxertos de citrumelo Swingle não apresentaram alterações nesses parâmetros (Figura 5).

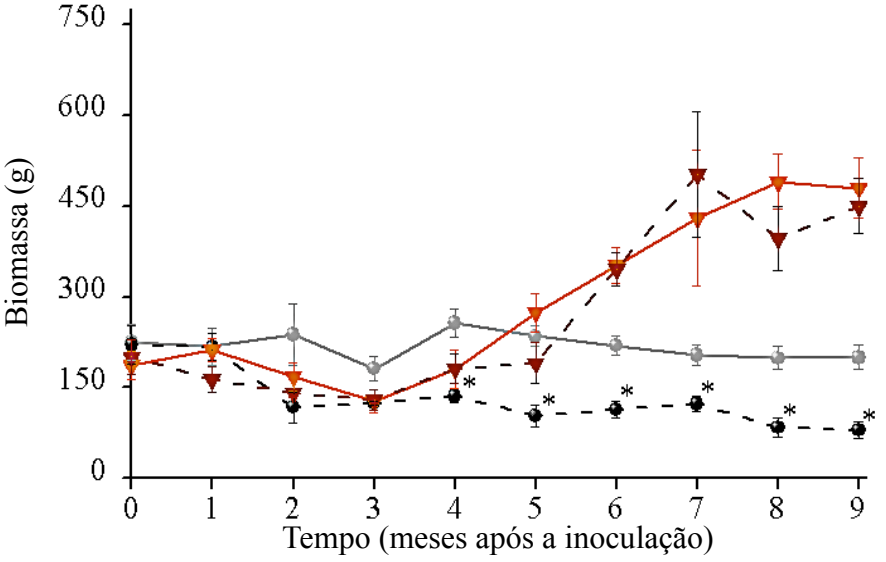

Figura 3 - Massa fresca do sistema radicular de porta-enxertos de citros inoculados com *Phytophthora nicotianae*. = Tangerina Sunki controle; = Tangerina Sunki inoculada; = Citrumelo Swingle controle; = Citrumelo Swingle inoculado. Barras indicam a média ± erro padrão (n = 6). * Indica diferença estatística a 5% pelo teste de Tukey

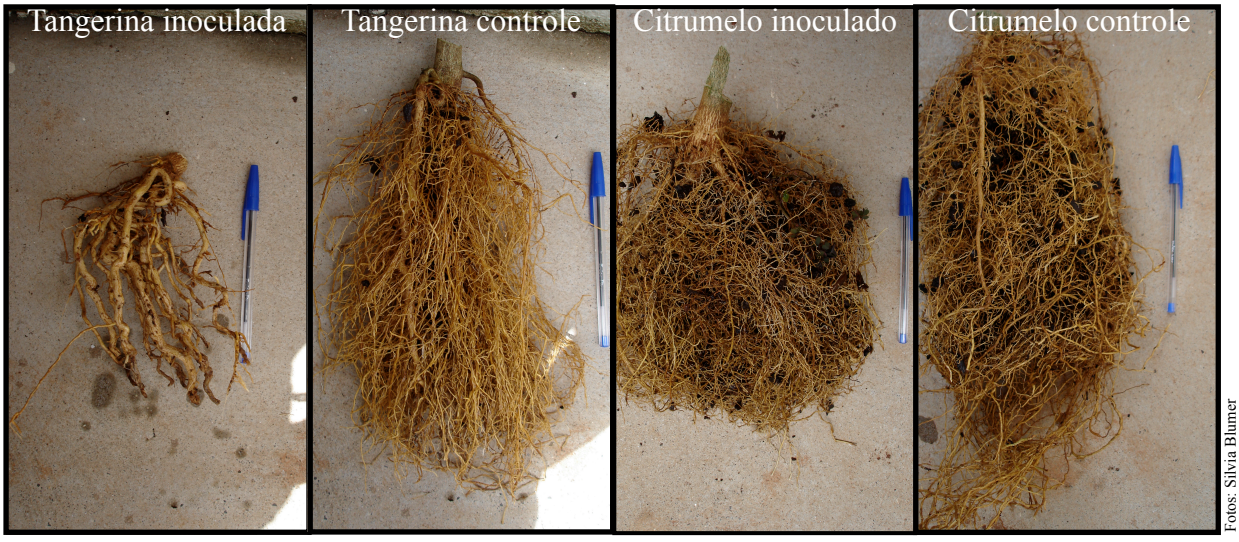

Figura 4 - Sistemas radiculares de porta-enxertos de citros 9 meses após a inoculação de *Phytophthora nicotianae*

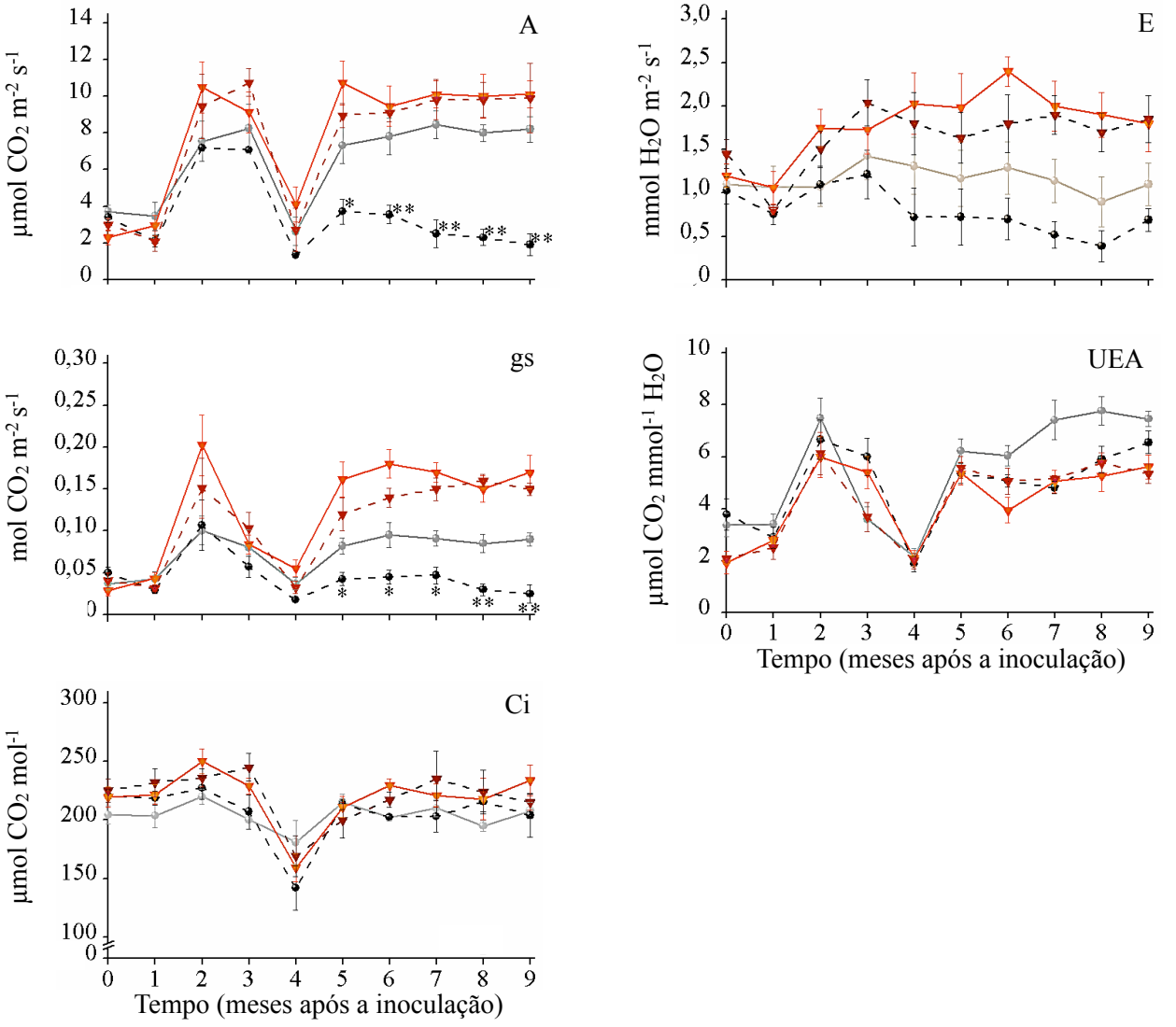

Figura 5 - Fotossíntese (A), condutância estomática (gs), concentração interna de CO_2 (Ci), transpiração (E) e uso eficiente da água (UEA) em porta-enxertos de citros inoculados com *Phytophthora nicotianae*. —●— = Tangerina Sunki controle; - -●- · = Tangerina Sunki inoculada; —▼— = Citrumelo Swingle controle; - -▼- · = Citrumelo Swingle inoculado. Barras indicam a média ± erro padrão (n = 6). * Indica diferença estatística a 5% e ** a 1% pelo teste de Tukey

O experimento que envolveu plântulas de citros apresentou resultados semelhantes, pois *P. nicotianae* reduziu a taxa fotossintética, a condutância estomática e a transpiração apenas de tangerina Sunki 5 dias após a inoculação ($P < 0,05$) (Figura 6). Além disso, também foi verificado que o consumo de água dessas plantas foi reduzido ($P < 0,05$) 5 dias após a inoculação (Figura 6). Análises visuais indicaram que o sistema radicular de plântulas de tangerina Sunki também foi mais afetado por *P. nicotianae do* que o de citrumelo Swingle (Figura 7).

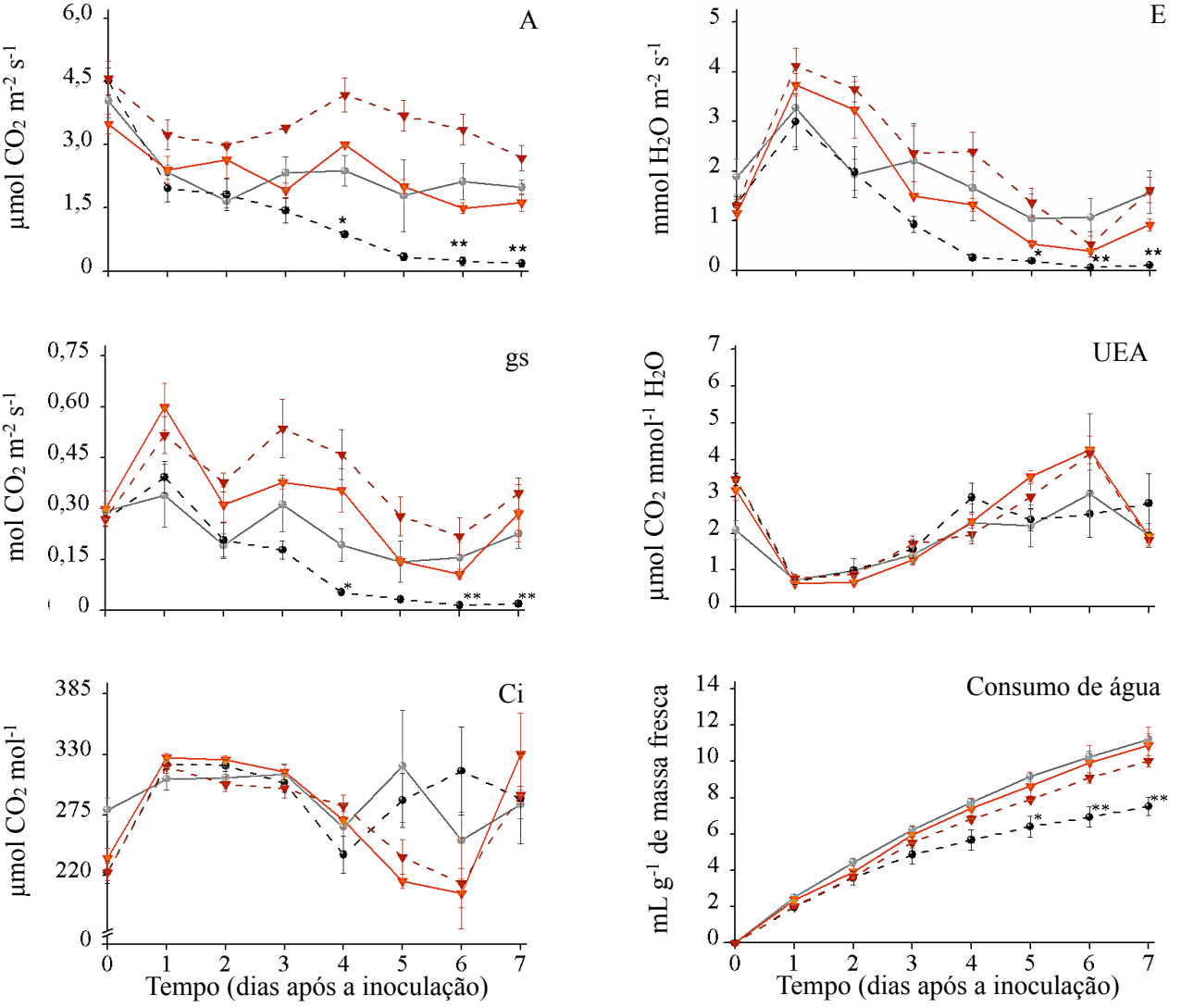

Figura 6 - Fotossíntese (A), condutância estomática (gs), concentração interna de CO_2 (Ci), transpiração (E), uso eficiente da água (UEA) e consumo de água em plântulas de citros inoculados com *Phytophthora nicotianae*. —●— = Tangerina Sunki controle; - -●- - = Tangerina Sunki inoculada; —▼— = Citrumelo Swingle controle; - -▼- - = Citrumelo Swingle inoculado. Barras indicam a média ± erro padrão (n = 5). * Indica diferença estatística a 5% e ** a 1% pelo teste de Tukey

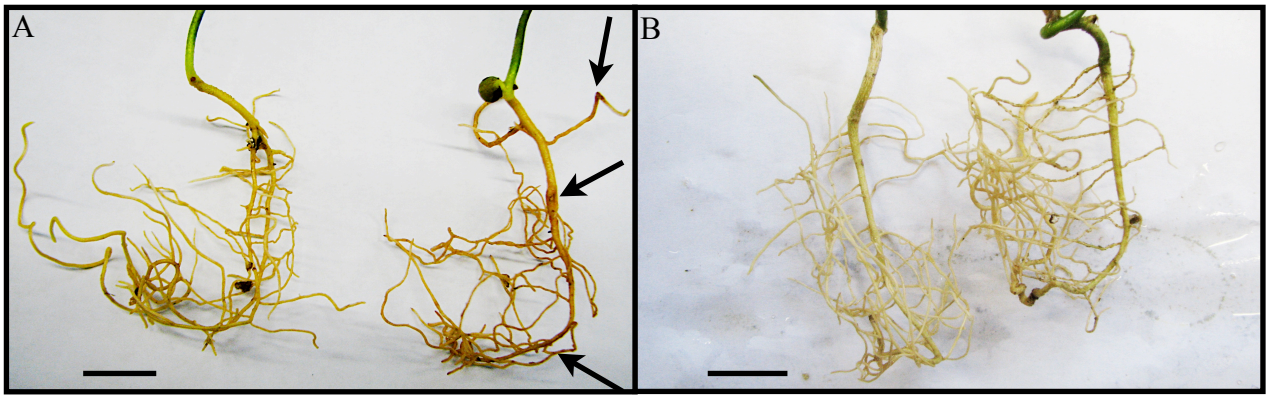

Figura 7 - Efeito de *Phytophthora nicotianae* no sistema radicular de plântulas de tangerina Sunki (A) e citrumelo Swingle (B) 7 dias após a inoculação. Raízes à direita foram inoculadas; controles não inoculados estão à esquerda. Barra = 1 cm. Setas indicam sintomas de *P. nicotianae* nas raízes

Um do sintomas de *P. nicotianae* em citros é a podridão de raízes. Nas Figuras 3 e 4 observa-se que porta-enxertos de citrumelo Swingle e tangerina Sunki são resistente e suscetível, respectivamente, a podridão de raízes provocada por *P. nicotianae*. Diversos autores já mostraram essa diferença de reação entre diferentes porta-enxertos inoculados com esse patógeno (ALVAREZ et al., 2009; FOURIE, 2004; MATHERON; WRIGHT; PORCHAS, 1998; MEDINA FILHO et al.; 2004; ZITKO; TIMMER; SANDLER, 1991). Além disso, outras espécies lenhosas também apresentam reações diferentes a *Phytophthora* spp. *P. cinnamomi* provocou maior podridão de raízes, murcha mais severa e a morte de maior número de plantas de *Quercus ilex* do que *Quercus rubra* quatro meses após a inoculação (ROBIN; CAPRON; DESPREZ-LOUSTAU, 2001). Kellam e Coffey (1985) verificaram que *P. cinnamomi* reduziu os sistemas radiculares dos porta-enxertos de abacate Topa Topa, G6 e Duke 7 em 81%, 36,3% e 16,1%, respectivamente, 20 semanas após a inoculação.

Por sua vez, análises visuais sugerem que os sintomas de podridão provocados por *P. nicotianae* também foram mais severos em plântulas de tangerina Sunki de que em citrumelo Swingle, como ilustrado na Figura 7, mostrando mais uma vez a diferença entre o nível de resistência entre os dois porta-enxertos estudados. Fourie (2004) avaliou os sintomas de podridão de raízes provocados por *P. nicotianae* em diferentes porta-enxertos de citros mantidos em sistema hidropônico após a inoculação. Ele verificou que os limões Rugoso e Volkameriano foram os porta-enxertos mais suscetíveis; citranges Carrizo e C35 apresentaram resistência moderada; e

citrange Troyer, *C. macrophylla*, citrumelo Swingle e laranja Azeda foram os porta-enxertos mais resistentes. Segundo esse mesmo autor, a remoção das raízes do substrato, seguida pela lavagem das mesmas, provoca ferimentos, que juntamente com a água livre presente em sistema hidropônico, favoreceu a infecção de raízes pelos zoósporos.

Na Figura 5 observa-se que os menores valores de fotossíntese, condutância estomática e uso eficiente da água foram obtidos 0, 1 e 4 meses após a inoculação, que correspondem aos meses de maio, junho e setembro de 2007, respectivamente, que apresentaram baixa precipitação (ANEXO A). Em julho de 2007 houve um grande volume de chuvas, o que pode ter favorecido a troca gasosa. É importante lembrar que durante o experimento, os porta-enxertos estavam plantados em recipientes de 4,5 L e foram irrigados 3 ou 4 vezes por semana. Aparentemente, a quantidade de água armazenada no substrato não foi suficiente para manter as taxas de fotossíntese, condutância estomática, concentração interna de CO_2 e uso eficiente da água. Da Silva et al. (2005) e Ribeiro (2006) também verificaram que plantas de citros têm a troca gasosa prejudicada em períodos de baixa disponibilidade hídrica. Além disso, temperaturas baixas também pode influenciar esses parâmetros (RIBEIRO, 2006). Porém, em julho e agosto de 2007, 2 e 3 meses após a inoculação, nos quais a temperatura média foi de 17 e 19,5 ^{o}C (ANEXO A), respectivamente, os porta-enxertos mostraram valores de troca gasosa semelhantes aos obtidos durante o verão (Figura 5), onde a temperatura média alcançou valores superiores a 22 ^{o}C.

Em suas análises, Ribeiro (2006) verificou que em junho de 2005 houve volume de chuvas maior do que 100 mm e temperaturas médias de aproximadamente 20 ^{o}C. Nessas condições, a taxa média de fotossíntese, condutância estomática, transpiração e CO_2 interno em laranjeira Valência foram 10 μmol CO_2 m^{-2} s^{-1}; 0,12 mmol CO_2 m^{-2} s^{-1}; 3 mmol H_2O m^{-2} s^{-1} e 250 μmol CO_2 mol^{-1}, respectivamente, valores comparáveis aos obtidos neste trabalho (Figura 5). Segundo esse mesmo autor, o aumento repentino da disponibilidade hídrica no solo e baixas temperaturas noturnas poderiam explicar a abertura dos estômatos, que levou a maiores taxas de fotossíntese, transpiração e concentração interna de CO_2. Brakke e Allen Júnior (1995) também verificaram que o estresse hídrico proporcionou redução na taxa de fotossíntese em plântulas de citrumelo Swingle e de citrange Carrizo.

Plantas de tangerina Sunki inoculadas com *P. nicotianae* apresentaram redução da condutância estomática, fotossíntese, consumo da água e transpiração (Figuras 5 e 6). De acordo

com Nobel (1999) menores aberturas estomáticas levam a redução na transpiração, que aumenta a temperatura dos tecidos e afeta a fotossíntese. Ademais, a regulação estomática da transpiração representa um mecanismo de preservação de água em situações de baixa disponibilidade hídrica (MEDINA; MACHADO; GOMES, 1999). Outro ponto a se destacar é que a condutância estomática apresentou padrão similar ao da fotossíntese, sugerindo que a queda da fotossíntese foi em virtude do fechamento dos estômatos.

Não foi verificado alteração no uso eficiente da água ($P > 0,05$) (Figuras 5 e 6), dessa maneira, a redução da condutância estomática, provocada por *P. nicotianae* em tangerina Sunki, alteou de maneira proporcional a quantidade de carbono assimilada e de água perdida na forma de transpiração. Por outro lado, a concentração interna de CO_2 não foi alterada ($P > 0,05$) em plantas de tangerina Sunki inoculadas com *P. nicotianae* (Figuras 5 e 6), ou seja, a quantidade de CO_2 consumida pela fotossíntese era praticamente a mesma que penetrava na folha. É importante lembrar que a movimentação estomática tem o objetivo de manter a concentração interna de CO_2 aproximadamente constante (WONG; COWAN; FARQUHAR, 1979).

P. aphanidermatum provocou redução no consumo de água e na taxa de fotossíntese em plantas de pimentão 3 dias após a inoculação (JOHNSTONE et al., 2005). Fleischmann et al. (2005) mostraram que plântulas de faia (*Fagus sylvatica*), inoculadas com *P. citricola*, sofreram redução na taxa fotossintética e na condutância estomática dois dias após a inoculação, enquanto que o consumo de água foi afetado seis dias após a inoculação. Além disso, *P. cinnamomi* reduziu a taxa fotossintética, transpiração e condutância estomática de plântulas de abacate uma semana após a inoculação (PLOETZ et al., 1989). Por sua vez, Clemenz et al. (2008) mostraram que *Alnus glutinosa* inoculadas com *Phytophthora alni* apresentaram menor taxa de fotossíntese e de transpiração quatro meses após a inoculação. Esses autores verificaram uma pequena mudança no uso eficiente da água e na concentração interna de CO_2. Plantas de *C. sativa* irrigadas e inoculadas com *P. cinnamomi* apresentaram redução na transpiração e na condutância estomática (MAUREL et al., 2001). Além disso, castanheiras naturalmente infectadas com *P. cinnamomi* tiveram a condutância estomática, transpiração, fotossíntese e o uso eficiente da água afetados pelo patógeno (GOMES-LARANJO et al., 2004). Estudos envolvendo plantas de um ano de duas espécies de carvalho, *Q. ilex* (suscetível) e *Quercus suber* (mediamente resistente), mostraram que a condutância estomática dessas plantas foi reduzida por *P. cinnamomi* 19 e 37 dias após a

inoculação, respectivamente. Porém, em plantas com dois anos, a condutância estomática de *Q. ilex* foi reduzida pelo patógeno dois meses após a inoculação (ROBIN; CAPRON; DESPREZ-LOUSTAU, 2001).

Portanto, os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que *P. nicotianae* primeiramente danificou o sistema radicular de tangerina Sunki (Figura 3), o que comprometeu a absorção de água e o balanço hídrico, levando ao fechamento estomático, que por sua vez, limitou a fotossíntese e a transpiração (Figura 5).

2.3.3 Detecção e quantificação de *P. nicotianae* em raízes de plântulas de citros

Em fitopatologia, a quantificação correta de doenças é muito importante. Os parâmetros de interesse são: incidência - freqüência de plantas doentes; severidade - a área ou volume de tecido atacado; perda - proporção da produção que não será colhida devido ao ataque de patógenos (AGRIOS, 2005). Além disso, foram desenvolvidas técnicas para se quantificar a biomassa de fungos presentes no tecido vegetal, através da detecção de ergosterol ou quitina (GARDNER et al., 1993; PLASSARD; MOUSAIN; SALSAC, 1982), no entanto, essas análises não são específicas. Por sua vez, a PCR, com o uso de *primers* específicos consegue quantificar o DNA de patógenos de interesse no tecido de plantas hospedeiras. A PCR quantitativa difere da PCR clássica pela quantificação do produto amplificado a cada ciclo de reação. Assim, o resultado é independente do platô que corresponde à saturação da reação e que leva a quantificação equivocada (GACHON; MINGAM; CHARRIER, 2004). Ele pode ser usado na detecção de fungos (HUGHES; ATALLAH; GRAU, 2009) bactérias (FRANCIS et al., 2006), vírus (MANSON et al., 2008) ou nematóides (BERRY et al., 2008).

