



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL

INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA POR *Bacillus amyloliquefaciens* E
Lactobacillus paracasei À *Phytophthora nicotianae* EM PORTA-
ENXERTOS DE CITROS

WESLEY LUIZ FIALHO COSTA

Araras
2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA POR *Bacillus amyloliquefaciens* E
Lactobacillus paracasei À *Phytophthora nicotianae* EM PORTA-
ENXERTOS DE CITROS**

WESLEY LUIZ FIALHO COSTA

ORIENTADORA: PROFA. Dra. KATIA CRISTINA KUPPER

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Agroecologia e
Desenvolvimento Rural como requisito
parcial à obtenção do título de MESTRE
EM AGROECOLOGIA E
DESENVOLVIMENTO RURAL

Araras

2017

Fialho Costa, Wesley Luiz

INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA POR *Bacillus amyloliquefaciens* E
Lactobacillus paracasei À *Phytophthora nicotianae* EM PORTA-ENXERTOS
DE CITROS / Wesley Luiz Fialho Costa. -- 2017.

67 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus
Araras, Araras

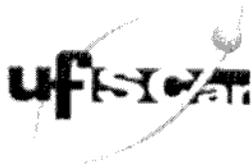
Orientador: Katia Cristina Kupper

Banca examinadora: Ademir Durren Bigaton, Sandra Regina

Ceccato-Antonini

Bibliografia

1. Controle biológico . 2. Indução de resistência. 3. Fitopatologia. I.
Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Wesley Luiz Fialho Costa, realizada em 28/09/2017:

Profa. Dra. Kátia Cristina Kupper
IAC

Prof. Dr. Ademir Durrer Bigaton
USP

Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini
UFSCar

DEDICO

À minha mãe Maria de Lourdes, por ter feito de sua vida uma missão para que seu único filho tivesse uma educação superior. Agradeço por ser meu espelho onde eu vejo sempre, coragem honestidade e caráter.

À minha esposa, amiga e companheira Aleçandra P Fialho pela dedicação e ajuda para que mais essa meta de vida fosse cumprida.

OFEREÇO

“O que somos hoje e o que seremos amanhã depende de nossos pensamentos. Se procedo mal, sofro as consequências; se procedo bem, eu mesmo me purifico. ”

Siddhartha Gautama

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Maria de Lourdes. Embora tempos difíceis permeassem nossas vidas, nunca desistimos, lutamos juntos, e vencemos juntos;

À minha parceira de vida Aleçandra P. Fialho, que acompanhou pacientemente minha caminhada. E contribuiu de todas as formas possíveis para que essa conquista fosse possível;

À minha orientadora profa. Dra. Katia Cristina Kupper pelos ensinamentos, pela oportunidade pela amizade e mais que tudo pela paciência;

À minha amiga, e professora, Dra. Mariana Nadjara Klein. Pela ajuda e ensinamentos;

À Universidade Federal de São Carlos e ao programa de mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural pela oportunidade e pelo aprendizado;

À Universidade Federal de Viçosa, por ter mudado minha vida;

À Fundação Mokiti Okada e ao Centro de Pesquisa Mokiti Okada por oferecer essa oportunidade;

Ao coordenador do CPMO Dr. Luiz Carlos Demattê Filho pelo apoio;

Ao coordenador de pesquisa Dr Sérgio Kenji Homma pela oportunidade, pelos ensinamentos, e pela amizade;

Aos meus colegas do setor solos Rodrigo Longaresi, Diego Pelizari e Juliana Scotton, pelo apoio;

À minha amiga Dayana Pereira por toda ajuda e conselhos;

Ao Centro de Citricultura "Sylvio Moreira"/IAC, por ter me acolhido;

Às minhas colegas de trabalho Bianca Machado, Ariane Carmo, Luriany P. Ferraz, Andréia Fujimoto, Vanessa Santos Moura, Flávia Pollettini, Aline Silva pelos bons momentos compartilhados;

Ao meu amigo Reinaldo Botelho pela ajuda direta, indireta e pela amizade.