A medida da eficiência da PCR quantitativa é dada pela equação: $E = 10^{1/-a} - 1$, na qual "a" representa a inclinação de uma reta padrão, construída a partir de diluições de uma amostra com concentração conhecida. O valor de "a" igual a - 3,32 indica que a eficiência da reação da PCR quantitativa é 100% e a eficiência do PCR deve ser no mínimo 90% (GINZINGER, 2002). No presente trabalho, o valor da inclinação da curva, dependendo da corrida, variou de -3,33 a -3,10, ou seja, a eficiência da PCR quantitativa variou de 99% a 110%. Além disso, o coeficiente de correlação varou de 0,995 a 0,999. Na Figura 8, pode-se observar uma curva padrão, construída a

partir de DNA extraído de micélio de *P. nicotianae* e amplificado com o par de *primers* ITS3/ PNIC1. A inclinação da reta foi igual a -3,252 e o coeficiente de correlação de 0,996. Outros pesquisadores também verificaram e validaram dados de PCR quantitativa com eficiência superior a 100% (GACHON; SAINDRENAN, 2004; HAMALAINEN et al., 2001; PERSSON; HAMBY; UGOZZOLI, 2005). De acordo com Ishii, Sootome e Yamashita (2007) os valores de "a" devem estar entre -3,1035 e -3,7762 e o coeficiente de correlação maior do que 0,995.

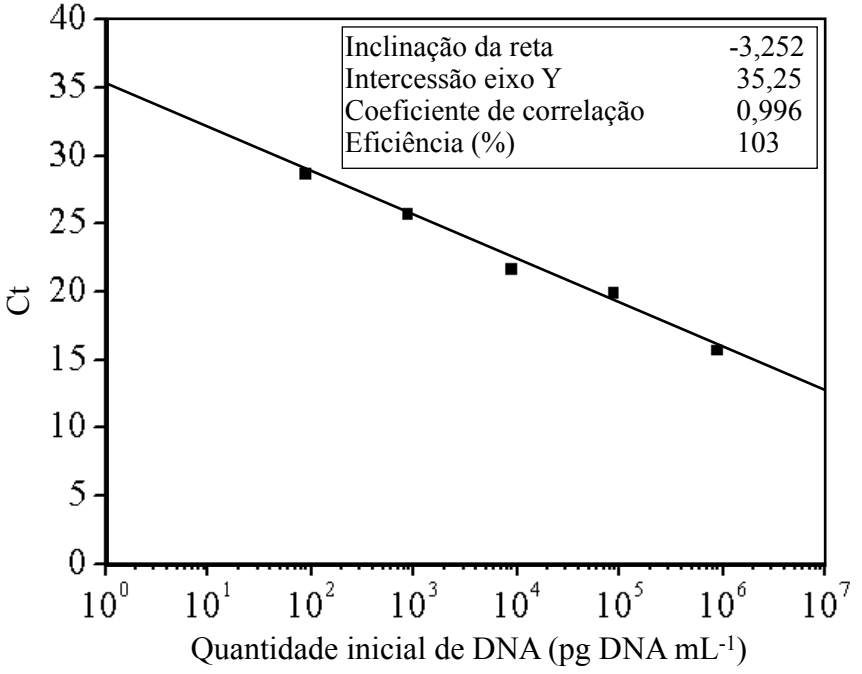

Figura 8 – Reta padrão de uma diluição em série do genoma de *Phytophthora nicotianae* amplificado com o par de *primers* ITS3/PNIC1 e quantificado em PCR quantitativa

O valor da fluorescência em Ct (*cycle threshold*) é definido como o número de ciclos necessários para alcançar o limiar de detecção da fluorescência (GACHON; SAINDRENAN, 2004). O número de ciclos que a fluorescência de cada amostra alcança o Ct, é inversamente proporcional ao número de cópias do ácido nucléico alvo presente na mesma. Então, o Ct de cada amostra é utilizado para quantificar a concentração de DNA, usando uma reta padrão, gerada a partir de DNA padrão, que é amplificado na mesma corrida da PCR quantitativa (ORLANDO; PINZANI; PAZZAGLI, 1998). O DNA extraído a partir de raízes de plântulas sadias de tangerina Sunki e de citrumelo Swingle sadios apresentaram Ct iguais a 34 e 36, respectivamente (dados

não apresentados), enquanto que o controle água destilada tratada com DEPC apresentou Ct igual a 38 (dados não apresentados). Com base nesses resultados, plântulas de tangerina Sunki e de citrumelo Swingle que apresentaram Ct inferior a 34 e 36, respectivamente, foram consideradas infectadas por *P. nicotianae*.

Os resultados mostraram que a quantidade média de DNA de *P. nicotianae* em raízes de citrumelo Swingle foi 2,7 e 3,1 vezes menor do que em raízes de tangerina Sunki 4 e 7 dias após a inoculação, respectivamente. Porém, em virtude da colonização heterogênea do patógeno nas raízes das plântulas, não foi verificada diferença estatística (Figura 9). Por outro lado, Fourie (2004) analisou os sintomas provocados por *P. nicotianae* em diferentes porta-enxertos de citros mantidos em sistema hidropônico ou substrato infestado. O sistema hidropônico proporcionou sintomas mais homogêneos entre as repetições de todos os porta-enxertos estudados. Segundo o autor, a existência de água livre e de ferimentos, provocados durante a lavagem das raízes, favoreceram a infecção por zoósporos do patógeno em sistema hidropônico.

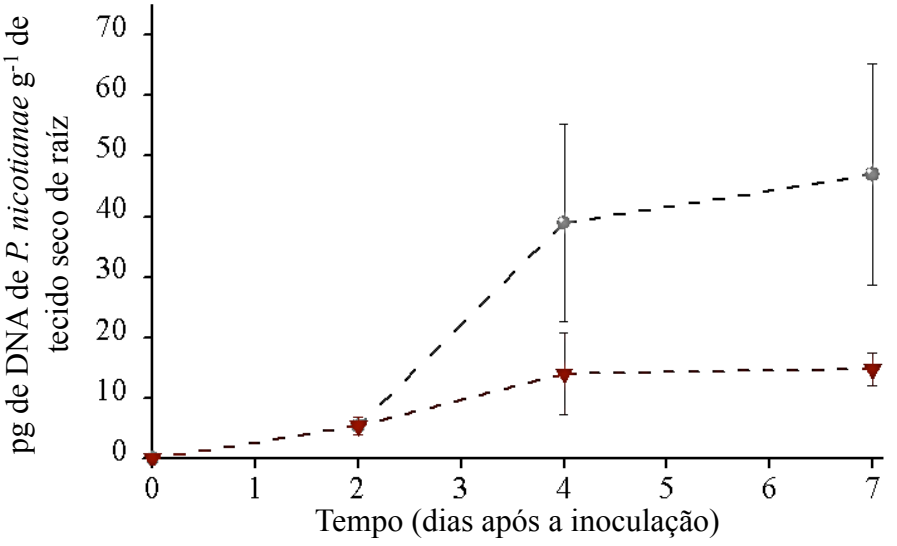

Figura 9 - Colonização de *Phytophthora nicotianae* em raízes de plântulas de citros determinada pela quantificação do DNA do patógeno nos tecidos do hospedeiro, detectada por PCR quantitativa. = Tangerina Sunki; = Citrumelo Swingle. Barras indicam a média ± erro padrão (n = 9)

Apesar das raízes de plântulas de tangerina Sunki exibirem visualmente sintomas mais severos da doença do que raízes de plântulas de citrumelo Swingle (Figura 7), não foi possível separar o genótipo resistente do suscetível com base na colonização do sistema radicular. Essa diferença já foi relatada por diversos pesquisadores. Em plantas de pimentão, cultivares Padron e

Yolo Wonder (suscetíveis), a concentração de DNA de *P. capsici* diferiu das cultivares resistente (PI201234 e SCM331) 72 h após a inoculação (SILVAR; DÍAZ; MERINO, 2005). A concentração de DNA de *Phytophthora medicaginis* no cultivar Saranac (suscetível) de alfafa foi pelo menos sete vezes maior do que na cultivar WAPH-1 (resistente) 15 dias após a inoculação (VANDEMARK; BARKER, 2003). Porém, não foi possível relacionar a colonização por *Verticillium albo-atrum* com o nível de resistência das cultivares de alfafa (LARSEN et al., 2007). Segundo esses autores, isso ocorreu porque as plantas utilizadas no experimento foram representadas por uma cultivar resistente, que inibe o crescimento do patógeno, e outra tolerante, na qual o patógeno cresce, mas não provoca sintomas severos.

2.3.4 Etileno

É possível observar na Figura 10 que plântulas de tangerina Sunki apresentaram aumentos de cinco e sete vezes na produção de etileno, seis e sete dias após a inoculação, respectivamente. Por outro lado, não foram verificadas diferenças na produção de etileno em plântulas de citrumelo Swingle inoculadas com *P. nicotianae* (P > 0,05).

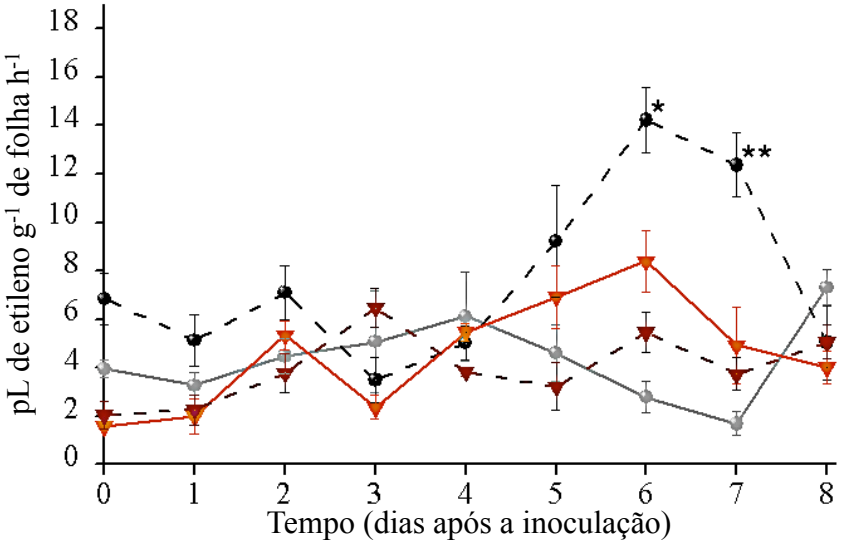

Figura 10 - Produção de etileno em plântulas de citros inoculadas com *Phytophthora nicotianae*. —●— = Tangerina Sunki controle; - -●- - = Tangerina Sunki inoculada; —▼— = Citrumelo Swingle controle; - -▼- - = Citrumelo Swingle inoculado. Barras indicam a média ± erro padrão (n = 6). * Indica diferença estatística a 5% e ** a 1% pelo teste de Tukey

O papel do etileno nas relações planta-patógeno é complexo, pois ele pode ser requerido na resposta de defesa (KNOESTER et al., 1998; KNOESTER et al., 2001) ou pode estar envolvido no desenvolvimento de sintomas (BARMORE; BROWN, 1985; ORTUÑO et al., 2008; GERAATS et al.,2003). Como não foram verificadas alterações na síntese de etileno em citrumelo Swingle, pode-se sugerir que esse fitohormônio não esta relacionado com a ativação de mecanismos de defesa dessas plantas contra *P. nicotianae*.

O etileno está envolvido na expressão de sintomas em citros atacado por diferentes patógenos, como *Colletotrichum acutatum* (LAHEY et al., 2004), *D. natalensis* (BARMORE; BROWN, 1985), *A. alternata* pv. *citri* (ORTUÑO et al., 2008), *X. campestris* pv. c*itri* (DUTTA; BIGGS, 1991). Porém, esse hormônio esta relacionado com a resistência de frutos de laranja Navelate a *P. digitatum* (MARCOS; GONZÁLEZ-CANDELAS; ZACARÍAAS, 2005). Ele também é importante no desenvolvimento de sintomas causados por diferentes patógenos de raízes, como, *V. albo-atrum* em algodoeiro (WIESE; DeVAY, 1970), *F. oxysporum* em *A. thaliana* (BAE et al., 2006), *Verticillium dahliae* em cacaueiro (RESENDE; FLOOD, COOPER, 1996). No entanto também está envolvido na resistência de fumo e *A. thaliana* contra *Pythium* spp. (GERAATS, BAKKER, VAN LOON, 2002) e de trigo a *Fusarium graminearum* (LI; YEN, 2008).

Em interações *Phytophthora* spp. - plantas lenhosas, Manter, Kelsey e Karchesy (2007) verificaram que a elicitina purificada de *Phytophthora ramorum* induziu a síntese de etileno em rododendro (*Rhododendron macrophyllum*), *Lithocarpus densiflorus* e louro da Califórnia (*Umbellularia californica*). Além disso, *P. citricola* estimulou a produção de etileno em plantas de faia dois dias após a inoculação (PORTZ et al., 2007).

A Figura 6 mostra que o consumo da água e a transpiração de plântulas de tangerina Sunki inoculadas com *P. nicotianae* foram reduzidos a partir do quinto dia após a inoculação ($P < 0,05$). Por sua vez, a Figura 10 mostra que nessas plantas a produção de etileno aumentou a partir do sexto dia após a inoculação ($P < 0,05$), ou seja, um dia após o balanço hídrico ter sido alterado. É importante lembrar que em plantas sob estresse hídrico a produção de etileno é estimulada (BELTRANO; RONCO; MONTALDI, 1999; EL-BELTAGY; HALL, 1974). Ademais, os sintomas de estresse hídrico, como abscisão de folhas e flores, epinastia, redução do crescimento de brotos e aceleração da senescência, também são respostas típicas de plantas tratadas com

etileno, indicando que o estresse hídrico e a produção desse hormônio podem estar conectados (EL-BELTAGY; HALL, 1974).

Com o uso de técnicas moleculares, Balaji et al. (2008) mostraram que o desenvolvimento de sintomas de murcha em plantas de tomate, causados por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, é dependente do aumento da produção de etileno nas plantas doentes. Resende et al. (1996) também verificaram que plântulas de cacau inoculadas com *V. dahliae*, isolado BA-3, apresentaram primeiramente redução na transpiração, condutância estomática, potencial de água da folha, seguido de aumento na produção de etileno. *F. oxysporum* f. sp. *cubense* também depende do etileno para produzir goma em xilema de plantas de mamona, que é responsável pelos sintomas de murcha (VANDERMOLEN et al., 1983). Dessa maneira, o desbalanço hídrico provocado por *P. nicotianae* em plântulas de tangerina Sunki, pode ter estimulado a produção de etileno.

2.3.5 Carboidratos

Não foram observadas alterações nas concentrações de açúcares redutores, não redutores e totais em folhas de porta-enxertos e de plântulas inoculados com *P. nicotianae* ($P > 0,5$) (Figuras 11 e 12). Por outro lado, alterações no teor de açúcares foram mais evidentes nos sistemas radiculares. Porta-enxertos de citrumelo Swingle inoculados com *P. nicotianae* apresentaram redução na concentração de açúcares solúveis totais e de açúcares redutores três e cinco meses após a inoculação ($P < 0,05$). Por sua vez, *P. nicotianae* reduziu a concentração de açúcares totais em porta-enxertos de tangerina Sunki a partir do terceiro mês após a inoculação, bem como de açúcares redutores três e cinco meses após a inoculação, e de açúcares não redutores três, quatro, seis, oito e nove meses após a inoculação ($P < 0,05$) (Figura 11).

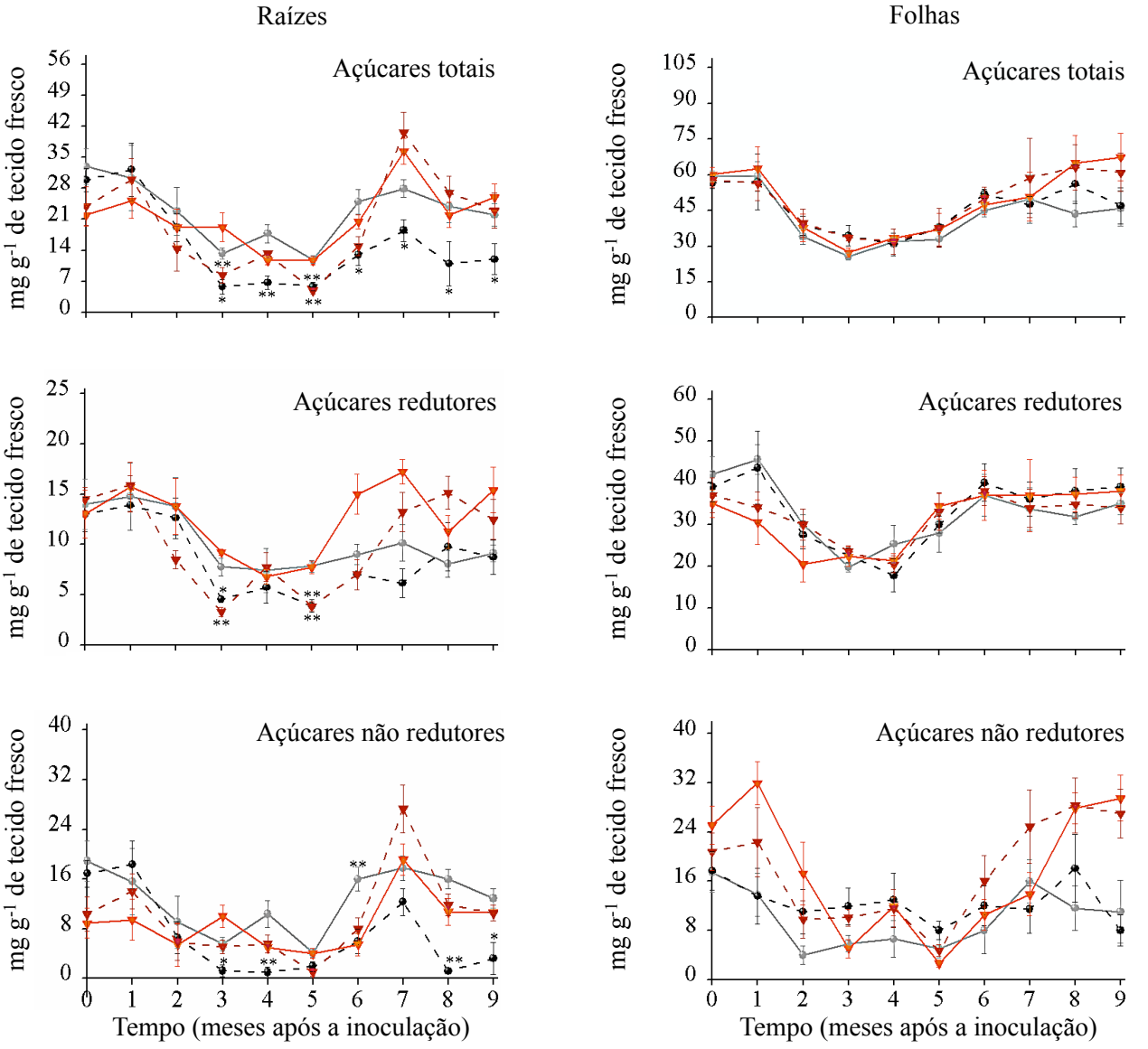

Figura 11 - Concentração de açúcares em porta-enxerto de citros inoculados com *Phytophthora nicotianae*. = Tangerina Sunki controle; = Tangerina Sunki inoculada; = Citrumelo Swingle controle; = Citrumelo Swingle inoculado. Barras indicam a média ± erro padrão (n = 6). * Indica diferença estatística a 5% e ** a 1% pelo teste de Tukey

Por outro lado, raízes das plântulas não apresentaram alterações na concentração de açúcares durante o período estudado (P > 0,05) (Figura 12).

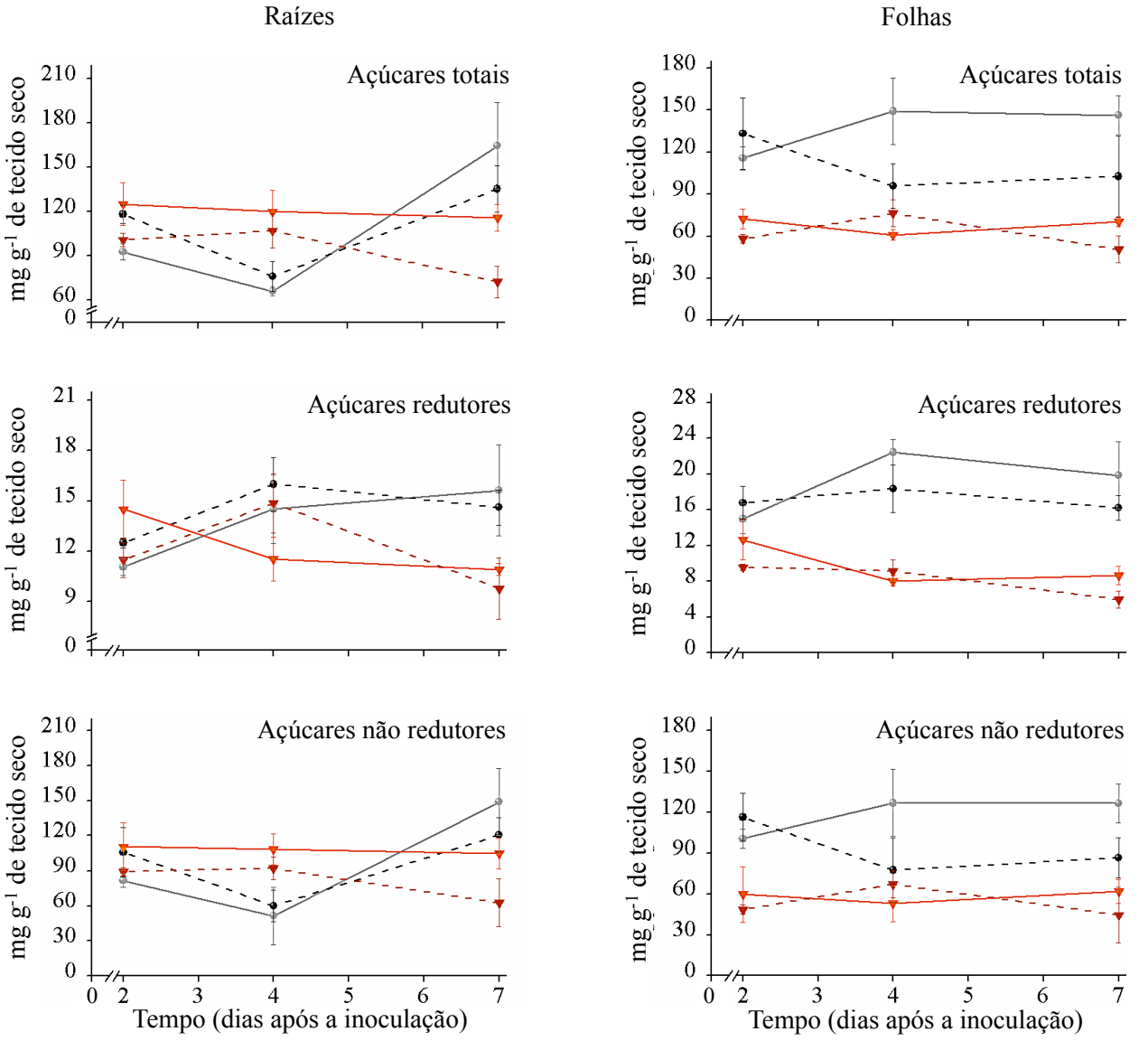

Figura 12 - Concentração de açúcares em plântulas de citros inoculados com *Phytophthora nicotianae*. —●— = Tangerina Sunki controle; - -●- - = Tangerina Sunki inoculada; —▼— = Citrumelo Swingle controle; - -▼- - = Citrumelo Swingle inoculado. Barras indicam a média ± erro padrão (n = 9)

Por sua vez, análises em HPLC mostraram que *P. nicotianae* reduziu concentração de sacarose em raízes das plântulas de citrumelo Swingle inoculadas ($P < 0,05$), porém aumentou a concentração de glicose nesse tratamento quatro dias após a inoculação ($P < 0,05$) (Figura 13). Não foram detectadas diferenças nas concentrações de frutose e amido nas raízes ($P > 0,5$), bem como de glicose, frutose, sacarose e amido nas folhas das plântulas inoculadas em relação aos controles ($P > 0,05$) (Figura 13).

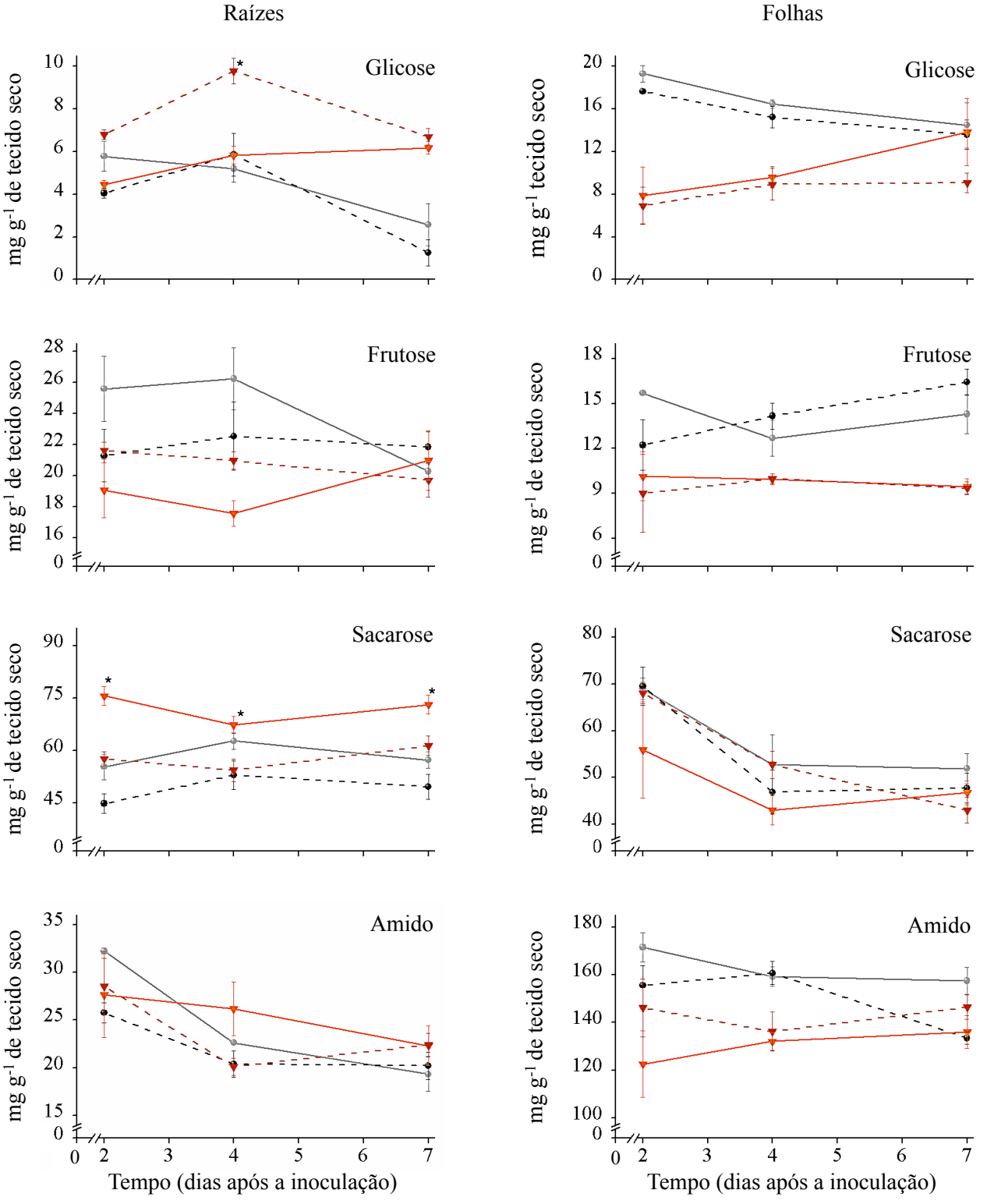

Figura 13 - Concentração de açúcares em plântulas de citros inoculados com *Phytophthora nicotianae*. = Tangerina Sunki controle; = Tangerina Sunki inoculada; = citrumelo Swingle controle; = citrumelo Swingle inoculado. Barras indicam a média ± erro padrão (n = 9). * Indica diferença estatística a 5% pelo teste de Tukey

Verificou-se variação sazonal na concentração de açúcares nos porta-enxertos (Figura 11). As folhas apresentaram menor teor de açúcares redutores entre julho e setembro de 2007, segundo e quarto meses após a inoculação, respectivamente. De maneira geral, os açúcares totais e os açúcares não redutores apresentaram menor concentração entre o segundo e quinto mês após a inoculação. Por sua vez, as raízes apresentaram redução no teor de açúcares totais, açúcares redutores e açúcares não redutores entre o terceiro e quinto meses após a inoculação (Figura 11). Esses baixos valores podem ser em função da baixa taxa fotossintética observada durante os meses de maio, junho e setembro (zero, primeiro e quarto meses após a inoculação, respectivamente) (Figura 5), que poderia ter sido insuficiente para suprir a demanda de carboidratos dos drenos.

Quanto às interações planta-patógeno estudadas, observa-se que o patógeno não causou alterações no teor de açúcares em folhas de citros. Além disso, raízes de porta-enxertos de tangerina Sunki apresentaram reduções mais severas de açúcares não redutores (Figura 11). É importante lembrar que a maioria dos açúcares redutores são representados pela glicose e frutose, dos açúcares não redutores pela sacarose e dos açúcares solúveis totais é pela soma desses três sacarídeos (RIBEIRO, 2006). Como *P. nicotianae* alterou mais severamente a concentração de açúcares não redutores presentes em raízes de porta-enxertos de tangerina Sunki, pode-se sugerir que esse patógeno consome preferencialmente açúcares não redutores, como a sacarose. De acordo com Hohl, 1983 apud Duncan, Graham e Timmer (1993), a sacarose, um açúcar cetônico, é uma das principais fontes de carbono em meio de cultura para o crescimento de *P. nicotianae*. Além disso, existe relação entre colonização de *P. nicotianae* em raízes de limão Rugoso e concentração de cetoses (sacarose e frutose), juntamente com umidade e temperatura do solo. Porém, não há correlação entre crescimento do patógeno e a concentração de açúcares redutores presentes em raízes daquele hospedeiro (DUNCAN; GRAHAM; TIMMER, 1993).

Na Figura 11 também se observa que a concentração de açúcares redutores presente nas raízes dos porta-enxertos inoculados só foi menor do que nas raízes controle ($P < 0,05$) durante o período de maior consumo desses açúcares por parte dos porta-enxertos. Isso significa que aparentemente *P. nicotianae* só afeta as reservas de açúcares redutores em raízes de porta-enxertos de citros, quando existe grande demanda por parte de drenos, que são recuperadas quando essa demanda diminui.

Análises em HPLC mostraram que *P. nicotianae* causou redução e aumento nas concentrações de sacarose e glicose, respectivamente, em raízes de plântulas de citrumelo Swingle ($P < 0,05$) (Figura 13), porém não foram observadas alterações desses açúcares em raízes de plântulas de tangerina Sunki ($P > 0,05$) (Figuras 13).

X. fastidiosa provocou redução na concentração de amido e sacarose em folhas de laranjeira Pêra enxertada sobre limão Cravo 26 meses após a inoculação (GOMES et al., 2003), enquanto que *Xanthomonas citri* reduziu a concentração de açúcares solúveis totais em folhas de citros, porém a concentração de amido não foi afetada (PADMANABHAN apud DAS, 2003). Plantas de laranja Pêra enxertadas sobre limão Cravo afetadas pelo declínio apresentaram maior teor de açúcares solúveis totais no caule e nas raízes do que as plantas sadias (GUIMARÃES et al., 2003). Segundo os autores, o menor consumo de carbono por parte das plantas doentes deve ser o motivo dessas modificações. *Candidatus* Liberibacter asiaticus provocou a deposição de calose em floema de plantas de laranja doce (KIM et al., 2009; SCHNEIDER, 1968), que bloqueou o transporte de seiva e promoveu o acúmulo de amido e sacarose em folhas e caules de plantas doentes. Dirac, Menge e Madore (2003) estudaram a concentração de carboidratos em plântulas de citrange Troyer (resistente) inoculadas com a *P. nicotianae* e incubadas sob diferentes temperaturas. Foi verificado que a 16 ^{o}C, *P. nicotianae* não alterou o teor de sacarose nas raízes das plântulas, porém a 24 ^{o}C e a 30 ^{o}C o patógeno reduziu e aumentou, respectivamente, o teor desse dissacarídeo nas raízes das plântulas. *P. nicotianae* também reduziu os teores de amido, a 30 ^{o}C e 24 ^{o}C, e de glicose em todas as temperaturas estudadas. Segundo esses mesmos autores, essas diferenças de consumo de açúcares por parte de *P. nicotianae* mantida sob diferentes temperaturas, podem ser decorrente de alterações na fisiologia da raiz, que alteraria a habilidade do patógeno em colonizar o sistema radicular do hospedeiro. Araujo (1998), por sua vez, verificou pequena variação na concentração de açúcares solúveis totais em folhas resistentes de suscetíveis microtangerinas dois meses após a infestação do solo com *P. nicotianae*. Vagens de cacau dos clones SNK 95 e SNK 413 (pouco suscetível) inoculadas com *P. megakarya* apresentaram menor redução na concentração de açúcares solúveis totais do que vagens do clone SNK 10 (altamente suscetível) (NDOUMOU; NDZOMO; DJOCGOUE, 1996). *P. cinnamomi* provocou menores alterações nas concentrações de glicose, sacarose e açúcares totais em radículas de plantas de abacateiro tolerante, cultivares Duke 7 e G6, do que na cultivar suscetível, Edratol, porém não

foram detectadas alterações nos teores de amido (TAS, 1999). *P. citricola* reduziu a concentração de sacarose em folhas de faia uma semana após a inoculação, porém o teor de amido não foi afetado pelo patógeno (FLEISCHMANN; WINKLER; OßWALD, 2009). Por sua vez, Clemenz et al. (2008) inocularam *P. alni* subsp. *alni* no colo de *Alnus glutinosa* e verificaram que o patógeno colonizou o córtex, inclusive o floema, o que impediu o transporte de seiva elaborada e provocou o acúmulo de amido nas folhas.

Por sua vez, a Figura 13 mostra menores concentrações de sacarose nas raízes de citrumelo Swingle inoculado em relação ao controle sadio, evidenciando que esse dissacarídeo pode ter sido hidrolisado em glicose e frutose pela ação da invertase. Judelson, Tani e Narayan (2009) verificaram que folhas de tomateiro e tubérculos de batata suscetíveis apresentaram redução na concentração de sacarose 6 dias após a inoculação de *P. infestans*. As folhas de tomateiro infectadas também apresentaram aumentos nas concentrações de glicose e frutose. Porém, os tubérculos de batata doentes só apresentaram aumento no teor de frutose. Segundo Danièle, Dommes e Hausman (2003), caule de plantas de batata resistente e infectadas com *P. infestans* apresentou acúmulo de glicose, sacarose, ribose e manitol, porém não foram observadas alterações nas concentrações de açúcares na cultivar suscetível até o terceiro dia após a inoculação. De acordo com esses pesquisadores, o acúmulo de açúcares na cultivar resistente poderia inibir o crescimento do patógeno ou estaria relacionado com a produção de compostos tóxicos. Além disso, diversos trabalhos mostram que a invertase localizada na parede celular é importante na resposta de defesa de plantas a patógenos. De acordo com Judelson, Tani e Narayan (2009) a atividade da invertase foi induzida por *P. infestans* em tubérculos de batata e folhas de tomateiro suscetíveis. Plantas de fumo que superexpressavam o gene da invertase da parede celular eram mais resistentes ao PVY, além de apresentarem maior atividade de peroxidase e de fenilalanina amônia-liase (HERBERS et al., 1996). Outro experimento envolvendo plantas de fumo transgênicas mostrou que as mesmas eram mais resistentes a *P. nicotianae* (ESSMANN et al., 2008), onde a sacarose era quebrada no apoplasto e as hexoses liberadas eram absorvidas pelas células e eliciavam o acúmulo de H_2O_2 e de calose.

No presente trabalho, a não detecção de aumentos na concentração de frutose em raízes de citrumelo Swingle inoculadas ($P > 0,05$) (Figura 13) poderia ser resultante da síntese de trioses, chamadas cestoses, a partir da frutose e sacarose (HANKIN; McINTYRE, 1977). Esse fato

também ajudaria a reduzir a concentração de sacarose nos tecidos dessas plântulas.

De acordo com Like et al. (2002), tubérculos de batata transgênicos, com menor atividade da proteína transportadora de ATP/ADP (AATP1) localizada na membrana de plastídios, apresentaram menor e maior concentrações de amido e de glicose, respectivamente, bem como eram mais resistentes a *E. carotovora*. Além disso, tubérculos e folhas de plantas de batata transgênicas, que tiveram o gene da AATP1 reprimido, também eram mais resistentes a *Alternaria solani* e *P. infestans*, respectivamente, do que a linhagem selvagem (CONRATH et al., 2003). Nos dois trabalhos acima foi mostrado que as plantas transgênicas acumulavam maior quantidade de H_2O_2, bem como ativavam genes de defesa com maior intensidade do que as plantas da linhagem selvagem. Outros trabalhos também mostram que altas concentrações de glicose podem ativar genes de defesa de plantas, como proteínas relacionadas à patogênese (THIBAUD et al., 2004), fenilalanina amônia-liase (EHNESS et al., 1997) e calcona sintase (TSUKAYA et al., 1991). De acordo com Herbers et al. (1996) e Like et al. (2002), a ativação dos mecanismos de defesa devido a altas concentrações de açúcares é independente do ácido salicílico. Além disso, plantas transgênicas de batata, que superexpressavam o gene da glicose oxidase, apresentaram maior concentração de H_2O_2 em seus tecidos e também eram mais resistentes a *P. infestans* e a *E. carotovora* subsp. *carotovora* (WU et al., 1995). A carboidrato oxidase também inibiu o crescimento *in vitro* de vários patógenos, inclusive de *P. infestans* (CUSTERS et al, 2004).

Scharte, Schön e Weis (2005) mostraram a importância do metabolismo primário na resistência de plantas de fumo a *P. nicotianae*. A interação incompatível desse patossistema mostrou rápido acúmulo de H_2O_2, influxo de cálcio e formação de calose, bem como acúmulo de sacarose no apoplasto e aumento da atividade de invertase, seguida pela absorção da glicose e frutose liberadas pela quebra da sacarose, que proporcionaram aumento na respiração, redução na fotossíntese e ativação das vias da pentose fosfato e do ácido shikímico.

Em vista do exposto acima, pode-se sugerir que a regulação do metabolismo de carboidratos pode estar relacionada com a resposta de defesa de citrumelo Swingle a *P. nicotianae*.

2.3.6 Proteínas

Foi verificado que *P. nicotianae* não alterou o teor de proteínas nas folhas e raízes das plantas de citros (P > 0,05), bem como não foi detectado variação sazonal na concentração de proteínas (Figura 14).

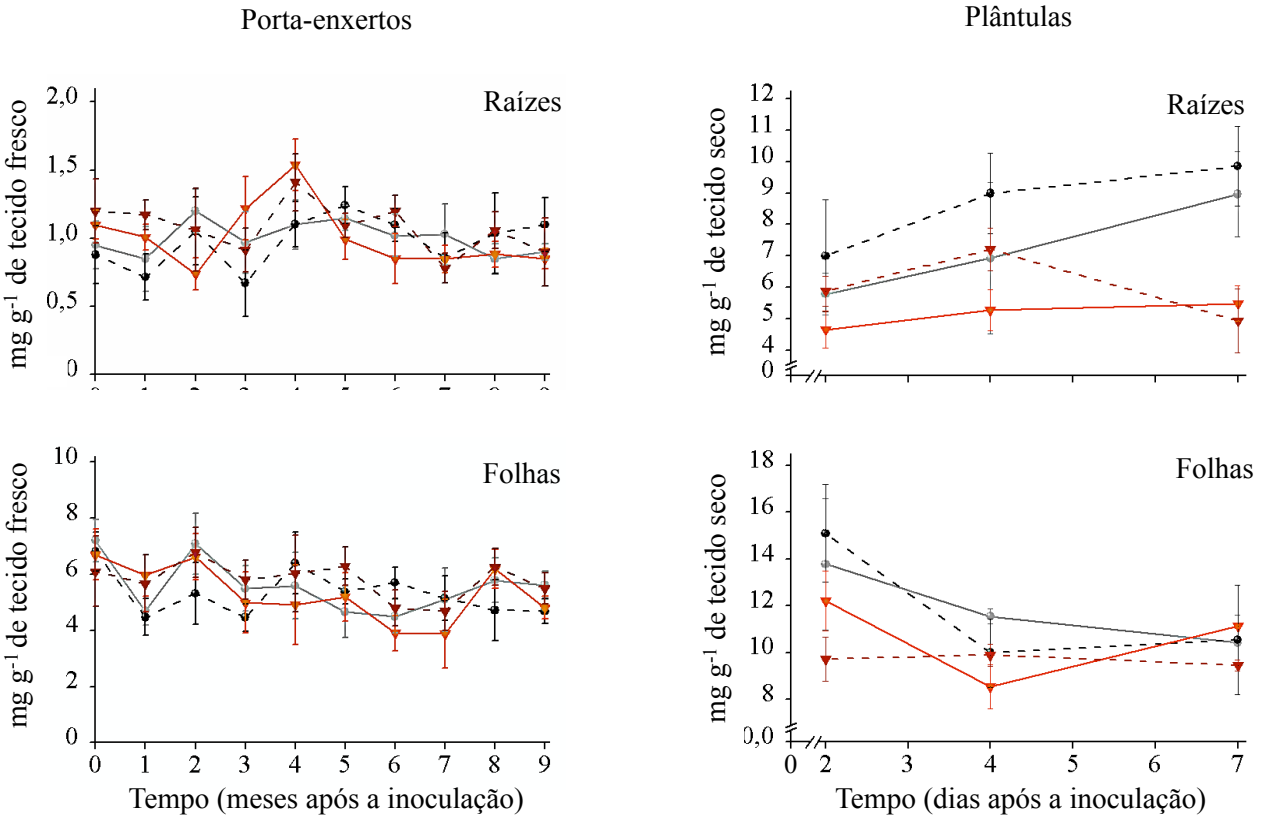

Figura 14 - Concentração de proteínas em plantas de citros inoculadas com *Phytophthora nicotianae*. = Tangerina Sunki controle; = Tangerina Sunki inoculada; = Citrumelo Swingle controle; = Citrumelo Swingle inoculado. Barras indicam a média ± erro padrão (n = 6 - porta-enxertos; n = 9 - plântulas)

As proteínas são fontes de nitrogênio, carbono e enxofre para patógenos (MARZLUF, 1997), bem como podem estar envolvidas no processo de defesa das plantas (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008). Além disso, patógenos podem alterar a quantidade ou qualidade das proteínas presentes nas plantas. *P. digitatum* reduziu a concentração de proteínas totais em frutos de laranja Valência cinco dias após a inoculação (FAJARDO et al., 1998). Plantas de laranja Pêra inoculadas com *X. fastidiosa* e com sintomas de clorose variegada

dos citros (CVC), apresentaram menor concentração de proteínas totais na seiva do xilema e nas folhas do que as plantas controle, sendo que a composição protéica de aminoácidos de plantas também foi alterada pela bactéria (PURCINO et al., 2007). *P. palmivora* reduziu a concentração de proteínas totais em tangerinas Cleópatra e Sun Chu Cha, citrumelo Swingle, clone US-897 (tangerina Cleópatra x *P. trifoliata*), citrange Carrizo, laranja doce Pineapple e laranja Azeda quatro semanas após a inoculação (ALBRECHT; BOWMAN, 2007). Vagens de diferentes clones de cacau acumularam aminoácidos dois dias após a inoculação com *P. megakarya*. Porém, esse acúmulo foi menor nos clones SNK 95 e SNK 413 (pouco suscetível) do que no clone SNK 10 (altamente suscetível) (NDOUMOU; NDZOMO; DJOCGOUE, 1996). Segundo os autores, os clones SNK 95 e SNK 413 podem ter utilizado os aminoácidos para a síntese de compostos fenólicos ou de proteínas estruturais, como proteínas ricas em hidroxiprolina. Além disso, a concentração de proteínas nos frutos de castanheiras provenientes de árvores infectadas com *P. cinnamomi* foi maior do que em árvores sadias (GOMES-LARANJO et al., 2004). Esse patógeno também proporcionou aumento na concentração de nitrogênio em raízes de plantas de abacate 40 dias após a inoculação (STOLZY et al., 1967). De acordo com Valcu et al. (2009), *P. citricola* não causou alteração na concentração de proteínas solúveis totais em folha e raízes de faia. Porém, análises em gel 2 D mostraram que o patógeno induziu a expressão de 99 proteínas nas folhas e 30 nas raízes.

Os dados da literatura mostram que espécies de *Phytophthora* podem promover o aumento, redução ou não alterar a concentração de proteínas em tecidos de seus hospedeiros. De acordo com os resultados obtidos, não foi possível verificar alterações na concentração de proteínas totais em folhas e raízes de plantas de citrus inoculadas com *P. nicotianae*, porém variações qualitativas das proteínas podem ter ocorrido nos tecidos das planta infectadas.

2.3.7 Superóxido dismutase, catalase e guaiacol peroxidase

Foi verificado que *P. nicotianae* não alterou a atividade de superóxido dismutase e de catalase de raízes de plântulas de citrumelo Swingle e de tangerina Sunki ($P > 0,05$) (Figura 15).

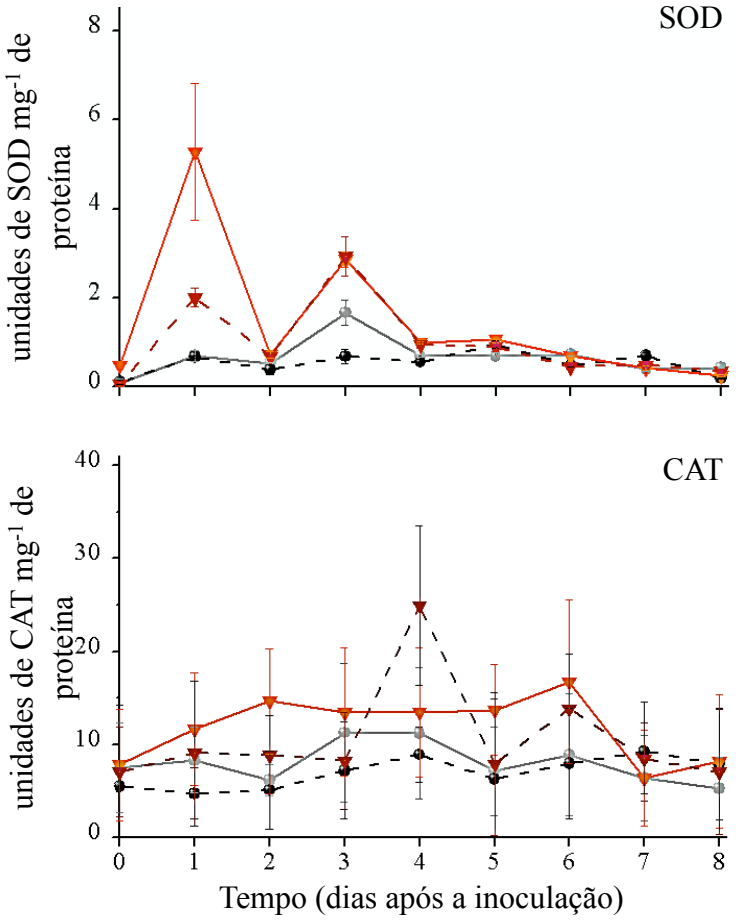

Figura 15 - Atividade de superóxido dismutase (SOD) e de catalase (CAT) em raízes de plântulas de citros inoculadas com *Phytophthora nicotianae*. —●— = tangerina Sunki controle; - -●- - = tangerina Sunki inoculada; —▼— = citrumelo Swingle controle; - -▼- - = citrumelo Swingle inoculado. Barras indicam a média ± erro padrão (n = 6)

Por sua vez, os porta-enxertos tiveram a atividade da guaiacol peroxidase alterada em função da inoculação de *P. nicotianae* (P < 0,05) (Figura 16). Raízes de tangerina Sunki inoculadas apresentaram a atividade dessa enzima cinco e duas vezes maior do que as plantas controle dois e três meses após a inoculação. Além disso, três meses após a inoculação, a atividade da guaiacol peroxidase em raízes inoculadas de citrumelo Swingle também foi duas vezes maior do que nas raízes controle. Análises em folhas mostraram que a atividade da guaiacol peroxidase em tangerina Sunki inoculada foi reduzida em 3,5 vezes um mês após a inoculação. Por outro lado, não foram verificadas alterações na atividade dessa enzima em plântulas de citros (Figura 16).