Aos meus estagiários Aline Mako, Rafael Kupper Moretto, Kizzy Kastein, Lucas Rosa e Aline Souza, pela ajuda;

Às minhas colegas de trabalho Camila Kiritani e Maria Evanir pela contribuição;

Ao meu colega Valdionei Giassi pelos ensinamentos.

À Citrograf Mudas por ter cedido as sementes necessárias ao experimento.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 Agroecologia como ciência	4
2.2 Citricultura	5
2.2.1 Importância dos porta-enxertos.....	7
2.3 - <i>Phytophthora</i> spp.	10
2.3.1 Gomose.....	11
2.4 Controle Biológico de fitopatógenos.....	12
2.5 Resistência de plantas	14
2.5.1 Resistencia induzida	15
2.5.2 Peroxidases	16
2.5.3 Fenilalanina amônia-liase.....	17
2.5.4 Polifenoxidase	18
2.5.5 Fenóis	18
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Obtenção e multiplicação das rizobactérias:	19
3.2 Microbiolização das sementes com as rizobactérias	19
3.3 Preparo da suspensão contendo propágulos de <i>P. nicotianae</i>	20
3.4 Preparo para os ensaios	20
3.4.1 Ensaio 1	20
3.4.2 Ensaio 2	21
3.4.3 Ensaio 3	21
3.5 Análises bioquímicas	22
3.5.1. Polifenoxidase (PPO)	22
3.5.1.1 Preparo do tampão fosfato 0,2 mol.L ⁻¹ pH 6,7	22
3.5.1.1.1 Solução de K ₂ HPO ₄ (dibásico)	22
3.5.1.1.2 Solução de KH ₂ PO ₄ (monobásico).....	22
3.5.1.2 Montagem da reação	22
3.5.2. Peroxidase (POD)	23
3.5.2.1 Preparo das soluções.....	23
3.5.2.1.1 Solução A.....	23
3.5.2.1.2 Solução B.....	23
3.5.2.2 Montagem da reação	24
3.5.3. Fenilalanina amônia-liase (PAL)	24
3.5.3.1 Preparo das soluções.....	24
3.5.3.1.1 Tampão borato 0,1 mol.L ⁻¹ pH 8,8.....	24
3.5.3.1.2 Tampão borato 0,2 mol.L ⁻¹	25
3.5.3.1.3 Solução de fenilalanina	25
3.5.3.1.4 Montagem da reação	25
3.5.4 Fenóis totais.....	25
3.6 Análise estatística	26
4 RESULTADOS.....	27
5 DISCUSSÃO.....	32

6 CONCLUSÕES	35
7 LITERATURA CITADA.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Biplot da análise de componentes principais (PCA), realizada a partir da matriz de correlações entre os tratamentos e os porta-enxertos, no ensaio 1.....	27
Figura 2. Violin plot da atividade enzimática nos tempos no ensaio 2.....	28
Figura 3. Biplot da análise de componentes principais, comparando o ensaio 1 com o ensaio 2 em tangerina Sunki	29
Figura 4. Biplot da análise de componentes principais, comparando o ensaio 1 com o ensaio 2 em Trifoliata.....	30
Figura 5. Biplot da análise de componentes principais (PCA), realizada a partir da matriz de correlações entre os tratamentos e os porta-enxertos, no ensaio 3	31

INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA POR *Bacillus amyloliquefaciens* E *Lactobacillus paracasei* À *Phytophthora nicotianae* EM PORTA-ENXERTOS DE CITROS