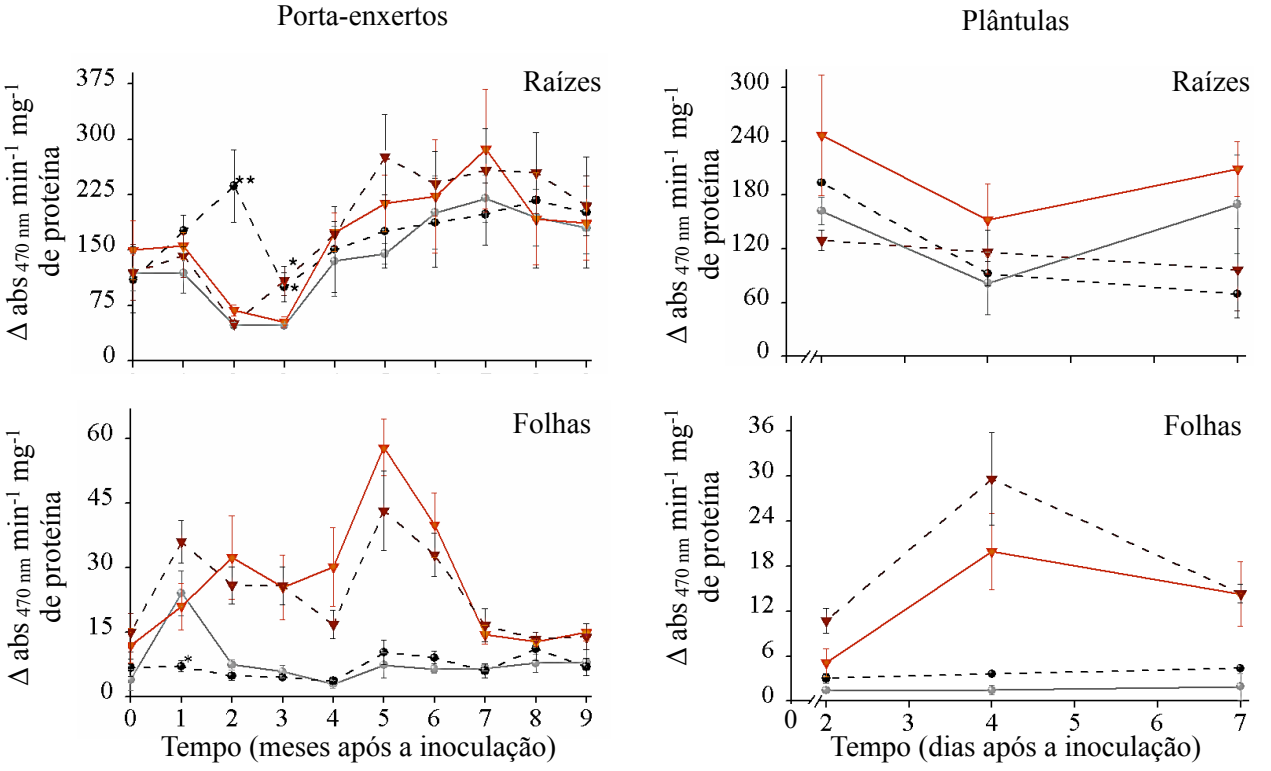

Figura 16 - Atividade da guaiacol peroxidase em plantas de citros inoculadas com *Phytophthora nicotianae*. = Tangerina Sunki controle; = Tangerina Sunki inoculada; = Citrumelo Swingle controle; = Citrumelo Swingle inoculado. Barras indicam a média ± erro padrão (n = 6 - porta-enxertos; n = 9 - plântulas). * Indica diferença estatística a 5% e ** a 1% pelo teste de Tukey

As plantas possuem um sistema antioxidante para minimizar o efeito do estresse oxidativo e as enzimas superóxido dismutase, catalase e peroxidases são integrantes desse sistema (APEL; HIRT, 2004; SCANDALIOS, 2005). A SOD converte $O_2^{\cdot -}$ em H_2O_2 e O_2 (SCANDALIOS, 2005). Diferentes trabalhos mostraram que a SOD esta envolvida na resposta de defesa de plantas. A atividade da SOD é estimulada mais rapidamente em interações batata - *P. infestans* incompatíveis do que em interações compatíveis (IVANOVA et al., 1991). *P. colocasiae* induz em proporção maior a atividade da SOD em cultivares resistentes de inhame (Jhankri, DP-25 e Duradim) do que em cultivar suscetível (N-118) (SAHOO et al., 2007).

A catalase é responsável pela remoção do H_2O_2 e a expressão da resistência de plantas pode requerer que a atividade dessa enzima seja alterada. Ballester, Lafuente e González-Candelas (2006) verificaram que a atividade da SOD permaneceu constante durante a colonização de frutos de laranja Navelina. Por outro lado, as atividades da CAT, ascorbato peroxidase e glutationa

redutase, que são removedoras de H_2O_2, foram afetadas negativamente pelo patógeno. Segundo esses autores, altas concentrações de H_2O_2 favoreceria a colonização desse patógeno necrotrófico. Procurando estudar alterações no metabolismo envolvido no estresse oxidativo, Ozeretskovskaya et al. (2006) induziram a resistência e a suscetibilidade em tubérculos de batata (cultivar Istrinskii) e inocularam *P. infestans*. De acordo com os resultados obtidos, os pesquisadores concluíram que durante a resposta de resistência, a atividade da SOD é induzida e altas concentrações de ácido salicílico inibem a atividade da CAT. Essas mudanças provocam aumento nos teores de H_2O_2, cujo acúmulo leva a ativação da cascata MAPK e, posteriormente, da expressão de genes de defesa presentes nos tubérculos.

Peroxidases são importantes nos processos de lignificação, deposição de suberina e oxidação de compostos fenólicos. A atividade dessa enzima além de ser alterada por patógenos (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008), também pode sofrer variações devido a estresses abióticos. Folhas de *Amaranthus hypochondriacus*, sob estresse hídrico, tiveram a atividade da ascorbato peroxidase reduzida (HUERTA-OCAMPO et al., 2009), enquanto que em folhas de álamo (*Populus przewalskii*), a falta de água provocou aumento na atividade da ascorbato peroxidase e da guaiacol peroxidase (LEI, 2008). O déficit hídrico também induziu aumento na atividade da ascorbato peroxidase em folhas, raízes e ramos de feijão-de-corda (MANIVANNAN et al., 2007).

No presente trabalho, a inoculação foi realizada durante o inverno, que se caracteriza pela baixa temperatura e disponibilidade hídrica. Nessas condições foi verificado que *P. nicotianae* alterou a atividade de peroxidases em porta-enxertos de citros, porém, durante o verão não foram observadas diferenças na atividade dessa enzima. Portanto, as condições ambientais juntamente com *P. nicotianae* podem ter provocado alterações na atividade da peroxidase entre o primeiro e terceiro meses após a avaliação.

Sahoo et al. (2007) estudaram diferentes cultivares de plantas de inhame com diferentes níveis de resistência a *P. colocasiae*. Foi verificado pelos autores que nas cultivares resistentes (DP-25 e Duradim) a atividade da guaiacol peroxidase aumentou em maior proporção em relação a cultivar suscetível (N-118). Ademais, a atividade da guaiacol peroxidase, em cacaueiro foi maior em plantas resistentes e inoculadas com *P. palmivora* do que em plantas controle 12 semanas após a inoculação (OKEY et al., 1997).

Outros estudos envolvendo a ativação de peroxidases em interações citros - *Phytophthora* spp. foram conduzidos anteriormente. A atividade de peroxidases em porta-enxertos de citros com diferentes níveis de resistência a *P. palmivora* não foi alterada quatro semanas após a inoculação (ALBRECHT; BOWMAN, 2007). Araujo (1998) estudou a atividade de peroxidase em sete clones de microtangerina, com diferentes níveis de resistência a *P. nicotianae*, bem como de laranja Azeda (resistente) e de limão Cravo (suscetível). O autor verificou que o patógeno alterou a atividade dessa enzima apenas em folhas dos clones suscetíveis e que não foi verificada relação entre a maior atividade de peroxidase nas folhas e o nível de resistência das plantas a *P. nicotianae*. Teixeira (2005) analisou folhas e tecidos de caule adjacentes ao local de inoculação com *P. nicotianae* em tangerina Sunki e *P. trifoliata* e também não conseguiu detectar diferenças na expressão de genes relacionados com a peroxidase.

Portanto, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que a catalase, superóxido dismutase e guaiacol peroxidase não estão envolvidas no processo de defesa de citrumelo Swingle contra *P. nicotianae*.

2.3.8 Glucanases e quitinases

Como pode ser observado nas Figuras 17 e 18, *P. nicotianae* não alterou a atividade de glucanases e de quitinases em plantas de tangerina Sunki e de citrumelo Swingle ($P > 0,05$).

Glucanases e quitinases são enzimas que hidrolisam polímeros de glucana e de quitina, respectivamente. Esses compostos estão presentes na parede celular de fungos (AGRIOS, 2005), porém, a parede celular de *Phytophthora* spp. não contém quitina (ERWIN; RIBEIRO, 1996).

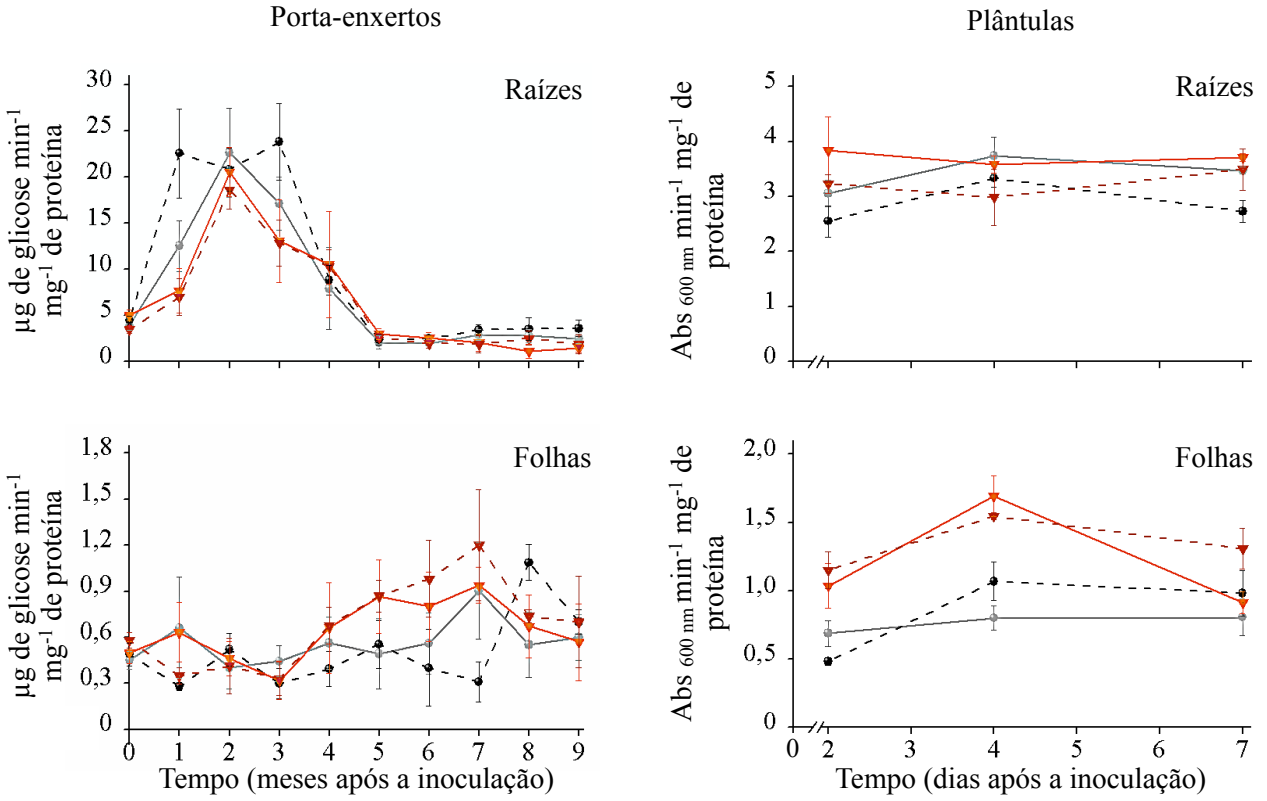

Figura 17 - Atividade de β-1,3-glucanases em plantas de citros inoculadas com *Phytophthora nicotianae*. —●— = Tangerina Sunki controle; - -●- - = Tangerina Sunki inoculada; —▼— = Citrumelo Swingle controle; - -▼- - = Citrumelo Swingle inoculado. Barras indicam a média ± erro padrão (n= 6 - porta-enxertos; n = 9 - plântulas)

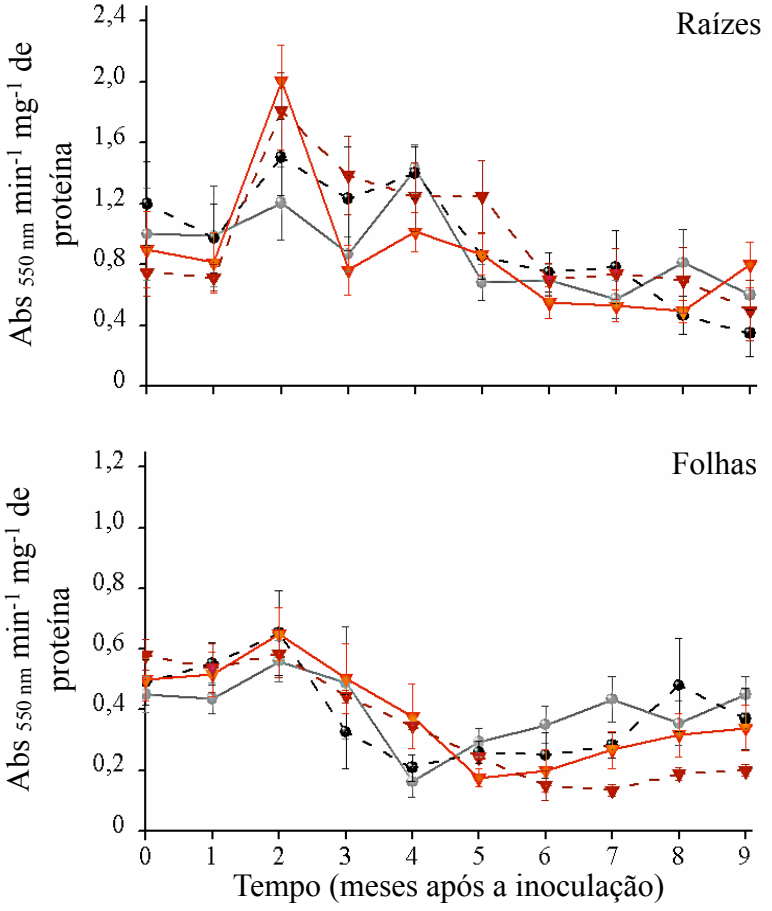

Figura 18 - Atividade de quitinases em porta-enxertos de citros inoculados com *Phytophthora nicotianae*. = Tangerina Sunki controle; = Tangerina Sunki inoculada; = Citrumelo Swingle controle; = Citrumelo Swingle inoculado. Barras indicam a média ± erro padrão (n = 6)

Testes *in vitro* mostraram que quitinases não inibiram o crescimento de *Phytophthora* spp. (MAUCH; MAUCH-MANI; BOLLER, 1988; SCHÖDER et al., 1992), enquanto que glucanases inibiram *P capsici*, *Phytophthora fragariae* e *P. cinnamomi* (DOWNER; MENGE; POND, 2001; LIU et al., 2009; VALOIS et al., 1996), porém não apresentaram efeito sobre o crescimento de *Phytophthora cactorum* (MAUCH; MAUCH-MANI; BOLLER, 1988).

Vários trabalhos mostram que diferentes espécies de *Phytophthora* podem alterar a atividade dessas enzimas em plantas. Por exemplo, o clone resistente de seringueira RRII 105 expressou mais intensamente o mRNA e apresentou maior atividade de β-1,3-glucanase do que o clone suscetível RRIM 600 48 h após a inoculação de *Phytophthora meadii* (THANSEEM; JOSEPH; THULASEEDHARAN, 2005). Plantas de pimentão, cultivar Hanbyul, foram inoculadas com o isolado S197, virulento, ou com o isolado CBS178.26, avirulento, de *P. capsici*.

O mRNA envolvido na expressão da classe II de quitinases foi expresso de modo mais rápido e intenso em brotos das plantas inoculadas com o isolado avirulento (LEE et al., 2000). Outros trabalhos mostraram que glucanases não estão envolvidas na defesa de citros a *Phytophthora* spp. Albrecht e Bowman (2007) mostraram que a atividade de β-1,3-glucanase em raízes de porta-enxertos resistentes (híbrido US-897 e tangerinas Cleopatra e Sun Chu Cha) era menor do que a atividade de porta-enxertos suscetíveis (citrumelo Swingle, citrange Carrizo e doce Pineapple) quatro semanas pós a inoculação de *P. palmivora*. As folhas de plantas de tangerina Sun Chu Cha inoculadas apresentaram menor atividade dessa enzima. Ademais, citrumelo Swingle e híbrido US-897 apresentaram menor atividade de quitinases nas raízes e folhas, respectivamente, quatro semanas após a inoculação. Por outro lado, Teixeira (2005) demonstrou que a expressão de genes relacionados a glucanases foram expressos de maneira semelhante em *P. trifoliata* e tangerina Sunki nas áreas adjacentes a inoculação de *P. nicotianae*. Porém, esses genes foram expressos mais intensamente em folhas de tangerina Sunki 72 h após a inoculação.

No presente trabalho verificou-se que as atividades de glucanases e de quitinases em raízes dos porta-enxertos foram maior durante o inverno (Figuras 17 e 18). Diversos trabalhos mostraram que a atividade e a transcrição do mRNA dessas enzimas são estimuladas pelo frio e/ou pela seca. Gaudet et al. (2003) verificaram que o mRNA que expressa quitinase em folhas de trigo é transcrito principalmente durante o outono. Porém, a transcrição do mRNA que expressa glucanases é estimulada em resposta ao frio severo. Análises de extratos protéicos de brotos de mirtilo mostraram que quitinases acumulam durante o outono até o início do verão (KIKUCHI; MASUDA, 2009). De acordo com Yaish et al. (2006), β-1,3-glucanases evitam a formação de cristais de gelo em folhas de centeio, que podem causar danos as mesmas.

Folhas e ramos de pimentão que sofreram déficit hídrico acumularam mRNA, o qual expressa uma quitinase (HONG; HWANG, 2002). Finalmente, Gimeno et al. (2009) verificaram que tangerina Clemenules, enxertada sobre tangerina Cleopatra, teve os genes relacionados com quitinase e glucanase expressos em raízes e em folhas mantidas sob estresse hídrico.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que as quitinases e as β-1,3-glucanases não estão envolvidas no processo de defesa de citrumelo Swingle contra *P. nicotianae*.

2.3.8 Fenilalanina amônia-liase, polifenoloxidase, compostos fenólicos solúveis e lignina

P. nicotianae não causou alterações na atividade de fenilalanina amônia-liase de plantas de citros (Figura 19).

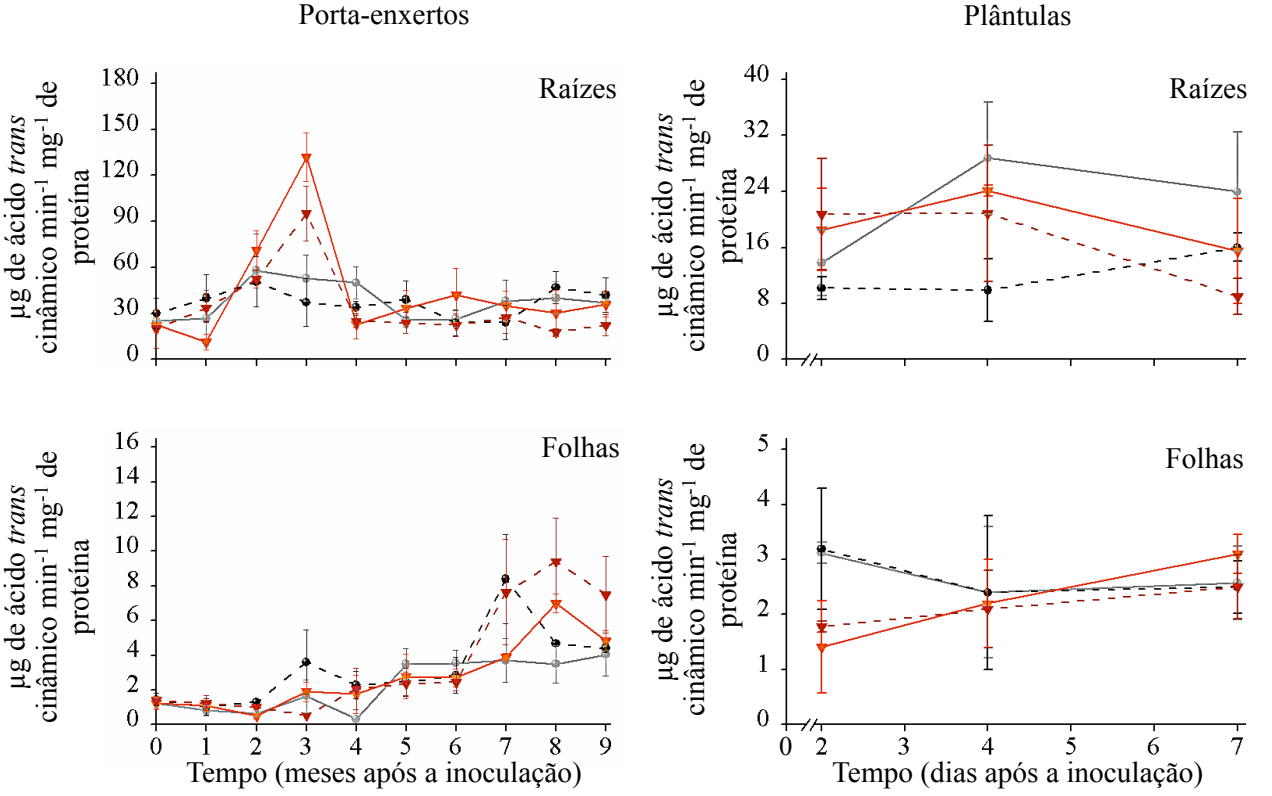

Figura 19 - Atividade de fenilalanina amônia-liase em plantas de citros inoculadas com *Phytophthora nicotianae*. = Tangerina Sunki controle; = Tangerina Sunki inoculada; = Citrumelo Swingle controle; = Citrumelo Swingle inoculado. Barras indicam a média ± erro padrão (n = 6 - porta-enxertos; n = 9 = plântulas)

Por sua vez, foi verificado que raízes de tangerina Sunki, inoculadas com *P. nicotianae*, apresentaram menor teor de fenóis totais do que as plantas controle, três meses após a inoculação (Figura 20). Porém, no oitavo mês após a inoculação, as raízes de tangerina Sunki inoculadas apresentaram maior concentração de compostos fenólicos do que as plantas controle. *P. nicotianae* não alterou a concentração de fenóis totais em citrumelo Swingle (Figura 20).

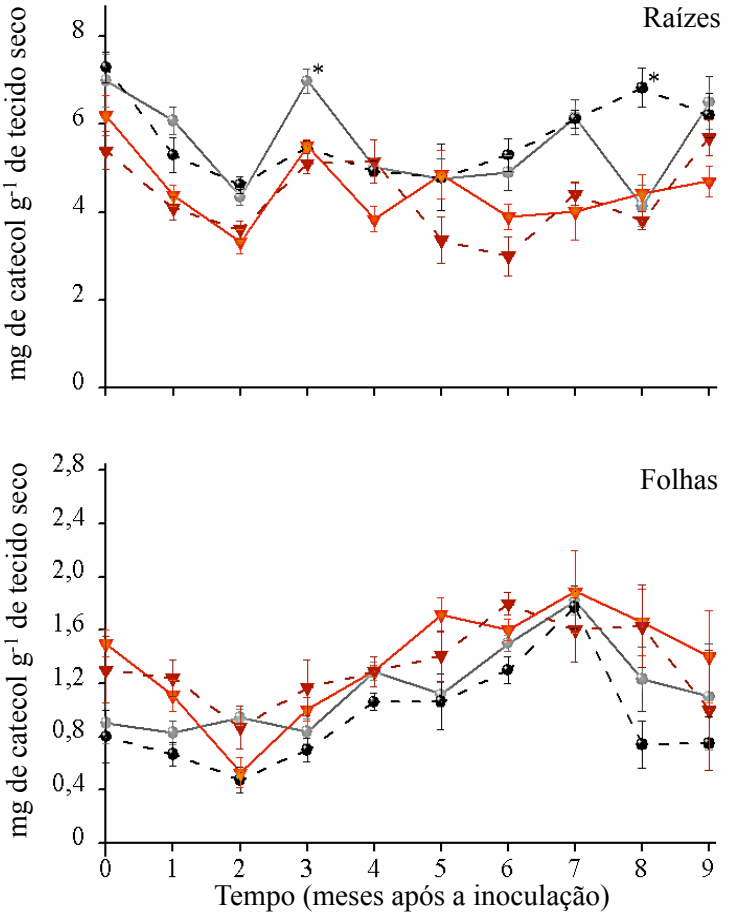

Figura 20 - Concentração de fenóis totais em porta-enxertos de citros inoculados com *Phytophthora nicotianae*. = Tangerina Sunki controle; = Tangerina Sunki inoculada; = Citrumelo Swingle controle; = Citrumelo Swingle inoculado. Barras indicam a média ± erro padrão (n = 6). * Indica diferença estatística a 5% pelo teste de Tukey

A atividade de polifenoloxidase foi menor (P < 0,05) em raízes de porta-enxertos de citrumelo Swingle inoculadas com *P. nicotianae* dois meses após a inoculação (Figura 21). Não foram observadas alteração na atividade dessa enzima presentes nas raízes e folhas das plântulas e nas folhas dos porta-enxertos (P > 0,05) (Figura 21).