Autor: WESLEY LUIZ FIALHO COSTA

Orientadora: Profa. Dra. KATIA CRISTINA KUPPER

RESUMO

A citricultura se configura como uma das mais importantes culturas da balança agrícola brasileira. Estima-se que mais da metade do suco de laranja consumido no mundo origina-se dos pomares brasileiros. Nos últimos anos a citricultura vem sofrendo com diversos fatores de risco dentre esses, a alta incidência de pragas e de doenças. A introdução do “Huanglongbing” no Brasil fez o custo de pulverização aumentar exponencialmente nos últimos anos e, além disso, milhares de árvores cítricas foram erradicadas. Portanto, a reposição dessas plantas, tornou a muda o principal insumo da citricultura. Em viveiros de produção de mudas, patógenos do gênero *Phytophthora* causadores da “gomose dos citros” são de extrema importância. Tais patógenos são de difícil controle, principalmente, pelo fato de existirem poucos ingredientes ativos eficazes. O controle biológico, embora ainda incipiente, vem mostrando bons resultados para o controle dessas doenças através de bactérias antagonistas. Logo o objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade de dois isolados bacterianos, *Lactobacillus paracasei* e *Bacillus amyloliquefaciens* em induzir a produção de compostos fenólicos e, em ativar as enzimas de defesa, em dois porta-enxertos (PE) cítricos contra *Phytophthora nicotianae*. Sementes de *Citrus sunki* e *Poncirus trifoliata* suscetível e resistente, respectivamente, a *P. nicotianae* foram microbiolizadas com as bactérias, realizando ao todo três ensaios. A inoculação com o fitopatógeno ocorreu no substrato (75 dias após a semeadura) e na região do colo (aos 90 dias após a semeadura) nos ensaios 2 e 3, respectivamente. A

parte aérea das plantas foi retirada para quantificação das enzimas polifenoloxidase (PPO), peroxidase (POD), fenilalanina amônia-liase (PAL) e dos compostos fenólicos. Nas plantas não inoculadas com *P. nicotianae* (Ensaio 1), com exceção da POD, a maior atividade das enzimas foi em *C. sunki* e as plantas tratadas com *B. amyloliquefaciens* apresentaram alta atividade da PAL, PPO. As plantas submetidas ao tratamento com *L. paracasei* apresentaram maior concentração de compostos fenólicos. Após a inoculação com *P. nicotianae* no substrato em *C. sunki* houve aumento da atividade enzimática em todas as plantas. Nos tratamentos com as bactérias as maiores atividades foram da PPO, PAL e houve acúmulo de fenóis. Em *P. trifoliata* houve alta atividade da POD em plantas tratadas com *B. amyloliquefaciens*. Observou-se, alta atividade da PAL logo após inoculação de *P. nicotianae* em todos tratamentos. Quando as plantas foram inoculadas na região do colo (Ensaio 3), a severidade foi maior em *C. sunki* e, essas plantas, quando tratadas com *B. amyloliquefaciens*, apresentaram maior atividade da POD e maior concentração de compostos fenólicos. Conclui-se que, *L. paracasei* e *B. amyloliquefaciens* ativaram o sistema de defesa das plantas cítricas. Porém, a atividade enzimática dependeu da variedade do porta-enxerto e, se as plantas foram, ou não, inoculadas com o fitopatógeno.

Palavras chave: Controle biológico, *Citrus*, *Lactobacillus paracasei*, *Bacillus amyloliquefaciens*, indução de resistência.

INDUCTION OF RESISTANCE BY *Bacillus amyloliquefaciens* AND *Lactobacillus paracasei* To *Phytophthora nicotianae* IN CITRUS ROOTSTOCKS.

Author: WESLEY LUIZ FIALHO COSTA

Adviser: Prof. Dra. KATIA CRISTINA KUPPER

ABSTRACT

Citriculture is one of the most important crops influencing the agricultural trade balance. It is estimated that half of the orange juice consumed in the world is produced in Brazilian orchards. In the last years the citriculture has been suffering from many risk factors, such as high incidence of pests and diseases. The introduction of Huanglongbing in Brazil raised the costs of spraying in the last years, besides leading to the eradication of several citrus trees. Thus, the replacement of these trees has made seedlings the main input in citriculture. In nursery seedlings, *Phytophthora* spp. Pathogens that causes citrus gummy are of great importance, but difficult to control because there are few effective active ingredients. The biological control has been showing good results in controlling these diseases using antagonistic bacteria, although stills incipient. Thus, the aim of this study was to evaluate the ability of the two bacterial isolates *Lactobacillus paracasei* and *Bacillus amyloliquefaciens* in inducing the production of phenolic compounds and activating defense enzymes of two citrus rootstocks *Phytophthora nicotianae*. Seeds of *Citrus sunki* and *Poncirus trifoliata*, susceptible and resistant to *P. nicotianae*, respectively, were microbiolized with the bacteria in three assays. The substrate was inoculated with the phytopathogen at 75 days after sowing (assay 2), and the lap region was inoculated at 90 days after sowing (assay 3). The plant shoot was used to quantify the enzymes polyphenoxidase (PPO), peroxidase (POD), phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and phenolic compounds. *P. sunki* plants non-inoculated with *P. nicotianae* (assay 1) showed higher levels of enzymatic activity of all enzymes, except POD, and plants inoculated with *B.*

amyloliquefaciens presented high activity of PAL and PPO. Plants inoculated with *L. paracasei* showed higher concentration of phenolic compounds. All *C. sunki* grown in substrate inoculated with *P. nicotianae* presented an increased in the enzymatic activity. PPO and PAL showed higher level of activity in the treatments with the bacteria, and there was accumulation of phenolic compounds. In *P. trifoliata* there was high activity of POD in plants treated with *B. amyloliquefaciens*. High activity of PAL was observed after inoculation by *P. nicotianae* in all treatments. *C. sunki* plants inoculated in lap region (assay 3) showed higher severity, and presented higher activity of POD and concentration of phenolic compounds when treated with *B. amyloliquefaciens*. In conclusion, *L. paracasei* and *B. amyloliquefaciens* activated the defense system of citrus plants, however the enzymatic activity depends on the variety of the rootstock and if the plants were inoculated with the phytopathogen.

.

Keywords: Biological control, *Citrus*, *Lactobacillus paracasei*, *Bacillus amyloliquefaciens*, induction of resistance

1 INTRODUÇÃO

O Brasil conta hoje com uma área de aproximadamente 666 mil hectares de plantas cítricas. Na safra 2015/2016 o país respondeu por 31,36% da produção mundial de laranja e 54,58% da produção de suco (Agrianual 2017). A produção citrícola brasileira está concentrada no estado de São Paulo, sendo que este responde por 72% da produção da fruta e 98% das exportações de suco (Figueiredo et al. 2012). Ainda assim, a citricultura brasileira vive um momento de fortes transformações em sua cadeia produtiva. O principal fator dessa transformação é o crescimento dos índices de incidência de doenças no campo, principalmente, no estado de São Paulo (Adami 2014).

A manutenção desse parque citrícola requer um grande número de mudas, na safra 2014/2015 foram produzidas 17 milhões de mudas para o plantio e replantio de pomares (Agrianual 2017).

Nesse contexto de produção de mudas um grupo de patógenos de grande importância é pertencente ao gênero *Phytophthora*. Na maioria das áreas produtoras do mundo, os organismos deste grupo são endêmicos no solo de pomares cítricos (Medina Filho et al. 2004). A constante presença destes nos pomares deve-se à capacidade de oomicetos produzirem estruturas de resistência, o que torna o seu controle extremamente difícil (Beltrame, 2010). Atualmente, o uso de mudas sadias e, também, resistentes e/ou tolerantes ao patógeno é a principal medida de combate a esses patógenos.

Outra alternativa para o controle da *Phytophthora* spp. é a ativação dos mecanismos de defesa natural das plantas. A indução de resistência pode ser dividida em duas categorias: a resistência sistêmica adquirida (*systemic acquired resistance*, SAR) e a resistência sistêmica induzida (*induced systemic resistance*, ISR). O processo da SAR tem o ácido salicílico como principal sinalizador, levando à expressão, principalmente, de proteínas PR relacionadas à patogenicidade (Sticher et al. 1997). No segundo processo a ISR atua na rota regulada por jasmonato e etileno (Van Loon et al. 1998). Dentre as enzimas relacionadas com a ISR destacam-se a peroxidase (POD), a polifenoloxidase (PPO), a fenilalanina amônia-liase (PAL), assim como, os compostos fenólicos.