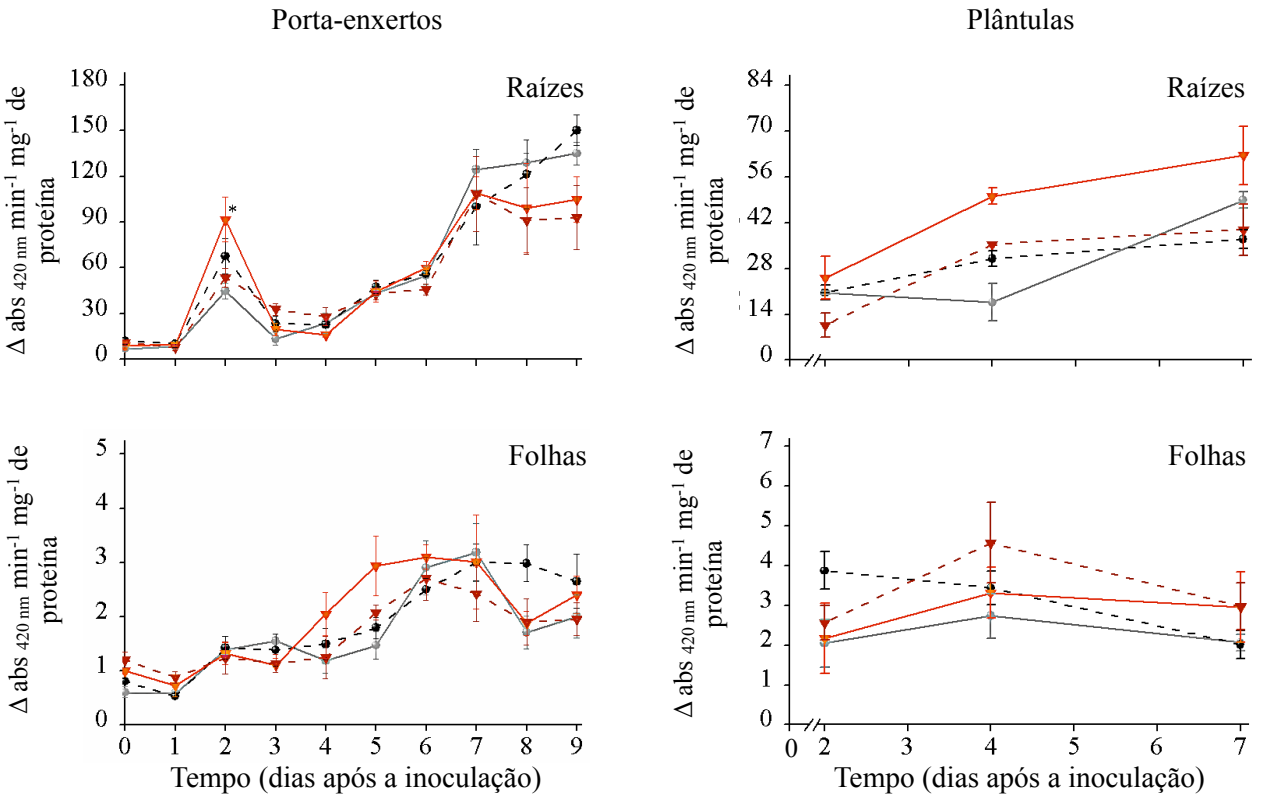

Figura 21 - Atividade de polifenoloxidase em plantas de citros inoculadas com *Phytophthora nicotianae*. —●— = Tangerina Sunki controle; - -●- - = Tangerina Sunki inoculada; —▼— = Citrumelo Swingle controle; - -▼- - = Citrumelo Swingle inoculado. Barras indicam a média ± erro padrão (n = 6 - porta-enxertos, n = 9 plântulas). * Indica diferença estatística a 5% pelo teste de Tukey

Finalmente, *P. nicotianae* não alterou a concentração de lignina em raízes e folhas de citrumelo Swingle e tangerina Sunki (Figura 22).

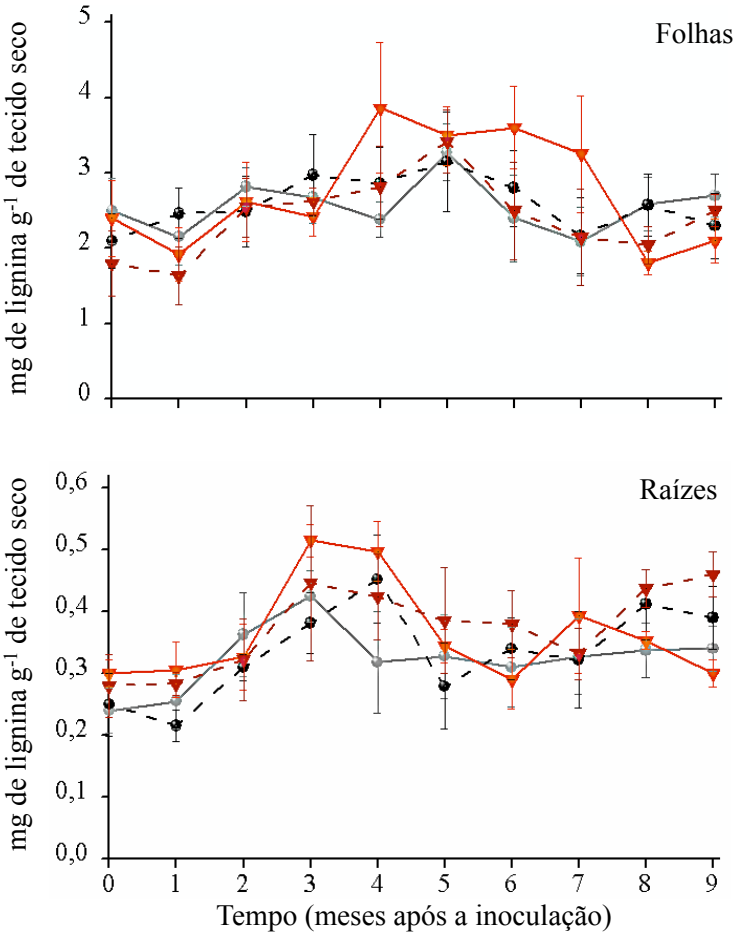

Figura 22 - Concentração de lignina em porta-enxertos de citros inoculados com *Phytophthora nicotianae*. —●— = Tangerina Sunki controle; - -●- · = Tangerina Sunki inoculada; —▼— = Citrumelo Swingle controle; - -▼- · = Citrumelo Swingle inoculado. Barras indicam a média ± erro padrão (n = 6)

A fenilalanina amônia-liase (FAL) é uma enzima chave na via dos fenilpropanóides (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008), principal rota responsável pela síntese de compostos fenólicos em plantas (TAIZ; ZEIGER, 2006). Diversos trabalhos mostram que existe correlação entre a atividade da FAL e o acúmulo de compostos fenólicos solúveis e de lignina. Ju et al. (1995) verificaram que a variação da atividade da FAL em frutos de maçã, durante o processo de amadurecimento, estava correlacionada com a concentração de compostos fenólicos simples presentes nos mesmos. Estudando 20 cultivares de tomate, Vanitha, Niraajana e Umesha (2009) verificaram que os genótipos resistentes a *R. solanacearum* apresentaram maior atividade de FAL e de polifenoloxidase (PFO) do que plantas suscetíveis, bem como acumularam mais compostos fenólicos.

No presente trabalho, foi observado que as atividades de FAL e de PFO foram maiores durante o verão, com exceção da atividade da FAL em amostras de raízes (Figuras 19 e 21). Outros pesquisadores também evidenciaram que as condições ambientais alteraram a atividade dessas enzimas. Segundo Rivero et al. (2001), a atividade da FAL em folhas de tomateiro foi maior em plantas mantidas a 35 ^{o}C do que a 25 ^{o}C, enquanto que análises da atividade da PFO mostraram resultados opostos. Esses autores também verificaram que folhas de plantas de melancia apresentaram maior atividade da FAL e da PFO em plantas incubadas a 15 ^{o}C e 35 ^{o}C, respectivamente. Zahra, Majid e Amin (2009) observaram maior atividade da PFO em botão floral de pistache na primavera quando comparado ao inverno.

Além disso, plantas de tomate que tiveram a atividade da PFO reprimida foram mais resistentes a seca do que plantas que superexpressavam essa enzima ou do que a linhagem selvagem (THIPYAPONG et al., 2004). Plantas de oliveira, mantidas sob estresse hídrico, apresentaram menor atividade da PAL do que as plantas controle (SOFO et al., 2005). Trabalhos envolvendo plantas de triticale e de milho mostraram que o estresse hídrico, dependendo da cultivar, podia tanto aumentar quanto diminuir a atividade da FAL nessas gramíneas (HURA et al., 2007; HURA; HURA; GRZESIAK, 2008).

Ao contrário dos resultados obtidos no presente trabalho, vários pesquisadores verificaram que *Phytophthora* spp. pode alterar a atividade de PAL e de PFO, bem como a concentração de fenóis totais e de lignina.

Cahill e McComb (1992) verificaram que a inoculação de *P. cinnamomi* induzia a atividade da FAL, seguida por alterações nos níveis de fenóis e de lignina em raízes de *Eucalyptus calophylla* (resistente) mas não de *Eucalyptus marginata* (suscetível). Cahill et al. (1989) inocularam *P. cinnamomi* em diferentes espécies vegetais, sendo que estudos histológicos mostraram que a lignificação da parede celular, deposição de compostos fenólicos e formação de papila e calose foram encontradas mais freqüentemente nas espécies resistentes (*E. calophylla*, *Eucalyptus maculata*, *Acacia pulchella*, *Gahnia radula*, *Juncus bufonius*, *Zea mays* e *Triticum aestivum*) do que nas suscetíveis (*E. marginata*, *Eucalyptus sieberi*, *Acacia melanoxylon*, *Themeda australis*, *Xanthorrhoea australis* e *Xanthorrhoea resinosa*). Por sua vez, Okey et al. (1997) verificaram que as atividades da PFO e FAL em cacaueiro foram maiores em plantas resistentes e inoculadas com *P. palmivora* do que em plantas controle, 12 semanas após a

inoculação. Além disso, Djocgoue et al .(2007) estudaram dois genótipos de cacaueiro, ICS84 e ICS95 (resistente e moderadamente resistente a *P. megakarya*, respectivamente), bem como as plantas oriundas dos cruzamentos entre essas cultivares. Os resultados mostraram uma relação negativa entre a evolução da necrose provocada pelo patógeno e o acúmulo de compostos fenólicos em folhas de cacaueiro. Análises qualitativas e quantitativas mostraram que cacaus inoculados com *P. megakarya* acumularam flavonóides, independentemente do nível de resistência. Porém, a concentração de compostos fenólicos solúveis totais no clone suscetível (SNK 10) foi 40% menor do que no clone resistente (SNK 413), quatro dias após a inoculação (NDOUMOU; NDZOMO; DJOCGOUE, 1996).

Compostos fenólicos estão presentes em maiores quantidades em pecíolos de plantas não infectadas de *Hevea brasiliensis* resistentes a *P. meadii* do que em pecíolo de genótipo suscetível. Análises qualitativas e quantitativas mostraram que concentrações de 3 mM de vanilina ou de umbeliferona, presentes apenas em cultivares resistentes, inibiram em 100% a germinação *in vitro* de zoósporos de *P. meadii*, bem como o crescimento micelial do patógeno em meio de cultivo. Além disso, a atividade da FAL era maior em plantas resistentes do que em plantas suscetíveis. Segundo os autores, essa enzima indica um possível envolvimento da lignina na resposta de defesa de seringueira a *P. meadii,* porém, a mesma também pode estar envolvida na síntese de vanilina (JAYASURIYA; WIJESUNDERA; DERANIYAGALA, 2003).

A fitoalexina escoparona é acumulada apenas em genótipos resistentes (*C. macrophylla*, *P. trifoliata,* laranja Azeda) a *P. citrophthora*, bem como existe uma correlação entre o acúmulo desse composto em tronco de diferentes genótipos de citros e o comprimento da lesão provocada por *P. citrophthora*. O patógeno também foi inibido *in vitro* por escoparona, sendo a DL_{50} igual a 97 $\mu g\ mL^{-1}$ (AFEK; SZTEJNBERG, 1988). Por sua vez, Fourie (2004) verificou que diversos genótipos de citros resistentes (citrumelo Swingle, *C. macrophylla*, citrange Troyer e laranja Azeda) acumularam mais compostos fenólicos solúveis totais do que os suscetíveis (limão Volkameriano, citrange C35, limão Rugoso), 21 dias após a inoculação de *P. nicotianae*. Porém não foi verificada correlação entre a resistência das plantas e o acúmulo de escoparona. Albrecht e Bowman (2007) mostraram que a concentração de fenóis totais foi maior em raízes de genótipos de citros suscetíveis do que em genótipos resistentes a *P. palmivora* quatro semanas após a inoculação, o que mostrou que esses compostos não são importantes para a defesa de citros a *P.*

palmivora. Além disso, *P. palmivora* alterou a concentração de compostos fenólicos de maneira parecida nas folhas dos porta-enxertos estudados. Por sua vez, Teixeira (2005), demonstrou que a expressão de genes relacionados a FAL ocorreu mais rapidamente no caule, ao redor do ponto de inoculação e em folhas de *P. trifoliata* do que em tangerina Sunki após a inoculação de *P. nicotianae*. Por outro lado, Araujo (1998) verificou pouca diferença na concentração de compostos fenólicos em folhas de oito porta-enxertos de citros dois meses após a inoculação de *P. nicotianae*. Além disso, não foi observada correlação entre colonização de *P. nicotianae* em raízes de limão Rugoso e a concentração de lignina e de fenóis totais (DUNCAN; GRAHAM; TIMMER, 1993).

Em função dos resultados obtidos no presente trabalho, compostos fenólicos não estão envolvidos no processo de defesa de citrumelo Swingle contra *P. nicotianae*.

3 CONCLUSÕES

Phytophthora nicotianae reduz o sistema radicular de tangerina Sunki, tendo como consequencia o comprometimento da troca gasosa e balanço hídrico e estimula a síntese de etileno.

P. nicotianae altera o metabolismo de carboidratos em raízes de plantas colonizadas pelo patógeno. Inicialmente, *P. nicotianae* altera as concentrações de sacarose e de glicose em raízes de citrumelo Swingle, porém, em seguida, o patógeno provoca reduções mais severas nas concentrações de açúcares não redutores e totais em raízes de tangerina Sunki.

Não foram verificadas alterações relevantes no metabolismo secundário em raízes de tangerina Sunki e de citrumelo Swingle, que ajudassem a compreender os mecanismos envolvidos na resistência de citrumelo Swingle a *P. nicotianae*.

REFERÊNCIAS

ABBATE, P.E.; DARDANELLI, J.L.; CANTARERO, M.G.; MATURANO, M.; MELCHIORI, R.J.M.; SUERO, E.E. Climatic and water availability effects on water-use efficiency in wheat. **Crop Science**, Madison, v. 44, p.474-483, 2004.

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**, 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 922p.

AGUIRRE, J.; RÍOS-MOMBERG, M.; HEWITT, D.; HANSBERG, W. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 13, p. 111-118, 2005.

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.

ALEXANDER, D.; GOODMAN, R. M.; GUT-RELLA, M.; GLASCOCK, C.; WEYMANN, K.; FRIEDRICH, L.; MADDOX, D.; AHL-GOY, P.; LUNTZ, T.; WARD, E.; RYALS, J. Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 90, n. 15, p. 7327-7331, 1993.

ALI, R.; MA, W.; LEMTIRI-CHLIEH, F.; TSALTAS, D.; LENG, Q.; VON BODMAN, S. Death don't have no mercy and neither does calcium: Arabidopsis cyclic nucleotide gated channel 2 and innate immunity. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 19, p. 1081-1095, 2007.

ALVAREZ, L.A.; GRAMAJE, D.; ABAD-CAMPOS, P.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J. Seasonal susceptibility of citrus scions to *Phytophthora citrophthora* and *P. nicotianae* and the influence of environmental and host-linked factors on infection development. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 124, p.621-635, 2009.

ANDRÉS, J.L.; RIVERA, A.; FERNÁNDEZ, J. *Phytophthora nicotianae* pathogenic to pepper in northwest Spain. **Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 185, n.2, p.91-98, 2003.

ANGUELOVA-MERHAR, V.S.; VANDER WESTHUIZEN, A.J.; PRETORIUS, Z.A. β-1,3-glucanase and chitinase activities and the resistance response of wheat to leaf rust. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 106, n. 4, p. 393-401, 1999.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, 2004.

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

ARAUS, J.L.; SLAFER, G.A.; REYNOLDS, M.P.; ROYO C. Plant breeding and drought in C_3 cereals: what should we breed for? **Annals of Botany**, Oxford, UK, v. 89, p. 925-940, 2002.

ARTECA, R.N.; ARTECA, J.M. Heavy-metal-induced ethylene production in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Plant Physiology**, New York, v. 164, p. 1480-1488, 2007.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 85, n. 2, p. 235-241, 1992.

ASADA, K.; TAKAHASHI, M.; NAGATE, M. Assay and inhibitors of spinach superoxide dismutase. **Agriculture and Biological Chemistry**, New York, v. 38, n. 2, p. 471-473, 1974.

BABITHA, M.P.U.; MADHU, D.; PRAKASH, H.S.; SHETTY, H.S. Production of polyclonal antisera to manganese superoxide dismutase expressed in downy mildew resistant pearl millet and its application for immunodiagnosis. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 9, n. 2, p. 133-143, 2006.

BAE, H.; KIM, M.S.; SICHER, R.C.; BAE, H.J.; BAILEY, B.A. Necrosis- and ethylene-inducing peptide from *Fusarium oxysporum* induces a complex cascade of transcripts and associated with signal transduction and cell death in arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 141, n. 3, p. 1056-1067, 2006.

BÁIDEZ, A.G.; GÓMES, P.; DEL RÍO, J.A.; ORTIÑO, 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, n. 4/6, p. 224-229, 2006.

BALAJI, V.; MAYROSE, M.; SHERF, O.; JACOB-HIRSCH, J. EICHENLAUB, R.; IRAKI, N.; MANULIS-SASSON, S.; RECHAVI, G.; BARASH, I.; SESSA, G. Tomato transcriptional changes in response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* reveal a role for ethylene in disease development. **Plant Physiology**, Rockville, v. 146, p. 1797-1809, 2008.

BALLESTER, A.R.; LAFUENTE, M.T.; GONZÁLEZ-CANDELAS, L. Spatial study of antioxidant enzymes, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in the citrus fruit–*Penicillium digitatum* interaction. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 39, p. 115-124, 2006.

BARMORE, C.R.; BROWN, G.E. Influence of ethylene on increased susceptibility of oranges to *Diplodia natalensis*. **Plant Disease**, Sant Paul, v. 69, p. 228-230, 1985.

BASSANEZI, R.B.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; BERGER, R.D. Gas exchange and emission of chlorophyll fluorescence during the monocycle of rust, angular leaf spot and anthracnose on bean leaves as a function of their trophic characteristics. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 150, p. 37-47. 2002.

BAYSAL, Ö; TURGUT, C.; MAO, G. Acibenzolar-S-methyl induced resistance to *Phytophthora capsici* in pepper leaves. **Biologia Plantarum**, London, v. 49, n. 4, p. 599-604, 2005.

BEERS, R.F. JR.; SIZER, I.W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 195, p. 133-140, 1952.

BEFFA, R.S.; HOFER, R.M.; THOMAS, M.; MEINS JUNIOR, F. Decreased susceptibility to viral disease of β-1,3-glucanase-deficient plants generated by antisense transformation. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 6, p. 1001-1011, 1996.

BÉKÉSIOVÁ, B.; HRAŠKA, Š.; LIBANTOVÁ, J.; MORAVČÍKOVÁ, J.; MATUŠÍKOVÁ, I. Heavy-metal stress induced accumulation of chitinase isoforms in plants. **Molecular Biology Reports,** Dordrecht, v. 35, p. 579-588, 2008.

BELTRANO, J.; RONCO, M.G.; MONTALDI, E.R. Drought stress syndrome in wheat is provoked by ethylene evolution imbalance and reversed by rewatering, aminoethoxyvinylglycine, or sodium benzoate. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v.18, p. 59-64, 1999.

BERETTA, M. J. G. POMPEU JÚNIOR, J.; DERRICK, K.S. Evaluation of rootstocks in Brazil for field resistance to declinio. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 1992. Acireale. **Proceedings...** Acireale, 1992. p.841-843.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. Importância das doenças de plantas. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia. Princípios e conceitos**. São Paulo, Editora Agronômica Ceres, 1995. 919p. v. 1.

BERRY, S.D.; FARGETTE, M.; SPAULL, V.W.; MORAND, S.; CADET, P. Detection and quantification of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*), lesion nematode (*Pratylenchus zeae*) and dagger nematode (*Xiphinema elongatum*) parasites of sugarcane using real-time PCR. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 22, p. 168-176, 2008.

BEZANSON, G.S.; DESATY, D.; EMES, A,V.; VINING, L.C. Biosynthesis of cinnamamide and detection of phenylalanine ammonia-lyase in *Streptomyces verticillatus*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.16, p.147-151, 1970.

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

BLAKER, N.S.; MacDONALD, J.D. The role of salinity in the development of phytophthora root rot of citrus. **Phytopathology**, Lancaster, v. 76, p. 970-975, 1986.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 54, p. 519-546, 2003.

BORDIGNON, R.; MEDINA FILHO, H.P.; SIQUEIRA, W.J.; PIO, R.M. Características da laranjeira 'Valência' sobre clones e híbridos de porta-enxertos tolerantes à tristeza. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 3, p. 381-395, 2003.

BOSTOCK, R.M. Signal conflicts and synergies in induced resistance multiples attacks. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, p. 99-109, 1999.

BOSTOCK, R.M. Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 545-580, 2005.

BOUDJEKO, T.; OMOKOLO, N.A.; DRIOUICH, A.; BALANGÉ, A.P. Peroxidase and pectin methylesterase activities in cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott) roots upon *Pythium myriotylum* inoculation. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 153, n. 7/8, p. 409-416, 2005.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.

BRAKKE, M.; ALLEN, Jr., L.H. Gas exchange of citrus seedlings at different temperatures, vapor-pressure deficits, and soil water content. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, v. 120, p. 497-504, 1995.

BRENOT, A.; KING, K.Y.; JANOWIAK, B.; GRIFFJTH, O.; CAPARON, M.G. Contribution of glutathione peroxidase to the virulence of *Streptococcus pyogenes*. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 72, n. 1, p. 408-413, 2004.

BRIGHT, D.B.; GRAHAM, J.H.; IREY, M.S.; BAUCUM, L.E. Soil, rootstock and climatic factors affect populations of *Phytophthora nicotianae* in south Florida citrus plantings. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Winter Haven, v. 117, p. 148-151, 2004.

BROADBENT, P.; GOLLNOW, B.I. Selecting disease resistant citrus rootstocks. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Collingwood, v. 33, p. 775-780, 1993.

BROWN, I.; TRETHOWAN, J.; KERRY, M.; MANSFIELD, J.; BOLWELL, G. P. Localization of components of the oxidative cross-linking of glycoproteins and of callose synthesis in papillae formed during the interaction between non-pathogenic strains of *Xanthomonas campestris* and French bean mesophyll cells. **Plant Journal**, Malden, v. 15, n. 3, p. 333-343, 1998.

BUCHNER, P.; ROCHAT, C.; WUILLEME, S.; BOUTIN, J.P. Characterization of a tissue-specific and developmentally regulated β-1,3-glucanase gene in pea. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 49, p. 171-186, 2002.

CAHILL, D., LEGGE, N., GRANT, B., AND WESTE, G. Cellular and 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.

CAHILL, D.; MCCOMB, J. A comparison of changes in phenylalanine ammonia-lyase activity, lignin and phenolic synthesis in the roots of *Eucalyptus calophylla* (field resistant) and *E. marginata* (susceptible) when infected with *Phytophthora cinnamomi*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 40, n.5, p. 315-332, 1992.

CHEN, J.S.; CHAREST, D.J.; MARSHALL, M.R.; WEI, C.I. Comparison of two treatment methods on the purification of shrimp polyphenol oxidase. **Journal of The Science of Food and Agriculture**, Chichester, v. 75, p. 12-18, 1997.

CHEN, K.; FENG, H.; ZHANG, M.; WANG, X. Nitric oxide alleviates oxidative damage in the green alga *Chlorella pyrenoidosa* caused by UV-B radiation. **Folia Microbiologica**, Dordrecht, v. 48, p. 3, p. 389-393, 2003.

CHEN, S.C.; LIU, A.R.; ZOU, Z.R. Overexpression of glucanase gene and defensin gene in transgenic tomato enhances resistance to *Ralstonia solanacearum*. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 53, n. 5, p. 671-677, 2006.

CHEN, X.R.; WANG, X.L.; ZHANG, Z.G.; WANG, Y.C.; ZHENG, X.B. Differences in the induction of the oxidative burst in compatible and incompatible interactions of soybean and *Phytophthora sojae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 73, p. 16-24, 2008.

CHEONG, J.J.; CHOI, Y.D. Signaling pathways for the biosynthesis and activation of jasmonates. **Journal of Plant Biology**, New York, v. 50, n. 2, p. 122-131, 2007.

CHOI, H.W.; KIM, Y.J.; LEE, S.C.; HONG, J.K.; HWANG, B.K. Hydrogen peroxide generation by pepper extracellular peroxidase CaPO2 activates local and systemic cell death and defense response to bacterial pathogens. **Plant Physiology**, Rockville, v. 145, p. 890-904, 2007.