As PODs estão associadas à infecção patogênica, oxidando compostos fenólicos acumulados em resposta à infecção, para reforçar a parede celular através da biossíntese de lignina (Fry, 1986; Christensen et al. 1998). As PPOs iniciam o processo de oxidação de compostos fenólicos, quando há ruptura da célula vegetal, devido a ferimentos, infecção por patógenos ou senescência (Thipyapong et al. 2004). A PAL está envolvida no primeiro passo da síntese dos fenilpropanóides, na conversão da fenilalanina em ácido transcinâmico, conferindo maior resistência à parede celular das plantas aos patógenos (Nakazawa et al. 2001). Compostos fenólicos podem inibir a germinação de esporos fúngicos, seu crescimento micelial e interferir na atividade enzimática microbiana (Schwan-estrada et al. 2008).

A IRS comumente é induzida por rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (Van Loon et al. 1998). Elas fazem parte da população residente das plantas, de forma epifítica (Baldotto; Olivares, 2008) ou endofítica (Hallmann et al. 1997) e, na maioria das vezes não são fitopatogênicas. Podem ser utilizadas para tratamento de sementes, explantes e mudas micropropagadas, incorporadas ao substrato de plantio, tratamento de estacas, tubérculos e raízes, pulverizações na parte aérea, incluindo folhagem e frutos, e em pós-colheita. Giassi, Kiritani e Kupper (2016) verificaram que dois isolados bacterianos BL06 (isolado de fermento de água ardente) e CPMO3 (isolado de folhas de café) apresentaram potencial de biocontrole a *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan (*Phytophthora parasítica* Dastur) no porta-enxerto *Citrus sunki* (Hayata) hort. Ex Tanaka) considerado suscetível a esse patógeno (Medina Filho et al. 2003).

No entanto, existem poucos trabalhos na literatura relacionando esses microrganismos à resistência sistêmica induzida. Muitos estudos relacionados a *Lactobacillus* spp. são oriundos da indústria alimentícia (Sanders; Klaenhammer, 2001), seja ela voltada para alimentação humana (principalmente em alimentos industrializados) ou, como probiótico para animais de produção (Paço et al. 2003; Vásquez et al. 2005). Já bactérias do gênero *Bacillus* estão entre as mais estudadas como biocontroladoras de doenças em plantas (Fravel, 2005), seja por antagonismo direto ou indução de

resistência (Hassan, 2015). *B. amyloliquefaciens* já foi descrito como indutor de resistência em plantas (Idris et al. 2007), porém, sem relatos de sua interação com porta-enxertos cítricos. Portanto, esse trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade desses microrganismos em induzir a produção de compostos fenólicos e ativar as enzimas peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase, em dois porta-enxertos de citros, *Citrus sunki* e *Poncirus trifoliata*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Agroecologia como ciência

A agricultura “convencional” tomou conta do cenário da produção de alimentos, sobretudo nos últimos 60 anos. Esta se caracterizou pelo uso intensivo de fertilizantes, defensivos químicos e, mais recentemente, o melhoramento genético baseado na transgenia. Embora seja inegável que o avanço da tecnologia proporcionou um aumento exponencial na produção de alimentos, temos que considerar, também, as consequências do uso desregrado dessas tecnologias, e a lógica a qual foram concebidas (Moreira et al. 2002). Sob a justificativa de alimentar a crescente população mundial, houve de certa forma um uso indiscriminado de insumos danosos ao meio ambiente (Mareida; Pingali, 2001).

Na contramão da agricultura convencional surgiram diversas correntes de agriculturas ditas “alternativas”. De forma geral todas essas formas de agricultura que vieram para contrapor a agricultura convencional, foram enquadradas dentro do conceito de agricultura orgânica e, essa por sua vez foi enquadrada dentro da Agroecologia.