CHRISTENSEN, J.H.; BAUW, G.; WELINDER, K.G.; VAN MONTAGU, M.; BOERJAN, W. Purification and characterization of peroxidases correlated with lignification in poplar xylem. **Plant Physiology**, Rockville, v. 118, p. 125-135, 1998.

CLEMENZ, C.; FLEISCHMANN, F.; HÄBERLE, K.; MATYSSEK, R.; OßWALD, W. Photosynthetic and leaf water potential responses of *Alnus glutinosa* saplings to stem-base inoculation with P*hytophthora alni* subsp. *alni*. **Tree Physiology**, Oxford, UK, v. 28, p. 1703-1711, 2008.

COHEN, Y.; GISI, U.; NIEDERMAN, T. Local and systemic protection against *Phytophthora infestans* induced in potato and tomato plants by jasmonic acid and jasmonic acid methyl ester. **Phytopathology**, Lancaster, v 83, p. 1054-1062, 1993.

COLBURN, G.C. **Biological and molecular characterization of a hypovirulent isolate of *Phytophthora nicotianae* on citrus**. 2004. 102p. Dissertação (Doutorado em Filosofia), Universidade da Florida, Gainesville,2004.

CONRATH, U.; LINKE, C.; JEBLICK, W.; GEIGENBERGER, P.; QUICK, W.P.; NEUHAUS, N. Enhanced resistance to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani* in leaves and tubers, respectively, of potato plants with decreased activity of the plastidic ATP/ADP transporter. **Planta**, New York, v.19, p. 75-83, 2003.

COOPER, J.B.; VARNER, J.E. Insolubilization of hydroxyproline-rich cell wall glycoprotein in aerated carrot root slices. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 112, n. 1, p. 161-167, 1983.

CORDERO, M.J.; RAVENTOS, D.; SAN SEGUNDO, B. Differential expression and induction of chitinases and β-1,3-glucanases in response to fungal infection during germination of maize seeds. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Sant Paul, v. 7, p. 23-31, 1994.

CORDEIRO, R.A.; GOMES, V.M.; CARVALHO, A.F.U.; MELO, V.M.M. Effect of proteins from the red seaweed *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux on the growth of human pathogen yeasts. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, n. 6, p. 915-921, 2006.

COWAN IR. Stomatal behavior and environment. In: PRESTON, R.D.; WOOLHOUSE, H.W. (Ed.). **Advances in Botanical Research**. London, Academic Press, 1977. 451p. v.4.

CREELMAN, R.A.; TIERNEY, M.L.; MULLET, J.E. Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** Washington, DC, v. 89, p. 4938-4941, 1992.

CSINOS, A.C. BELTRAND, P.F. Distribution of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* races and their sensitivity to metalaxyl in Georgia. **Plant Disease**, Sant Paul, v. 78, p. 471-474, 1994.

CUSTERS, J.H.H.V.; HARRISON, S.J.; SELA-BUULAGE, M.B.; VAN DEVENTER, M.; LAGEWEG, W.; HOWE, P.W.; VAN DER MEIJS, P.; PONTEIN, A.S.; SIMONS, B.H.; MELCHERS, L.S.; STUIVER, M.H. Isolation and characterization of class of carbohydrate oxidases from higher plants, with a role in active defence. **The Plant Journal**, Oxford, UK, v. 39, p. 147-160, 2004.

Da SILVA, C.R.; FOLEGATTI, M.V.; da SILVA, T.J.A.; ALVES JÚNIOR,J.; SOUZA, C.F.; RIBEIRO, R.V. Water relations and photosynthesis as criteria for adequate irrigation management in 'Tahiti' lime trees. S**cientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 5, p. 415-422, 2005.

DAHIYA, N.; TEWARI, R.; HOONDAL, G.S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 71, p. 773-782, 2006.

DAI, L.P.; XIONG, Z.T.; YU, H.; LI, M.J. Cadmium-induced changes in pigments, total phenolics, and phenylalanine ammonia-lyase activity in fronds of *Azolla imbricata*. **Environmental Toxicology**, Hoboken, v. 21, n. 5, p. 505-512, 2006.

DANA, M.M; PINTOR-TORO, J.A.; CUBERO, B. Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. **Plant Physiology**, Rockville, v.142, p. 722-730, 2006.

DANDURAND, L.M.; MENGE, J.A. Influence of *Fusarium solani* on citrus root rot caused by *Phytophthora parasitica* and *Phytophthora citrophthora*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 144, p. 13-21, 1992.

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

DAS, A.K. Citrus canker - a review. **Journal of Applied Horticulture**, Lucknow, v. 5, n. 1 p. 52-60, 2003.

DAVLETOVA, S.; RIZHSKY, L.; LIANG, H.; SHENGQIANG, Z.; OLIVER, D.J.; COUTU, J.; SHULAEV, V.; SCHLAUCH, K.; MITTLER, R. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 1, p. 268-281, 2005.

De PINTO,M.C.; PARADISO, A.; LEONETTI, P.; DE GARA, L.; Hydrogen peroxide, nitric oxide and cytosolic ascorbate peroxidase at the crossroad between defence and cell death. **The Plant Journal**, Oxford, UK, v. 48, p. 784-795, 2006.

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

DELANEY, T.P. Genetic dissection of acquired resistance to disease. **Plant Physiology**, Rockville, v. 113, p. 5-12, 1997.

DIEZEL, C.; VON DAHL, C.C.; GAQUEREL, E.; BALWIN, I.T. Different lepidopteran elicitors account for cross-talk in herbivory-induced phytohormone signaling. **Plant Physiology**, Rockville, v. 150, p. 1576-1586, 2009.

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

DIXON. R.A.; PAIVA, N. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 7, p. 1085-1097, 1995.

DJOCGOUE, P.F; BOUDJEKO, T.; MBOUOBDA, H.D.; NANKEU, D.J.; EL HADRAMI, I.; OMOKOLO, N.D. Heritability of phenols in the resistance of *Theobroma cacao* against *Phytophthora megakarya*, the causal agent of black pod disease. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 155, p. 519-525, 2007.

DOBLIN, M.S.; DEMELIS, L.; NEWBIGIN, E.; BACIC, A.; READ, S.M. Pollen tubes of *Nicotiana alata* express two genes from different β-glucan synthase families. **Plant Physiology**, Rockville, v.125, p. 2040-2052, 2001.

DONADIO, L.D.; MOURÃO FILHO, F. de A.A.; MOREIRA, C.S. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: de MATTOS JÚNIOR, DIRCEU, de NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas, IAC/FUNDAG, 2005. v. 1. 929p.

DONG, X.; MINDRINOS, M.; DAVIS, K.R.; AUSBEL, F.M. Induction of arabidopsis defense genes by virulent and avirulent *Pseudomonas syringae* strains and by a cloned avirulence gene. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 3, p. 61-72, 1991.

DOWNER, A.J.; MENGE, J.A.; POND, E. Effects of cellulytic enzymes on *Phytophthora cinnamomi*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 91, p. 839-846, 2001.

DU, Y.Y.; WANG, P.C.; CHEN, J.; SONG, C.P. Comprehensive functional analysis of the catalase gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Integrative Plant Biology**, Malden, v. 50, n. 10, p. 1318-1326, 2008.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R.K.O. A comparative study of polyphenol oxidases from taro (C*olocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, London, v. 64, p. 351-359, 1999.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method form determination of sugars and related substances. **Nature**, London, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

DUBUIS, P.H.; MARAZZI, C.; STÄDLER, E.; MAUCH, F. Sulphur deficiency causes a reduction in antimicrobial potential and leads to increased disease susceptibility of oilseed rape. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 153, p. 27-36, 2005.

DUNCAN, L.W.; GRAHAM, J.H.; TIMMER, L.W. Seasonal patterns associated with *Tylenchulus semipenetrans* and *Phytophthora parasitica* in citrus rhizosphere. **Phytopathology**, Lancaster, v. 83, p. 573-581, 1993.

DUTTA, S.; BIGGS, R.H. Regulation of ethylene in citrus leaves infected with *Xanthomonas campestris* pv. citri. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 82, n. 2, p. 225-230, 1991.

EGEA, C.; AHMED, S.A.; CANDELA, M.E. Elicitaton of peroxidase activity and lignin biosynthesis in pepper suspension cell by *Phytophthora capsici*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 158, p. 151-158, 2001.

EHNESS, R.; ECKER, M.; GODT, D.E.; ROITSCH, T. Glucose and stress independently regulate source and sink metabolism and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation. **Plant Cell**, Rockville, v. 9 p. 1825-1841, 1997.

EL-AWADY, M.; MOGHAIEB, R.E.A.; HAGGAG, W.; YOUSSEF, S.S.; EL-SHARKAWY, A.M. Transgenic canola plants over-expressing bacterial catalase exhibit enhanced resistance to *Peronospora parasitica* and *Erysiphe polygoni*. **Arab Journal of Biotechnology**, Giza, v. 11, n. 1, p.71-84, 2008.

EL-BELTAGY; HALL, M.A. Effect of water stress upon endogenous ethylene levels in *Vicia faba*. **New Phytologist**, Malden, v. 73, n. 1, p. 47-59, 1974.

EL GHAOUTH, A.; WILSON, C.L.; CALLAHAN, A.M. Induction of chitinase, β-1,3-glucanase, and phenylalanine ammonia lyase in peach fruit by UV-C treatment. **Phytopathology**, Lancaster, v. 93, n.3., p. 349-355, 2003.

EL-KATATNY, H.M.; GUDELJ, M.; ROBRA, K.H.; ELNAGHY, M.A.; GÜBITZ, G.M. Characterization of a chitinase and an endo-β-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 56, p. 137-143, 2001.

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

ESPIN, J.C.; VARON, R.; FENOLL, L.G.; GILABERT, M.A.; GARCIA-RUIZ, P.A.; TUDELA, J.; GARCIA-CANOVAS, F. Kinetic characterization of the substrate specificity and mechanism of mushroom tyrosinase. **European Journal of Biochemistry**, London, v. 267, p. 1270-1279, 2000.

ESSMANN, J.; SCHMITZ-THOM, I.; SCHÖN, H.; SPNNEWALD, S.; WEIS, E.; ASCHATE, J.RNA Interference-mediated repression of cell wall invertase impairs defense in source leaves of tobacco. **Plant Physiolog**y, Rockville, v.147, p. 1288-1299, 2008.

FAJARDO, J.E.; McCOLLUM, T.G.; McDONALD, R.E.; MAYER, R.T. Differential induction of proteins in orange flavedo by biologically based elicitors and challenged by *Penicillium digitatum* Sacc. **Biological Control,** San Diego, v. 13, p. 143-151, 1998.

FARQUHAR, G.D.; SHARKEY, T.D. Stomatal conductance and photosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology**, Boca Raton, v.33, p. 317345, 1982

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

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE JÚNIOR, J. Doenças dos Citros. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2005, cap 28, v.2, p. 239-269.

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

FLEISCHMANN, F.; WINKLER, J.B.; OßWALD W. Effects of ozone and *Phytophthora citricola* on non-structural carbohydrates of European beech (*Fagus sylvatica*) saplings. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 33, n. 1/2, p. 75-84, 2009.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Citros. In _____. **Agrianual 2009**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2002. p. 267-300.

FOURIE, A. **Biochemical mechanisms for tolerance of citrus rootstocks against *Phytophthora nicotianae***. 2004. 112 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculty of natural and agricultural sciences, Universidade de Pretoria, Pretoria, 2004.

FRANCIS, M.; LIN, H.; ROSA, J.C.; DODDAPANENI, H.; CIVEROLO, E.L. Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and quantification of *Xylella fastidiosa*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 115, p. 203-213, 2006.

FRITIG, B.; HEITZ, T.; LEGRAND, M. Antimicrobial proteins in induced plant defense. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 10, p. 16-22, 1998.

FUNDECITRUS. Prevenção começa na muda. **Revista do FUNDECITRUS**, Araraquara, n 123, p 12-13, 2004.

FURLANI, R.P. **Instruções para o cultivo de hortaliças de folhas pela técnica de hidroponia – NFT**. Campinas: Instituto Agronômico,1998. 30p. (Boletim Técnico n° 168).

FURUSE, K.; TAKEMOTO, D.; DOKE, N.; KAWAKITA, K. Involvement of actin filament association in hypersensitive reactions in potato cell. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 54, p. 51-61, 1999.

GACHON, C.; MINGAM, A; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 55, n. 402, p. 1445-1454, 2004.

GACHON, C.; SAINDRENAN, P. Real-time PCR monitoring of fungal development in *Arabidopsis thaliana* infected by *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 42, p. 367-371, 2004.

GARDNER, R.M.; TINDALL, G.W; CLINE, S.M.; BROWN, K.L. Ergosterol determination in activated sludge and its application as a biochemical marker for monitoring fungal biomass. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 17, p. 49-60, 1993.

GARNSEY, S. M.; BARRETT, H. C; HUTCHISON, D.J. Identification of citrus tristeza virus resistance in citrus relatives and its potential applications. **Phytophylactica**,Pretoria, v. 19, p. 187-191, 1987.

GAUDET, D.A.; LAROCHE, A.; FRICK, M.; HUEL, R.; PUCHALSHI, B. Plant development affects the cold-induced expression of plant defence-related transcripts in winter wheat. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 62, p. 175-184, 2003.

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

GAY, P.A.; TUZUN, S. Involvement of a novel peroxidase isozyme and lignification in hydathodes in resistance to black rot disease in cabbage. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 78, n. 9, p. 1144-1149, 2000.

GERAATS, B. P. J., BAKKER, P. A. H. M.; VAN LOON, L. C. Ethylene insensitivity impairs resistance to soilborne pathogens in tobacco and *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Sant Paul, v. 15, p. 1078-1085, 2002.

GERAATS, B.P.J.; PETER, 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, n. 7, p. 813-821, 2003.

GIBSON, R. W. Trapping the spider Mite *Tetranychus urticae* by glandular hairs on the wild potato *Solanum berthaultii*. **Potato Research**,Wageningen, v. 19, p. 179-182, 1976.

GIFFORD, R.M.; THORNE, J.H.; HITZ, W.D.; GIAQUINTA, R.T. Crop productivity and photoassimilate partitioning. **Science**, Washington, DC, v. 24, p. 801-808, 1984.

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.

GIMENO, J.; GADEA, J.; FORMENT, J.; PÉREZ-VALLE, J.; SANTIAGO, J.; MARTÍNEZ-GODOY, M.A.; YENUSH, L.; BELLÉS, J.M.; BRUMÓS, J.; COLMENERO-FLORES, J.M.; TALÓN, M.; SERRANO, R. Shared and novel molecular responses of mandarin to drought. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 70, p. 403-420, 2009.

GINZINGER, D.G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, New York, n. 30, p. 503-512, 2002.

GODOY, A.E. **Injúrias mecânicas e seus efeitos na fisiologia e na qualidade de mamões 'Golden'**, 2008. 70p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2008.

GOMES, M.M.A.; LAGÔA, A.M.M.A.; MEDINA, E.C.; MACHADO, C.L.; MACHADO, M.A. Gas exchanges and carbohydrate metabolism in orange trees with citrus variegated chlorosis. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 15, n. 1, p. 25-31, 2003.

GOMES-LARANJO, J.; ARAÚJO-ALVES, J.; FERREIRA-CARDOSO, J.; PIMENTEL-PEREIRA, M.; ABREU, C.G. Effect of chestnut ink disease on photosynthetic performance. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, p. 138-144, 2004.

GRAHAM, J.H.; MENGE, J.A. Phytophthora-induced diseases. In: TIMMER, L.W.; GARNSEY, S.M.; GRAHAM, J.H. (Ed.). **Compendium of Citrus Diseases**. Sant Paul: APS Press, 2000. 128p.

GRAHAM, M.Y.; GRAHAM, T.L. Rapid accumulation of anionic peroxidase and phenolic polymers in soybean cotyledon tissues following treatment with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* wall glucan. **Plant Physiology**, Rockville, v. 97, p. 1145-1155, 1991.

GRICHKO, V.P.; GLICK, B.R. Ethylene and flooding stress in plants, **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, n. 39, v. 1, p. 1-9, 2001.

GUAN, Z.Q.; CHAI, T.Y.; ZHANG, Y.X.; XU; J.; WEI, W. Enhancement of Cd tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing a Cd-induced catalase cDNA. **Chemosphere**, Oxford, UK, v. 76, p.623-630, 2009.

GUIMARÃES, N.C.C.; TEIXEIRA, J.E.C.; PAIVA, L.V.; DOS SANTOS, C.D. Quantificação de carboidratos presentes em tecidos condutores de laranja 'Pêra' sobre limão 'Cravo' afetada pelo declínio dos citros, **Laranja**, Cordeirópolis, v. 24, n.1, p. 113-124, 2003.

GUNDLACH, H.; MÜLLER, M.J.; KUTCHAN, T.M.; ZENK, M.H. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** Washington, DC, v. 89, p. 2389-2393, 1992.

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

GUZZO, S.D.; MARTINS, E.M.F. Local and systemic induction of β-1,3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 144, n. 9-10, p. 449-454, 1996.

HABERMANN, G.; MACHADO, E.C.; RODRIGUES, J.D.; MEDINA, C.L. Gas exchange rates at different vapor pressure deficits and water relations of 'Pera' sweet orange plants with citrus variegated chlorosis (CVC). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 98, p. 233-245, 2003.

HALIM, V.A.; ESCHEN-LIPPOLD, L.; ALTMANN, S.; BIRSCHWILKS, M.; SCHEEL, D.; ROSAHL, S. Salicylic acid is important for basal defense of *Solanum tuberosum* against *Phytophthora infestans*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Sant Paul, v. 20, n. 11, p. 1346-1352, 2007.

HAMALAINEN, H.K.; TUBMAN, J.C.; VIKMAN,S.; KYRO, T.; YLIKOSKI, E.; WARRINGTON, J.A.; LAHESMAA,R. Identification and validation of endogenous reference genes for expression profiling of T helper cell differentiation by quantitative real-time RT-PCR. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 299, p. 63-70, 2001.

HAMEL, F.; BOIVIN, R.; TREMBLAY, C.; BELLEMARE, G. Structural and evolutionary relationships among chitinases of flowering plants. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 44, n. 6, p. 614-624, 1997.

HANKIN, L.; McINTYRE, J.L. Production of kestoses (fructosylsucroses) by *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 33, n. 3, 1977.

HARTLEB, H.; HEITEFUSS, R.; HOPPE, H.H. **Resistance of crops plants against fungi**. Jena: Gustav Fischer, 1997. 544p.

HELLEBOID, S.; HENDRIKS, T.; BAUW, G.; INZÉ, D.; VASSEUR, J.; HILBERT, J.L. Three major somatic embryogenesis related proteins in *Cichorium* identified as PR proteins. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v.51, p. 1189-1200, 2000.

HEO, S.J.; PARK, E.J.; LEE, K.W.; JEON, Y.J. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. **Bioresource Technology**, Oxford, UK, v. 96, p. 1613-1623, 2005.

HERBERS, K.; MEUWLY, P.; MÉTRAUX, J.P.; SONNEWALD, U. Salicylic acid-independent induction of pathogeneses-related protein transcripts by sugars is dependent of leaf developmental stage. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 397, p. 239-244, 1996.

HERBETTE, S.; LENNE, C.; DE LABROUHE, D.T.; DREVET, J.R.; ROECKEL-DREVET, P. Transcripts of sunflower antioxidant scavengers of the SOD and GPX families accumulate differentially in response to downy mildew infection, phytohormones, reactive oxygen species, nitric oxide, protein kinase and phosphatase inhibitors. **Physiologia Plantarum**, Malden, v.119, n. 3, p. 418-428, 2003.

HERNÁNDEZ-ROMERO. D.; SOLANO, F.; SANCHEZ-AMAT, A. Polyphenol oxidase activity expression in *Ralstonia solanacearum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 71, n. 11, p. 6808-6815, 2005.

HERRMANN, K.M.; WEAVER, L.M. The shikimate pathway. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 473-503, 1999.

HERSHKOVITZ, V.; FRIEDMAN, H.; GOLDSCHMIDT, E.E.; FEYGENBERG, O.; PESIS, E. Induction of ethylene in avocado fruit in response to chilling stress on tree. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, 1855-1862, 2009.

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y. MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, UK, v. 42, n. 2, p. 462-468, 2001.

HOAC, T.; DAUN, C.; TRAFIKOWSKA, U.; ZACKRISSON, J.; ÅKESSON, B. Influence of heat treatment on lipid oxidation and glutathione peroxidase activity in chicken and duck meat. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Oxford, UK, v. 7, p. 88-93, 2006.

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

HONG, J.K.; HWANG, B.K. Induction by pathogen, salt and drought of a basic class II chitinase mRNA and its in situ localization in pepper (*Capsicum annuum*). **Physiologia Plantarum**, Malden, v.114, v. 4, p. 549-558, 2002.

HONG, T.Y.; CHENG, C.W.; HUANG, J.W.; MENG, M. Isolation and biochemical characterization of an endo-1,3-β-glucanase from *Streptomyces sioyaensis* containing a C-terminal family 6 carbohydrate-binding module that binds to 1,3-β-glucan. **Microbiology**, New York, v. 148, p. 1151-1159, 2002.

HUERTA-OCAMPO, J.A.; BRIONES-CERECERO, E.P.; MENDOZA-HERNÁNDEZ, G.; DE LÓN-RODRÍGUEZ, De La ROSA, A.P. Proteomic analysis of Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus L*) leaves under drought stress. **International Journal of Plant Science**, Chicago, v. 170, v. 8, p. 990-998, 2009.

HUGHES, T.J.; ATALLAH; Z.K.; GRAU, C.R. Real-time PCR assays for the quantification of *Phialophora gregata* f. sp. *sojae* IGS genotypes A and B. **Phytopathology**, Lancaster, v. 99, p. 1008-1014, 2009.

HURA, T.; GRZESIAK, S.; HURA, K.; THIEMT, E.; TOKARZ, K.; WEDZONY, M. Physiological and biochemical tools useful in drought-tolerance detection in genotypes winter triticale: accumulation of ferulic acid correlates with drought tolerance. **Annals of Botany**, Oxford, UK, v. 100, p. 767-775, 2007.

HURA, T.; HURA, K.; GRZESIAK, S. Contents of total phenolics and ferulic acid, and PAL activity during water potential changes in leaves of maize single-cross hybrids of different drought tolerance. **Journal of Agronomy & Crop Science**, Malden, v. 194, p. 104-112, 2008.

ISAAC, S. **Fungal and Plant interactions**. Cambridge: Chapman and Hall, 1992. 418p.

ISHII, T.; SOOTOME, H.; YAMASHITA, K. Practical evaluation of universal conditions for four-plex quantitative PCR. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Berlin, v. 388, n. 1, p. 271-278, 2007.

IVANOVA, D.G.; GUGHOVA, N.V.; MERZLYAK, M.N.; RASSADINA, G.V. Effect of *Phytophthora infestans* infection on superoxide dismutase dependent cytochrome c- reducing activities of leaves as related to resistance of potato plants to late blight. **Plant Science**, Clare, v. 78, p. 151-156, 1991.

IWATA, K.; NISHINAKA, T.; MATSUNO, K.; YABE-NISHIMURA, C. Increased gene expression of glutathione peroxidase-3 in diabetic mouse heart. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 29, n. 5. p. 1042-1045, 2006.

JACKSON, R.B.; SPERRY, J.S.; DAWSON, T.E. Root water uptake and transport: using physiological processes in global predictions. **Trend in Plant Science**, Kidlington, v. 5, n. 11, p. 482-488, 2000.

JAYARAJ, J.; MUTHUKRISHNAN, S.; LIANG, G.H.; VELAZHAHAN. Jasmonic acid and salicylic acid induce accumulation of β-1,3-glucanase and thaumatin-like proteins in wheat and enhance resistance against *Stagonospora nodorum*. **Biologia Plantarum**, London, v. 48, n. 3, p. 425-430, 2004.

JAYASURIYA, K.E.; WIJESUNDERA, R.L.C.; DERANIYAGALA, S.A. Isolation of anti-fungal phenolic compounds from petioles of two *Hevea brasiliensis* (rubber) genotypes and their effect on *Phytophthora meadii*. **Annals of Applied Biology**, Malden, v. 142, n. 1, p. 63-69, 2003.

JOHNSTONE, M.; CHATTARTON, S.; GRODZINSKI, B. Net carbon gain growth of bell peppers, *Capsicum annuum* 'Cubico' following root infection by *Pythium aphanidermatum*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 95, p. 354-361, 2005.

JOLIVET, S.; ARPIN, M.; WICHERS, H.J.; PELLON, G. *Agaricus bisporus* browning: a review. **Mycological Research**, Oxford, UK, v. 102, p. 1459-1483, 1998.

JONES L, ENNOS AR, TURNER SR. Cloning and characterization of irregular xylem 4 (irx4): a severely lignin-deficient mutant of Arabidopsis. **Plant Journal**, Malden, v. 26, n. 2, p. 205-216, 2001.

JONGEDIJK, E.; TIGELAAR, H.; VAN ROEKEL, J.S.C.;. BRES-VLOEMANS, S.A.; DEKKER, I.; VAN DEN ELZEN, P.J.M.; CORNELISSEN; B.J.C.; MELCHERS, L.S. Synergistic activity of chitinases and β-1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. **Euphytica**, Dordrecht, v. 85, n. 1/3, p. 173-180, 1995.

JU, Z.G.; YUAN, Y.B.; LIAN, C.L.; XIN, S.H. Relationships among phenylalanine ammonia-lyase activity, simple phenol concentrations and anthocyanin accumulation in apple. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 61, p. 215-226, 1995.

JUDELSON, H.S.; TANI, S.; NARAYAN, R.D. Metabolic adaptation of *Phytophthora infestans* during growth on leaves, tubers and artificial media. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 10, n. 6, p. 843-855, 2009.

KASPRZEWKA, A. Plant chitinases - regulation and function. **Cellular & Molecular Biology Letters**, Warsaw, v. 8, p. 809-824, 2003.

KEEN, N.; YOSHIKAWA, M.; WANG M. Phytoalexin elicitor activity of carbohydrates from *Phytophthora megasperma* f. sp *glycinea* and other sources. **Plant Physiology**, Rockville, v. 71, p. 466-471, 1983.

KELLAM, M.K.; COFFEY, M.D. Quantitative comparison of the resistance to Phytophthora root rot ih three avocado rootstocks. **Phytopathology**, Lancaster, v. 75, p. 230-234, 1985.

KELLER, H.; PAMBOUKDJIAN, N.; PONCHET, M.; POUPET, A.; DELON, R.; VERRIER, J.L.; ROBY, D.; RICCI, P. Pathogen-induced elicitin production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance. **Plant Cell**, Rockville, v. 11, n.2, p. 223-235, 1999.

KHAN, W.; PRITHIVIRAJ, B.; SMITH D.L. Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates. **Journal Plant Physiology**, Stuttgart, v. 160, p. 485-492, 2003.

KIKUCHI, T.; MASUDA, K. Class II chitinase accumulated in the bark tissue involves with the cold hardness of shoot stems in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum L.*). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 120, p. 230-236, 2009.

KIM, J.S.; SAGARAM, U.S.; BURNS, J.K.; LI, J.L.; AND WANG, N. Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' infection: Microscopy and microarray analyses. **Phytopathology**, Lancaster, v. 99, p. 50-57, 2009.

KIMBALL, D.A. Introduction. In: KIMBALL, D.A. (Ed.). **Citrus Processing**: a Complete Guide. 2nd ed. Gaithersburg, Aspen, 1999. v. 1. 450p.

KLESSING D.F.; MALAMY, J. The salicylic acid signal in plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht , v. 26, n. 5, p. 1439-1458, 1994.

KNOESTER, M.; LINTHORST, H. J.M.; BOL, J.F.; VAN LOON, L.C. Involvement of ethylene in lesion development and systemic acquired resistance in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 59, p. 45-57, 2001.

KNOESTER, M.; VAN LOON, L.C.; VAN DEN HEUVEL, J.; HENNIG, J.; BOL, J.F.; LINTHORST, H.J.M. Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 95, p. 1933-1937, 1998.

KOCA, H.; OZDEMIR, F.; TURKANI. Effect of salt stress on lipid peroxidation and superoxide dismutase and peroxidase activities of *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii*. **Biologia Plantarum**, London, v. 50, n. 4, p. 745-748, 2006.

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

KOMBRINK, E.; SCHMELZER. The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 69-78, 2001.

KOORNNNEEF, A.; PIETERSE, C.M.J. Cross talk defense signaling. **Plant Physiology**, Rockville, v. 146, p. 839-844, 2008.

KORKINA, L.G. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. : **Cellular and Molecular Biology**, Poitiers, v. 53, n. 1, p.15-25, 2007.

KRISTENSEN, B.K.; BLOCH, H.; RASMUSSEN, S.K. Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning, and induction by pathogens. **Plant Physiology**, Rockville, v. 120, p. 501-512, 1999.

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

KUŻNIAK, E.; SKŁODOWSKA, M. Fungal pathogen-induced changes in the antioxidant systems of leaf peroxisomes from infected tomato plants. **Planta**, New York, v. 222, p. 192-200, 2005.

LAGRIMINI, L.M.; JOLY, R.J.; DUNLAP, J.R.; LIU, T.T.Y. The consequence of peroxidase overexpression in transgenic plants on root growth and development. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 33, p. 887-895, 1997.

LAHEY, K.A.; YUAN, R.; BURNS, J.K.; UENG, P.P.; TIMMER, L.W.; CHUNG, K.R. Induction of phytohormones and differential gene expression in citrus flowers infected by the fungus C*olletotrichum acutatum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Sant Paul, v. 17, n. 12, p. 1394-1401, 2004.

LARANJEIRA, F.F.; AMORIM, L.A.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; COLETTA FILHO, H.D. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: de MATTOS JÚNIOR, DIRCEU, de NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas, IAC/ FUNDAG, 2005. 929p. v. 1.

LARSEN, R.C.; VANDEMARK, G.J.; HUGHES, T.J.; GRAU, C.R. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for quantifying *Verticillium albo-atrum* DNA in resistant and susceptible alfalfa. **Phytopathology**, Lancaster, v. 97, p. 1519-1525, 2007.

LATTANZIO, V.; LATTANZIO, V.M.T.; CARDINALI, A. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. In: Imperato, F. (Ed.). **Phytochemistry: Advances in Research**. Kerala, India: Research Signpost, 2006, chap 2, p. 23-67.

LAWSON, T. Guard cell photosynthesis and stomatal function. **New Phytologist**, Malden, v. 181, p. 13-34, 2009.

LEE, H.I.; LEÓN, J.; RASKIN, I. Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 92, p. 4076-4079, 1995.

LEE, S.H.; AHSAN, N.; LEE, K.W.; KIM, D.H.; LEE, D.G.; KWAK, S.S.; KWON, S.Y.; KIM, T.H.; LEE, B.H. Simultaneous overexpression of both CuZn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in transgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range of abiotic stresses. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.164, n. 12, p.1626-1638, 2007.

LEE, Y.K.; HIPPE-SANWALD, S.; JUNG, H.W.; HONG, J.K.; HAUSE, B.; HWANG, B.K. In situ localization of chitinase m RNA and protein in compatible and incompatible interactions of pepper stems with *Phytophthora capsici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 57, p. 111-121, 2000.

LEFORT, F.; DOUGLAS, G.C. An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus*. **Annals of Forest Science**, Les Ulis Cedex, v. 56, p. 259-263, 1999.

LEI, Y. Physiological responses of *Populus przewalskii* to oxidative burst caused by drought stress. R**ussian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 56, n. 5, p. 857-864, 2008.

LÉON, J.; LAWTON, M.A.; RASKIN, I. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. **Plant Physiology**, Rockville, v. 108, p. 1673-1678, 1995.

LERS, A.; JIANG, W.B.; LOMANIEC, E.; AHARON, N. Proteins functionally and immunogenically related to pathogenesis-related proteins are induced during parsley leaf senescence. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 103, n. 4, p. 497-502, 1998.

LEUBNER-METZGER, G. Functions and regulation of β-1,3-glucanases during seed germination, dormancy release and after-ripening. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 13, p. 17-34, 2003.

LEUBNER-METZGER, G.; FRÜNDT, C.; VÖGELI-LANGE; R.; MEINS, F. Class I β-1,3-glucanase in the endosperm of tobacco during germination. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, 751-759, 1995.

LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 47, p. 273-279, 1972.

LI, G.; YEN, Y. Jasmonate and ethylene signaling pathway may mediate fusarium head blight resistance in wheat. **Crop Science**, Madison, v. 48, n. 5, p. 1888-1896, 2008.

LIEBEREI, R.; BIEHL, B. Activation of latent phenolase from spinach chloroplasts by ageing and by frost. **Phytochemistry**, Oxford, UK, v. 17, p. 1427-1429, 1978.

LIKE, C.; CONRATH, U.; JEBLICK, W.; BETSCHE, T.; MAHN, A.; DÜRING, K.; NEUHAUS, H.E. Inhibition of the plastidic ATP/ADP transporter protein primes potato tubers for augmented elicitation of defense responses and enhances their resistance against *Erwinia carotovora*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 129, n. 4, p. 1607-1615, 2002.

LIN, L.; MENG, X.; LIU, P.; HONG, Y.; WU, G.; HUANG, X.; LI, C.; DONG, J.; XIAO, L.; LIU, Z. Improved catalytic efficiency of Endo-β-1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* BME-15 by directed evolution **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 82, p. 671-679, 2009.

LINTHORST, H.J.M. Pathogenesis-related proteins of plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v. 10, n. 2, p. 123-150, 1991.

LIU, B.; LU, Y.; XIN, Z.; ZHAG, Z. identification and antifungal assay of a wheat β-1,3-glucanase. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 31, p. 1005-1010, 2009.

LO. S.C.; NICHOLSON, R.L. Compostos fenólicos e a importância nas doenças em plantas. Tradução de C.R. Tremacoldi. In: PASCHOLATI. S.F.; LEITE. B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta-Patógeno**: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular. Piracicaba: FEALQ, 2008. 627 p.

ŁOJKOWSKA, E.; HOŁUBOWSKA, M. The role of polyphenol oxidase and peroxidase in potato tuber resistance to soft rot caused by *Erwinia carotovora*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 136, n. 4, p. 319-328, 1992.

LOKHANDE, S.D.; OGAWA, K.; TANAKA, A.; HARA, T. Effect of temperature on ascorbate peroxidase activity and flowering of *Arabidopsis thaliana* ecotypes under different light conditions. **Journal of Plant Physiology**, New York, v. 160, p. 57-64, 2003.

LÓPEZ-GÁLVEZ, G.; SALTVEIT, M.; CANTWELL, M. Wound-induced phenylalanine ammonia lyase activity: factors affecting its induction and correlation with the quality of minimally processed lettuces. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 9, p. 223-233, 1996.

LUNA, C.M.; PASTORI, G.M.; DRISCOLL, S.; GROTEN, K.; BERNARD, S.; FOYER, C.H. Drought controls on H_2O_2 accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. **Virology**, Wien, v. 56, n. 411, p. 417-423, 2004.

MACHADO, M.A.; TARGON, M.L.P.N.; COLETTA-FILHO, D.L.; MÜLLER, G.W. Morte súbita dos citros, **Laranja**. Cordeirópolis, v.25, n.1, p.69-79, 2004.

MANIVANNAN, P.; JABDUL, C.A.; KISHOREKUMAR, A.; SANKAR, B.; SOMASUNDARAM, R.; SRIDHARAN, R.; PANNEERSELVAM, R. Changes in antioxidant metabolism of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. by propiconazole under deficit stress. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 57, p. 69-74, 2007.

MANSON, G.; CACIAGLI, P.; ACCOTTO, G.P.; NORIS, E. Real-time PCR for the quantitation of *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* in tomato plants and in *Bemisia tabaci*. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 147, p. 282-289, 2008.

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 elicitins. **Phytopathology**, Lancaster, v. 97, p. 850-856, 2007.

MARCOS, J.F.; GONZÁLEZ-CANDELAS, L.; ZACARÍAS, L. Involvement of ethylene biosynthesis and perception in the susceptibility of citrus fruits to *Penicillium digitatum* infection and the accumulation of defence-related mRNAs. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 56, n. 418, p. 2183-2193, 2005.

MARTINS, E.M.F. Proteínas relacionadas à patogênese. In: PASCHOLATI. S.F.; LEITE. B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta-Patógeno**: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular. Piracicaba: FEALQ, 2008. 627 p.

MARZLUF, G.A. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. **Microbiology and molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 61, n. 1, p. 17-32, 1997.

MASSALA, R.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. Effect of α-aminooxyacetate, a competitive inhibitor of phenylalanine ammonia-lyase, on the hypersensitive resistance of tobacco to tobacco mosaic virus. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 16, p. 213-226, 1980.

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

MAUCH, F.; MAUCH-MANI, B.; BOLLER, T. Antifungal hydrolases in pea tissue. **Plant Physiology**, Rockville, v. 88, p. 936-942, 1988.

MAUREL, M.; ROBIN, C.; CAPDEVIELLE, X.; LOUSTAU, D.; DESPREZ-LOUSTAUA, M. Effects of variable root damage caused by *Phytophthora cinnamomi* on water relations of chestnut saplings. **Annals of Forest Science**, Les Ulis Cedex, v. 58, p. 639-651, 2001.

MAXIMOVA, S.N.; MARELLI, J.P.; YOUNG, A.; PISHAK, S.; VERICA, J.A.; GUILTINAN, M.J. Over-expression of a cacao class I chitinase gene in T*heobroma cacao* L. enhances resistance against the pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides*. **Planta**, New York, v. 224, n. 4, p. 740-749, 2006.

MAYER, A.M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. **Phytochemistry**, Oxford, UK, v. 67, p. 2318-2331, 2006.

McLEOD; A.; SMART; C.D.; FRY, W.E. Characterization of 1,3-β-glucanase and 1,3;1,4-β-glucanase genes from *Phytophthora infestans.* **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v. 38, p. 250-263, 2003.

MEDINA, C.L.; MACHADO, E.C.; GOMES, M.M.A. Condutância estomática, transpiração e fotossíntese em laranjeira 'Valência' sob deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 11, p. 29-34, 1999.

MEDINA, C.L.; RENA, A.B.; SIQUEIRA, D.L.; MACHADO, E.C. Fisiologia dos citros. In: de MATTOS JÚNIOR, DIRCEU, de NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas, IAC/FUNDAG, 2005. v. 1. 929p.

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

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

MEIJER, H.J.G.; VAN DE VONDERVOORT, P.J.I; YIN, Q.Y.; KOSTER, C.G.; KLIS, F.M.; GOVERS, F.; GROOT, P.W.J. Identification of cell wall-associated proteins from *Phytophthora ramorum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Sant Paul, v. 19, n. 12, p. 1348-1358, 2006.

MENOSSI, M.; MARTÍNEZ-IZQUIERDO, J.A.; PUIDDOMÈNECH, P. Promoter tissue specific activity and ethylene control of the gene coding for the maize hydroxyproline-rich glycoprotein in maize cells transformed by particle bombardment. **Plant Science**, Co. Clare, v. 125, p. 189-200, 1997.

MESSIAS, U. **Atividade da superóxido dismutase, catalase, peroxidases e acúmulo de H_2O_2 associados à infecção de um Carlavirus em soja e um Potyvirus no feijoeiro**. 2008. 81 p (Tese Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

MISHRA, A.K.; SHARMA, K.; MISRA, R.S. Purification and characterization of elicitor protein from *Phytophthora colocasiae* and basic resistance in *Colocasia esculenta*. **Microbiological Research**, Jena, v. 164, n. 6, p.688-693, 2009.

MITHÖFER, A.; MÜLLER, B.; WANNER, G.; EICHACKER, L. A. Identification of defence-related cell wall proteins in *Phytophthora sojae*-infected soybean roots by ESI-MS/MS. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 3, n. 3, p. 163-163 , 2002.

MIYAIRI, K.; KONNO, K.; HRADA, Y.; PKUNO, T. Fungus fruit body lytic enzyme from a myxomycete, *Badhamia utricularis*. **Mycoscience**, Tokyo, v. 35, n. 2, p. 169-174, 1994.

MOFFITT, M.C.; LOUIE, G.V.; BOWMAN, M.E.; PENCE, J.; NOEL, J.P.; . MOOREU, B.S. Discovery of two cyanobacterial phenylalanine ammonia lyases: kinetic and structural characterization. **Biochemistry**, Washington, DC, v. 46, n. 4. p. 1004-1012, 2007.

MOHRM, P.G.; CAHILL, D.M. Relative roles of glyceollin, lignin and the hypersensitive response and the influence of ABA in compatible and incompatible interactions of soybeans with *Phytophthora sojae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 58, p. 31-41, 2001.

MORESHET, S.; COHEN, S.; ASSOR, Z.; BAR-JOSEPH, M. Water relations of citrus exocortis tis viroid-infected grapefruit trees in the field. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 49, n. 325, p. 1421-1430, 1998.

MUNIZ, M DE F. S.; QUEIROZ, F.M.; MENEZES, M. Caracterização de isolados de *Phytophthora* patogênicos a *Citrus sinensis* no Estado de Alagoas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 201-204, 2004.

MUNZ, B.; FRANK, S.; HÜBNER, G.; OLSEN, E.; WERNER, S. A novel type of glutathione peroxidase: expression and regulation during wound repair. **Biochemistry Journal**, London, n. 326, p. 579-585, 1997.

MURATA, M.; TSURUTANI, M.; HAGIWARA, S.; HOMMA, S. Subcellular location of polyphenol oxidase in apples. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 61, p. 1495-1499, 1997.

NAZEEM, P.A.; ACHUTHAN, C.R.; BABU, T.D.; PARAB, G.V.; GIRIJA, D.; KESHAVACHANDRAN1, R. SAMIYAPPAN, R. Expression of pathogenesis related proteins in black pepper (*Piper nigrum* L.) in relation to Phytophthora foot rot disease. **Journal of Tropical Agriculture**, Thrissur, v. 46, n. 1/2, p. 45-51, 2008.

NDOUMOU, D.O.; NDZOMO, G.T.; DJOCGOUE, P.F. Changes in carbohydrate, amino acid and phenol contents in cocoa pods from three clones after infection with *Phytophthora megakarya* Bra. and Grif. **Annals of Botany**, Oxford, UK, v. 77, p. 153-158, 1996.

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

NIDERMAN, T.; GENETET, I.; BRUYÈRE, T.; GEES, R. STINTZI, A.; LEGRAND, M.; FRITING, B.; MÖSINGER, E. Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. **Plant Physiology**, Rockville, v. 180, n. 1, p. 17-27, 1995.

NOBEL, P.S. **Physicochemical and environmental plant physiology**. San Diego: Academic Press, 1999. 474p.

NUKUI, N.; EZURA, H.; YUHASHI, K.I.; YASUTA, T.; MINAMISAWA, K. Effects of ethylene precursor and inhibitors for ethylene biosynthesis and perception on nodulation in *Lotus japonicus* and *Macroptilium atropurpureum*. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, UK, v. 41, n. 7, p. 893-897, 2000.

O'BANNON J.H.; FORD, H.W. Resistance in citrus rootstocks to *Radopholus similis* and *Tylenchulus semipenetrans* (Nematoda). In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 1978. Sydney. **Proceedings...** Sydney: International Society of Citriculture, 1978. p. 544-549.

OKEY, E. N.; DUNCAN, E. J.; SIRJU-CHARRAN, G.; SREENIVASAN, T. N.; Phytophthora canker resistance in cacao : Role of peroxidase, polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia-lyase. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 145, n. 7, p. 295-299, 1997.

ONSA, G.H.; BIN SAARI, N.; SELAMAT, J.; BAKAR, J. Latent polyphenol oxidases from sago log (*Metroxylon sagu*): partial purification, activation, and some properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 48, n. 10, p. 5041-5045, 2000.

ORBOVIĆ, V.; SYVERTSEN, J.P.; BRIGHT, D.; VAN CLIEF, D.L.; GRAHAM J.H. Citrus seedling growth and susceptibility to root rot as affected by Phosphite and Phosphate. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 31, p. 774-787, 2008

ORLANDO, C.; PINZANI. P.; PAZZAGLI, M. Developments in Quantitative PCR. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, Berlin, v. 36, n. 5, p. 255-269, 1998.

ORTUÑO, A.; NEMSA, I.; ALVAREZ, N.; LACASA, A.; PORRAS, I.; LIDÓN, A.G.; DEL RÍO, J.A. Correlation of ethylene synthesis in Citrus fruits and their susceptibility to *Alternaria alternata* pv. *citri*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 72, p. 162-166, 2008.

OZERETSKOVSKAYA, O.L.; VASYUKOVA, N.I.; PANINA, Y.S.; CHALENKO, G.I. Effect of immunomodulators on potato resistance and susceptibility to *Phytophthora infestans*. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 53, n. 4, p. 488-494, 2006.

PAOLACCI, A.R.; D'OVIDIO, R.; MARABOTTINI, R.; NALI, C.; LORENZINI, G.; ABENAVOLI, R.M.; BADIANI, M. Ozone induces a differential accumulation of phenylalanine ammonia-lyase, chalcone synthase and chalcone isomerase RNA transcripts in sensitive and resistant bean cultivars. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 28, p. 425-428, 2001.

PASCHOLATI, S.F. Fitopatógenos: Arsenal enzimático. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia. Princípios e Conceitos**. São Paulo, Editora Agronômica Ceres, 1995. v. 1. 919p.

PATIL, R.S.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M.V. Chitinolytic enzymes: an exploration. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 26, p. 473-483, 2000.

PENNINCKX, I.A.M.A.; EGGERMONT, K.; TERRAS, F.R.G.; THOMMA, B.P.H.J.; DE SAMBLANX, G.W.; BUCHALA, A.; METRAUX, J.P.; MANNERS, J.M.; BROEKAERT, W.F. Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in Arabidopsis follows a salicylic acid-independent pathway. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 2309-2323, 1996.

PERSSON, K.; HAMBY, K.; UGOZZOLI, L.A. Four-color multiplex reverse transcription polymerase chain reaction - Overcoming its limitations. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 344, n.1, p. 33-42, 2005.

PIO, R.M.; de FIGUEREDO, J.O.; STUCHI, E.S.; CARDOSO, S.A. de B. Variedades copas. In: de MATTOS JÚNIOR, DIRCEU, de NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC/FUNDAG, 2005. v. 1. 929p.

PLASSARD, C.S.; MOUSAIN, D.G.; SALSAC, L.E. Estimation of mycelial growth of basidiomycetes by means of chitin determination. **Phytochemistry**, Oxford, UK, v. 21, p. 345-348, 1982.

PLOETZ, R. C.; SCHAFFER, B. Effects of flooding and *Phytophthora* root rot on net gas exchange and growth of avocado. **Phytopathology**, Lancaster, v. 79, p. 204-208, 1989.

POMPEU JÚNIOR, J. Porta-enxertos para citros. In: RODRIGUEZ, O., VIEGAS, F.C.P., POMPEU JÚNIOR, J., et al. **Citricultura brasileira**. 2. ed. Campinas : Fundação Cargill, 1991. v.1, p.265-280.

POMPEU JÚNIOR, J. Porta-enxertos. In: de MATTOS JÚNIOR, DIRCEU, de NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC/FUNDAG, 2005. v. 1. 929p.

PONMURUGAN, P.; BABY; U.I.; RAJKUMAR, R. Growth, photosynthetic and biochemical responses of tea cultivars infected with various diseases. **Photosynthetica**, Dordrecht, n. 45, v. 1, p. 143-146, 2007.

PORTZ, R.L.; KOEHL, J.; FLEISCHMANN, F.; OßWALD, W. Physiological changes and gene expression on european beech (*Fagus sylvatica*) infected with *Phytophthora citricola*. In: IUFRO Phytophthoras in Forests & Natural Ecosystem, 4, 2007. Monterey. **Proceedings...** Monterey: USDA, Oregon State University, University of California, California Oak Mortality Task Force. Abstract p. 310.

PRINSLOO, G.; MEYER, J.J.M. In vitro production of phytoalexins by *Helichrysum kraussii*. **South African Journal of Botany**, Amsterdam, v. 72, p. 482-483, 2006.

PURCINO, R.P.; MEDINA, C.L.; DE SOUZA, D.M.; WINCK, F.V.; MACHADO, E.C.; NOVELLO, J.C.; MACHADO, M.A.; MAZZAFERA, P. *Xylella fastidiosa* disturbs nitrogen metabolism and causes a stress response in sweet orange *Citrus sinensis* cv. Pêra. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 58, n. 11, p. 2733-2744, 2007.

QUIROGA, M.; GUERRERO, C.; BOTELLA, M.A.; BARCELÓ, A.; AMAYA, I.; MEDINA, M.I.; ALONSO, F.J.; DE FORCHETTI, S.M.; TIGIER, H.; VALPUESTA, V. A. Tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, p. 1119-1127, 2000.

RAMAMOORTHY, V.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. Enhancing resistance of tomato and hot pepper to Pythium diseases by seed treatment with fluorescent pseudomonads. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, n. 4, p. 429-441, 2002.

RANATHUNGE, K.; THOMAS, R.H.; FANG, X.; PETERSON, C.A.; GIJZEN, M.; BERNARDS, M.A. Soybean root suberin and partial resistance to root rot caused by *Phytophthora sojae*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 98, n. 11, p. 1179-1189, 2008.

RAY, H; HAMMERSCHMIDT, R. Responses of potato tuber to infection by *Fusarium sambucinum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 53, p. 81-92, 1998.

RESENDE, M.L.V.; MEPSTED, R.; FLOOD, J.; COOPER, M.R. Water relations and ethylene production as related to symptom expression in cocoa seedlings infected with defoliating and non-defoliating isolates of *Verticillium dahliae*. **Plant Pathology**, London, v. 45, p. 964-972, 1996.

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

RIBEIRO, R.V. **Variação sazonal da fotossíntese e relações hídricas de laranjeira 'Valência'**. 2006. 157p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2006.

RIBEIRO, R.V.; MACHADO, EC.; OLIVEIRA, R.F. Early photosynthetic responses of sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 62, n. 3, p.167-173, 2003.

RIOV, J.; MONSELISE, S.P.; KAHAN, R.S. Ethylene-controlled induction of phenylalanine ammonia-lyase in citrus fruit peel. **Plant Physiology**, Rockville, v. 44, p. 631-635, 1969.