O uso contemporâneo do termo Agroecologia data dos anos 70, mas a ciência e a prática da agroecologia têm a idade da própria agricultura (Hecht, 1989). Esses enquadramentos muitas vezes tornam o termo “Agroecologia” um pouco confuso e difícil de conceituar e entender seus objetivos. Segundo Caporal e Costabeber (2002), a Agroecologia tem sido reafirmada como uma ciência ou disciplina científica, ou seja, um campo de conhecimento de caráter multidisciplinar que apresenta uma série de princípios, conceitos e metodologias que nos permite estudar, analisar, dirigir, desenhar e avaliar agroecossistemas. Feiden (2005) descreveu um agroecossistema como um ecossistema, que foi modificado pelo homem para produção de bens necessários à sua sobrevivência. Hart (1980), por outra perspectiva, viu o agroecossistema como composto por interações físicas e biológicas de seus componentes, destacando, assim, o processamento de insumos e produtos

nestas inter-relações. Logo, a agroecologia, pode ser vista como uma ciência que tem os agroecossistemas como unidade de estudo, procurando compreender o funcionamento e a natureza dessas unidades; integrando princípios ecológicos, agronômicos e socioeconômicos na compreensão e avaliação do efeito das tecnologias sobre os sistemas agrícolas e a sociedade como um todo (Assis; Romeiro, 2002).

Em meados dos anos 80 cresce a preocupação com o meio ambiente e a qualidade de vida, o que levou ao desenvolvimento de um novo paradigma nas sociedades modernas: a sustentabilidade (Attanasio, 2004). Nesse momento a Agroecologia tomou força e vem se apresentado como vanguarda na produção de novos conhecimentos (Costa Gomes; Borba, 2004), tanto para a produção de estilos de agricultura (desenvolvendo e difundindo tecnologias apropriadas e limpas) como, também, propõe um desenvolvimento social crescente, através da participação do cidadão na gestão descentralizada das instituições.

Trazendo para o aspecto técnico e pragmático pode-se afirmar que ainda existe uma escassez de tecnologia destinada a cultivos agroecológicos, principalmente, no que se refere à fitossanidade das plantas. Nesse sentido, o controle biológico tem sido uma alternativa ao uso de produtos químicos para o controle de doenças, sendo esse muito bem visto pela sociedade e aos sistemas agroecológicos de produção.

2.2 Citricultura

As plantas cítricas como as do gênero *Citrus*, os kumquats (*Fortunella*), trifoliata (*Poncirus*) e outros gêneros da família Rutaceae são oriundos das regiões tropicais e subtropicais do sudeste asiático. Nas américas, a chegada das plantas cítricas provavelmente remete a 1493 com a chegada de Cristóvão Colombo. Já no Brasil a introdução foi feita pelos portugueses no início da colonização (Donadio; Mourão; Moreira, 2005).

Inicialmente, a citricultura desenvolveu-se mais nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Bahia. Porém, a concentração da população no eixo

Rio-São Paulo fez com que a citricultura se estabelecesse mais fortemente nesses estados. Com apoio da Secretaria de Agricultura e Abastecimento, e a decadência do setor cafeeiro, a citricultura paulista expandiu significativamente a partir de 1930 (Donadio; Mourão; Moreira, 2005; Boteon; Neves, 2005). Deste momento em diante configurava-se o potencial da citricultura para a balança comercial agrícola. A partir da década de 70, alicerçada nos programas de pesquisa e desenvolvimento, fomentados pelo governo do estado, houve um aumento exponencial das áreas plantadas em São Paulo, com plantações de alguns milhões de árvores por ano (Donadio; Mourão; Moreira, 2005).

No início do século XXI com a produção de 18,5 milhões de toneladas. ano⁻¹ de frutas cítricas, o Brasil já se destacava como o maior produtor e exportador de suco concentrado do mundo. E o estado de São Paulo, produzindo 78,2% do total, acabara por superar a produção da Flórida em quantidade de frutas e de suco (Donadio; Mourão; Moreira, 2005).