RITTER, H. SCHULZ, G.E. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase. **The Plant Cell**, Baltimore,v. 16, p. 3426-3436, 2004.

RIVERO, R.M.; RUIZ, J.M.; GERCÍA, P.C.; LÓPES-LEFEBRE, L.R.; SÁNCHEZ, E.; ROMERO, L. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. **Plant Science**, Clare, v. 160, p. 312-321, 2001.

ROBIN, C.; CAPRON, G.; DESPREZ-LOUSTAU, M.L. Root infection by *Phytophthora cinnamomi* in seedlings of three oak species. **Plant Pathology**, London, v. 50, p. 708-716, 2001.

ROBINSON, S.P.; JACOBS, A.K.; DRY, I.B. A class IV chitinase is highly expressed in grape berries during ripening. **Plant Physiology**, Rockville, v. 114, n. 3, p. 771-778, 1997.

RODRIGUES, F.A.; JURICK II, W.M.; DATNOFF, L.E.; JONES, J.B.; ROLLINS, J.A. Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 66, p.144-159, 2005.

RONCATO, M.C.; PASCHOLAI, S.F. Alterações na atividade e no perfil eletroforético da peroxidase em folhas de milho (*Zea mays*) e sorgo (*Sorghum bicolor*) tratadas com levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 55, n. 3, p. 395-402, 1998.

ROSSETTI, V. Estudos sobre a gomose de *Phytophthora* dos citros I - Suscetibilidade de diversas espécies cítricas a algumas espécies de *Phytophthora.* **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 18, p.97-124, 1947.

RUIZ-DUENÃS, F.J.; MORALES, M.; MIKI, Y.; MARTÍNEZ, M.J.; MARTÍNEZ, A.T. Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 60, n. 2, p. 441-452, 2009.

RYALS, J.A.; NEUENSCHWANDER, U.H.; WILLITS, M.G.; MOLINA, A.; STEINER, H.Y.; HUNT, M.D. Systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 8, p. 1809-1819, 1996.

SAHOO, M.R.; DasGUPTA, M.; KOLE, P.C.; BHAT, J.S.; MUKHERJEE, A. Antioxidative enzymes and isozymes analysis of taro genotypes and their implications in *Phytophthora* blight disease resistance. **Mycopathologia**, Dordrecht, 163, p. 241-248, 2007.

SAHOO, M.R.; KOLE, P.C.; DASGUPTA, M.; MUKHERJEE, A. Changes in phenolics, polyphenol oxidase and its isoenzyme patterns in relation to resistance in taro against *Phytophthora colocasiae*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 157, n. 3, p. 145-153, 2008.

SAKURAGAWA, A.; TANIAI, T.; OKUTANI, T. Fluorometric determination of microamounts of hydrogen peroxide with an immobilized enzyme prepared by coupling horseradish peroxidase to chitosan beads. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 374, p. 191-200, 1998.

SANT'ANNA, S. M. R.; ESPOSITO, M. P. ; DOMINGOS, M ; SOUZA, S. R. Suitability of *Nicotiana tabacum* 'Bel W3' for biomonitoring ozone in São Paulo, Brazil. **Environmental Pollution**, Oxford, UK, v. 151, p. 389-394, 2008.

SANTOS, P.; FORTUNATO, A.; RIBEIRO, A.; PAWLOWSKI, K. Chitinases in root nodules. **Plant Biotechnology**, Nara, v. 25, p. 299-307, 2008.

SAWADA, H.; KIM, D.W.; KOBAYASHI, K.; SHIM, I.S. Inabenfide-induced alleviation of salt stress in rice as linked to changes in salicylic acid content and catalase activity. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, Seoul, v. 10, n.1, p. 41-46, 2007.

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38; p. 995-1014, 2005.

SCHARTE, J.; SCHÖN, H.; WEIS E. Photosynthesis and carbohydrate metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with *Phytophthora nicotianae*. **Plant Cell and Environment**, Malden, v. 28, p. 1421-1435, 2005.

SCHERP, P.; GROTHA, R.; KUTSCHERA, U. Occurrence and phylogenetic significance of cytokinesis-related callose in green algae, bryophytes, ferns and seed plants. **Plant Cell Reports**, New York, v. 20, p. 143-149, 2001.

SCHLOTER, M.; WINKLER, J.B.; ANEJA, M.; KOCH, N.; FLEISCHMANN, F.; PRITSCH, K.; HELLER, W.; STICH, S.; GRAMS, T.E.E.; GÖTTLEIN, A.; MATYSSEK, R.; MUNCH, J.C. Short term effects of ozone on the plant-rhizosphere-bulk soil system of young beech trees. **Plant Biology**, Malden, v.7, n.6, p. 728-736, 2005.

SCHNEIDER, H. Anatomy of greening diseased sweet orange shoots. **Phytopathology**, Lancaster, v. 58, p. 1155-1160, 1968.

SCHÖDER, M.; HAHLBROCK, K.; KOMBRINK, E. Temporal and spatial patterns of 1,3-β-glucanase and chitinase induction in potato leaves infected by *Phytophthora infestans*. **Plant Journal**, Malden, v. 2, v. 2, p. 161-172, 1992.

SCHOPFER, P.; PLACHY, C.; FRAHRY, G. Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, p. 1591-1602, 2001.

SCHORNACK, S.; HUITEMA, E.; CANO, L.M.; BOZKURT, T.O.; OLIVA, R.; VAN DAMME, M.; SCHWIZER, S.; RAFFAELE, S.; CHAPARRO-GARCIA, A.; SEGRETIN, M.E.; BOS, J.; HAAS, B.J.; ZODY, M.; NUSBAUM, C.; WIN, J.; THINES, M.; KAMOUN, S. Ten things to know about oomycete effectors. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 10, n. 6, p. 795-803, 2009.

SCHRAUDNER, M.; ERNST, D.; LANGEBARTELS, C.; SANDERMANN JÚNIOR, H. Activation of the defense-related proteins β-1,3-glucanase and chitinase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 99, p. 1321-1328, 1992.

SCHRODERT, M.; HAHLBROCK, K.; KOMBRINK, E. Temporal and spatial patterns of 1,3-β-glucanase and chitinase induction in potato leaves infected by P*hytophthora infestans*. **The Plant Journal**, Oxford, UK, v. 2, n. 2, p. 161-172, 1992.

SCHULTHEISS, H.; DECHERT, C.; KIRÁLY, L; FODOR, J.; MICHEL, K.; KOGEL, K.H.; HÜCKELHOVEN, R. Functional assessment of the pathogenesis-related protein PR-1b in barley. **Plant Science**, Clare, v. 165, p. 1275-1280, 2003.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F; STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Mecanismos bioquímicos e defesa vegetal. In: PASCHOLATI. S.F.; LEITE. B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta-Patógeno**: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular. Piracicaba: FEALQ, 2008, cap 6, p. 227-248.

SHAKED, A.; ASHKENASI, S.; OREN, T. Relationship between the occurrence of *Phytophthora* sp. root rot in young nucellar complex containing exocortis viroid. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 1984. São Paulo. **Proceedings...** Sydney: International Society of Citriculture, 1984. p. 30-432.

SHARKEY, T.D. Photosynthesis in intact leaves of C3 plants: physics, physiology and rate limitations. **Botanical Review**, New York, v. 51, p. 53-105, 1985.

SHARMA, S. Study on impact of heavy metal accumulation in *Brachythecium populeum* (Hedw.) B.S.G. **Ecological Indicators**, Amsterdam, v. 9, p. 807-811, 2009.

SHASHIREKHA, S.; UMA, L.; SUBRAMANIAN, G. Phenol degradation by the marine cyanobacterium *Phormidium valderianum* BDU 30501. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Heidelberg, v. 19, p.130-133, 1997.

SHIN, K.S.; LEE, S.; CHA, B. Antifungal activity of plumbagin purified from leaves of *Nepenthes ventricosa* x *maxima* against phytopathogenic fungi. **Plant Pathology Journal**, Suwon, v. 23, n. 2, p.113-115, 2007.

SHIROTA, K.; SATO, T.; SEKIGUCHI, J.; MIYAUCHI, K.; MOCHIZUKI, A, MATSUMIYA, M. Purification and characterization of chitinase isozymes from a red algae, *Chondrus verrucosus*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 72, n. 12, p. 3091-3099, 2008.

SILVAR, C.; DÍAZ, J.D.; MERINO, F. Real-time polymerase chain reaction quantification of *Phytophthora capsici* in different pepper genotypes. **Phytopathology**, Lancaster, v. 95, p. 1423-1429, 2005.

SIMMONS, C.R. The physiology and molecular biology of plant (1 → 3)-β-D-glucanases and 1,3-1,4-β-D-glucanases. **Critical Reviews in Plant Science**, Philadelphia, v. 13, p. 325-387, 1994.

SIVIERO, A. **Métodos de inoculação de *Phytophthora parasitica* e mapeamento de QTLs de resistência em híbridos de *Citrus sunki* vs. *Poncirus trifoliata* a gomose**. 2001. 114 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Botucatu, 2001.

SMITH; J.L.; DE MORAES, C.M.; MESCHER, M.C. Jasmonate- and salicylate-mediated plant defense responses to insect herbivores, pathogens and parasitic plants. **Pest Management Science**, Chichester, v. 65, n. 5, p. 497-503, 2009.

SOFO, A.; DICHI, B.; XILOYANNIS, C.; MASIA, A. Antioxidant defences in olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 32, p. 45-53, 2005.

STANGARLIN, J.R.; LEITE, B. Alterações fisiológicas na suscetibilidade. In: PASCHOLATI. S.F.; LEITE. B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.) **Interação Planta-Patógeno**: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular. Piracicaba: FEALQ, 2008. 627 p.

STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F.; LABATE, C.A. Efeito de *Phaeoisariopsis griseola* na atividade de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase, clorofilase, β-1,3-glucanase e quitinase em cultivares de *Phaseolus vulgaris*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 59-66, 2000.

STEWART, R.J.; SAWYER, B.J.B.; BUCHELI, C.S.; ROBINSON, S.P. Polyphenol oxidase is induced by chilling and wounding in pineapple. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 28, p. 181-191, 2001.

STICHER, L.; MAUCHI-MANI, B.; MÉTRAUX. J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 235-270, 1997.

STINTZI, A.; HEITZ, T.; PRASAD, V.; WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; KAUFFMANN, S.; GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. Plant pathogenesis-related proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, Paris, v. 75, n. 8, p. 687-706, 1993.

STOLZY, L.H.; KLOTZ, Z.L.J.; LABANAUSKAS, C.K. Oxygen diffusion, water, and Phytophthora cinnamomi in root decay and nutrition of avocado. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, St. Joseph, v. 90, p. 67-76, 1967.

STUCHI, E.S.; SEMPIONATO, O.R.; SILVA, J.A.A. Influência dos porta-enxertos na qualidade dos frutos cítricos. **Laranja**, Cordeirópolis, v.17, n.1, p.159-178, 1996.

SU, Y.; CHEN, G.C.; XIONG, B.; LIANG, Z.Q. Mutagenized phenylalanine ammonia-lyase from yeast. **Chemistry of Natural Compounds**, New York, v. 44, n. 2, p. 274-276, 2008.

SUZUKI, T.; ENDO, K.; ITO, M.; TSUJIBO, H.; MIYAMOTO, K.; INAMORI, Y. A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 67, n. 10, p. 2167-2175 2003.

TAIRA, T.; OHNUMA, T.; YAMAGAMI, T.; ASO, Y.; ISHIGURO, M.; ISHIHARA, M. Antifungal activity of rye (*Secale cereale*) seed chitinases: the different binding manner of class I and class II chitinase to the fungal cell walls. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 66, p. 970-977, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 4th. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2006. 764 p.

TAKAHAMA, U.; ONIKI, T. Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics in the apoplast of spinach leaves by ascorbate. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, UK, v. 33, n. 4, p. 379-387, 1992.

TAMBUSSI, E.A.; BORT, J.; ARAUS, J.L. Water use in C_3 cereals under Mediterranean conditions: a review of physiological aspects. **Annals of Applied Biology**, Malden, v. 150, p. 307-321, 2007.

TAMOI, M.; KUROTAKI, H.; FUKAMIZO, T. β-1,4-glucanase-like protein from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 is a β-1,3-1,4-glucanase and functions in salt stress tolerance. **Biochemical Journa**l, London, v. 405, p. 139-146, 2007.

TAS, A. A comparative study of the free carbohydrates in healthy and *Phytophthora cinnamomi*-infected avocado root tips. **South African Journal of Botany**, Amsterdam, v. 65, n.3, p. 247-249, 1999.

TEIXEIRA, J.E. de C. **Genes de defesa de *Citrus sunki* e *Poncirus trifoliata*. Expressão constitutiva e induzida por *Phytophthora nicotianae***. 2005. 105 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

TENA, G.; ASAI, T.; CHIU, W.L.; SHEEN, J. Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, p. 392-400, 2001.

TERRY, L.A.; JOYCE, D.C. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 32, p. 1-13, 2004.

TERTIVANIDIS, K.; GOUDOULA, C.; VASILIKIOTIS, C.; HASSIOTOU, E.; PERL-TREVES, R.; TSAFTARIS, A. Superoxide dismutase transgenes in sugarbeets confer resistance to oxidative agents and the fungus *C. beticola*. **Transgenic Research**, Dordrecht, v. 13, P. 225-233, 2004.

THANSEEM, I.; JOSEPH, A.; THULASEEDHARAN, A. Induction and differential expression of β-1,3-glucanase mRNAs in tolerant and susceptible *Hevea* clones in response to infection by *Phytophthora meadii*. **Tree Physiology**, Oxford, UK, v. 25, p. 1361-1368, 2005.

THIBAUD, M.C.; GINESTE, S.; NUSSAUME, L.; ROBAGLIA, C. Sucrose increases pathogenesis-related PR-2 gene expression in *Arabidopsis thaliana* through an SA-dependent but NPR1-independent signaling pathway. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 42, p. 81-88, 2004.

THIPYAPONG, P; HUNT, M.D.; STEFFENS, J.C. Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. **Phytochemistry**, Oxford, UK, v. 40, n. 3, p. 673-676, 1995.

THIPYAPONG, P; MELKONIAN, J.; WOLFE, D.W.; STEFFENS, J.C. Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. **Plant Science**, Clare, v. 167, p. 693-703, 2004.

TIMMER, L.W.; GRAHAM, J.H.; ZITKO, S.E. Metalaxyl-resistant isolates of *Phytophthora nicotianae*: occurrence, sensitivity, and competitive parasitic ability on citrus. **Plant Disease**, Sant Paul, v. 82, p. 254-261, 1998.

TINGEY, D.T.; FITES, R.C.; WICKLIFF, C. Differential foliar sensitivity of soybean cultivars to ozone associated with differential enzyme activities. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 37, n. 1, p. 69-72, 1976.

TOOLEY, P. W.; BUNYARD, B. A.; CARRAS, M. M.; HATZILOUKAS, E. S. Development of PCR primers from internal transcribed spacer region 2 for detection of Phytophthora species infecting potatoes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 63, n. 4, p. 1467-1475, 1997.

TSAO, P.H. MARTIN, J.P. Effect of soil exchangeable hydrogen and calcium ratio and the resulting pH on infection of citrus fibrous roots by *Phytophthora parasitica*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 53, n. 10, p. 1143 1963. Abstract.

TSENG, M.J.; LIU, C.H.; YIU, J.C. Enhanced tolerance to sulfur dioxide and salt stress of transgenic Chinese cabbage plants expressing both superoxide dismutase and catalase in chloroplasts. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 45, p. 822-833, 2007.

TSUKAYA, H.; OHSHIMA, T.; NAITO, S.; CHINO, M.; KOMEDA, Y. Sugar-dependent expression of the CHS-A gene for chalcone synthase from petunia in transgenic Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 97, p. 1414-1421, 1991.

UEEDA, M.; KUBOTA, M.; NISHIA, K. Contribution of jasmonic acid to resistance against Phytophthora blight in *Capsicum annuum* cv. SCM334. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 67, p. 149-154, 2006.

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

VALCU, C.M.; JUNQUEIRA, M.; SHEVCHENKO, A.; SCHLINK, K. Comparative proteomic analysis of responses to pathogen infection and wounding *Fagus sylvatica*. **Journal of Proteome Research**, Washington, DC, v. 8, p. 4077-4091, 2009.

VALLE, E. On anti-fungal factors in potato. **Acta Chemica Scandinavica**, Copenhagen, v. 11, p. 395-397, 1957.

VALOIS, D.; FAYAD, K.; BARASUYE, T.; GARON, M.; DÉRY, C.; BRZEZINSKI, R.; BEAULIUE, C. Glucanolytic Ascomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 62, n. 5, p. 1630-1635, 1996.

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

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

VANDEMARK, G.J.; BARKER, B.M. Quantifying *Phytophthora medicaginis* in susceptible and resistant alfalfa with a real-time fluorescent PCR assay. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 151, p. 577-583, 2003.

VANDENABEELE, S.; VANDERAUWERA, S.; VUYLSTEKE1, M.; ROMBAUTS, S.; LANGEBARTELS, C.; SEIDLITZ, H.K.; ZABEAU, M.; MONTAGU, M.V.; INZÉ, D.; VAN BREUSEGEM, F. Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Oxford, UK, v. 39, p. 45-58, 2004.

VANDERMOLEN, G.E.; LABAVITCH, J.M.; STRAND, L.L;, DE VAY, J.E.. Pathogen-induced vascular gels: ethylene as a host intermediate. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 59, p. 573-80, 1983.

VANITHA, S.C.; NIRANJANA, S.R.; UMESHA, S. Role of phenylalanine ammonia lyase and polyphenol oxidase in host resistance to bacterial wilt of tomato. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 157, p. 552-557, 2009.

VELJOVIC-JOVANOVIC, S.; KUKAVICA, B.; STEVANOVIC, B.; NAVARI-IZZO, F. Senescence- and drought-related changes in peroxidase and superoxide dismutase isoforms in leaves of *Ramonda serbica*. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 57, n. 8, p. 1759-1768, 2006.

VÉRONÉSI, C.; RICKAUER, M.; FOURNIER, J.; POUÉNAT, M.L.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T. Lipoxygenase gene expression in the tobacco- *Phytophthora parasitica nicotianae* interaction. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, p. 997-1004, 1996

VOLOUDAKIS, A.E.; MARMEY, P.; DELANNOY, E.; JALLOUL, A.; MARTINEZ, A.; NICOLE, M. Molecular cloning and characterization of *Gossypium hirsutum* superoxide dismutase genes during cotton-*Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* interaction. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 68, n. 4/6, p. 119-127, 2006.

VRANOVÁ, E.; INZÉ, D.; VAN BREUSEGEM, F. Signal transduction during oxidative stress. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 53, n. 372, p. 1227-1236, 2002.

XIANG, L.; MOORE, B.S. Biochemical characterization of prokaryotic phenylalanine ammonia lyase. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 187, p. 4286-4289, 2005.

XU, X.; GOOKIN, T.; JIANG, C.Z.; REID, M. Genes associated with opening and senescence of *Mirabilis jalapa* flowers. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 58, n. 8, p. 2193-2201, 2007.

WANG, F.Z.; WANG, Q.B.; KWONB, S.Y.; KWAKB, S.S.; SU, W.A. Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 162, p. 465-472, 2005.

WANG, K.L.C; LI, H.; ECKER, J.R. Ethylene biosynthesis and signaling networks. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 14, suppl., S131-S151, 2002.

WARD, E.W.B.; CAHILL, D.M., BHATTACHARYYA, M.K. Abscisic acid suppression of phenylalanine ammonia- lyase activity and mRNA, and resistance of soybeans to *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 91, p. 23-27, 1989.

WAY, H.M.; KAZAN, K.; GOULTER, K.C.; BIRCH, R.G.; MANNERS, J.M. Expression of the Shpx2 peroxidase gene of *Stylosanthes humilis* in transgenic tobacco leads to enhanced resistance to *Phytophthora parasitica* pv. *nicotianae* and *Cercospora nicotianae*. **Molecular Plant Pathology**, Malden, v. 1, n. 4, p. 223-232, 2001.

WEN, C.M.; TSENG, C.S.; CHENG, C.Y.; LI, Y.K. Purification, characterization and cloning of a chitinase from *Bacillus* sp. NCTU2. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, London, v. 35, p. 213-219, 2002.

WIDMER, T.L.; LAURENT, N. Plant extracts containing caffeic acid and rosmarinic acid inhibit zoospore germination of *Phytophthora* spp. pathogenic to *Theobroma cacao*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, n. 115, p. 377-388, 2006.

WIESE, M.V.; DeVAY. Growth regulator changes in cotton associated with defoliation caused by *Verticillium albo-atrum*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 45, p. 304-309, 1970.

WIRTH SJ, WOLF G.A. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 12, p.197-205, 1990.

WONG, S.C.; COWAN, I.Y.; FARQUHAR, G.D. Stomatal conductance correlates with photosynthetic capacity. **Nature,** London, v. 282, p. 424-426, 1979.

WU, C.T.; BRADFORD, K.J. Class I chitinase and β-1,3-glucanase are differentially regulated by wounding, methyl jasmonate, ethylene, and gibberellin in tomato seeds and leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 133, p. 263-273, 2003.

WU, G.; SHORTT, B.J.; LAWRENCE, E.B.; FITZSIMMONS, K.C.; SHAH, D.M. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H_2O_2-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. **Plant Cell**, Baltimore, v. 7, p. 1357-1368 1995.

YAISH, M.W.F.; DOXET, A.C.; McCONKEY, B.J.; MOFFATT, B.A.; GRIFFITH, MA. Cold-active winter rye glucanases with ice-binding capacity. **Plant Physiology**, Rockville, v. 141, p. 1459-1472, 2006.

YANG, Z.; TIAN, L.; LATOSZEK-GREEN, M.; BROWN, D.; WU, K. Arabidopsis ERF4 is a transcriptional repressor capable of modulating ethylene and abscisic acid responses. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 58, p. 585-596, 2005.

YI, S.Y.; HWANG, B.K. Differential induction and accumulation of β-1,3-glucanase and chitinase isoforms in soybean hypocotyls and leaves after compatible and incompatible infection with *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 48, p. 179-192, 1996.

YOO, C.Y.; PENCE, H.E.; HASEGAWA, P.M.; MICKELBART, M.V. Regulation of transpiration to improve crop water use. **Critical Reviews in Plant Science**, Philadelphia, v. 28, p. 410-431, 2009.

YORUK, R.; MARSHALL, M.R. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. **Journal of Food Biochemistry**, Malden, v. 27, p. 361-422, 2003.

YOSHIOKA, H.; BOUTEAU, F.; KAWANO, T. Discovery of oxidative burst in the field of plant immunity. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v. 3, n.3, p. 153-155, 2008.

ZAHRA, P.; MAJID; R.M.; AMIN, B. Seasonal changes of peroxidase, polyphenol oxidase enzyme activity and phenol content during and after rest in pistachio (*Pistacia vera* L.) flower buds. **World Applied Sciences Journal**, Montreal, v. 6, n. 9, p. 1193-1199, 2009.

ZEYEN, R.J.; BUSHNELL, W.R.; CARVER, T.L.W.; ROBBINS, M.P.; CLARK, T.A.; BOYLES, D.A.; VANCE, C.P. Inhibiting phenylalanine ammonia lyase and cinnamyl-alcohol dehydrogenase suppresses Mla1 (HR) but not mlo5 (non-HR) barley powdery mildew resistances. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 47, p. 119-140, 1995.

ZHOU, Y.H.; PENG, Y.H.; LEI, J.L.; ZOU, L.Y.; ZHENG, J.H.; YU, J.Q. Effects of potato virus Y^{NTN} infection on gas exchange and photosystem 2 function in leaves of *Solanum tuberosum* L. **Photosynthetica**, Dordrecht, v. 42, n. 3, p. 417-423, 2004.

ZITKO, S.E.; TIMMER, L.W.; SANDLER, H.A. Isolation of *Phytophthora palmivora* pathogenic to citrus in Florida. Plant Disease, Sant Paul, v. 75, n. 5, p. 532-535, 1991.

ANEXO

ANEXO A - Valores médios de temperatura do ar e precipitação em Piracicaba, SP, ocorridas durante o período de condução do experimento mantido sobre condições de campo. Dados disponíveis em: http://www.leb.esalq.usp.br/automatica/pagina5.html

Mês/Ano	**Meses após a inoculação**	**Temperatura mínima (^{O}C)**	**Temperatura média (^{O}C)**	**Temperatura máxima (^{O}C)**	**Chuva (mm)**
Maio/2007	0	12,6	18,5	25,4	55,7
Junho/2007	1	11,4	18,4	26,7	22,3
Julho/2007	2	10,8	17,0	24,5	160,7
Agosto/2007	3	11,9	19,5	27,9	0,0
Setembro/2007	4	15,3	22,7	30,7	1,9
Outubro/2007	5	17,4	24,0	31,7	87,2
Novembro/2007	6	17,3	22,2	28,5	120,5
Dezembro/2007	7	18,7	23,9	30,4	179,1
Janeiro/2008	8	18,7	22,6	28,4	406,7
Fevereiro/2008	9	19,1	23,5	30,2	131,5