Atualmente, o Brasil conta com uma área de aproximadamente 666 mil hectares de plantas cítricas. Na safra 2015/2016 o país respondeu por 31,36% da produção mundial de laranja, e 54,58% da produção de suco mantendo-o assim no topo da produção mundial (Agrianual 2017). A safra nacional estimada para o ano de 2017 é de, aproximadamente, 14 milhões de toneladas, apresentando uma queda de 7,9%, em relação à safra colhida no ano de 2016 (IBGE, 2017). O Estado de São Paulo, com 70,2% de participação na produção nacional, ainda é o maior produtor do país com a safra de 2017, estimada em mais de 10 milhões de toneladas. Os outros principais estados da federação produtores de laranja, em ordem decrescente serão Bahia (7,5%), Minas Gerais (6,1%), Paraná (5,1%), Sergipe (3,3%) e Rio Grande do Sul (2,7%), respectivamente. Esses seis estados serão responsáveis por 95,0% da produção de laranja do país (IBGE, 2017).

Embora o cenário produtivo pareça favorável, a citricultura brasileira vem passando por dificuldades nos últimos anos, mesmo com a boa colheita e bons preços da safra 2016/2017. O mercado desfavorável dos anos anteriores e a elevação dos custos de produção, associados à ameaça imposta pela

diversidade de pragas e doenças ocorrentes no pomar, motivaram a queda na área plantada (Da Silva; Marques, 2015; Kalaki; Neves, 2017).

O elevado custo de produção enfrentado pela citricultura, muito se deve a alta incidência de artrópodes fitófagos como mosca das frutas (*Ceratitis capitata* Wied, 1824 e *Anastrepha fraterculus* Wied., 1830), ácaro-da-falsa-ferrugem (*Phyllocoptruta oleivora* Ashmead, 1879), minadora-dos-citros (*Phyllocnistis citrella* Staion, 1856), e também a alta incidência de doenças das quais merecem destaque a mancha preta dos citros (*Guignardia citricarpa* Kiely [fase anamórfica de *Phyllosticta citricarpa* McAlpine 1973]), podridão floral (*Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc), gomose (*Phytophthora nicotianae* Breda de Haan), leprose dos citros (*Citrus leprosis virus* [CiLV]) cujo vetor é o ácaro da leprose (*Brevipalpus* spp.) dentre outras (Fundecitrus, 2017). Porém, atualmente o maior de todos os problemas da citricultura é o “Huanglongbing” (HLB) doença causada pela bactéria *Candidatus liberibacter* spp. cujo vetor é o psílideo (*Diaphorina citri* Kuwayama, 1908). O HLB passou rapidamente a ser a doença mais devastadora dos citros (Gallo et al. 2002; Feichtenberger et al. 2005; Wang; Trivedi, 2013). Esse cenário fez da citricultura a segunda cultura brasileira mais intensiva no uso de agrotóxicos perdendo apenas para soja (Neves et al. 2010).

2.2.1 Importância dos porta-enxertos

As plantas cítricas podem ser multiplicadas por sementes (via sexual), por estaquia e enxertia (via assexual), sendo que a forma utilizada comercialmente no Brasil é a enxertia (Machado Filho et al. 2003). A muda de citros é basicamente formada de duas partes, a variedade copa também chamada de “cavaleiro”, “garfo” ou enxerto, e o porta enxerto denominado também por “cavalo”, “cavalinho” ou “patrão” (César, 1996).

A variedade copa é a principal responsável pelas características dos frutos. É escolhida de acordo com o mercado a ser explorado, seja ele de fruta de mesa (*in natura*), para mercado de suco ou ambos. O porta-enxerto, por sua vez, exerce influência importante sobre a copa, como vigor, produtividade,

precocidade de produção, composições orgânica e inorgânica das folhas e frutos e absorção de nutrientes. Adaptabilidade às características edafoclimáticas regionais e a tolerância e/ou resistência a pragas e doenças são também características que devem ser consideradas, na escolha do porta-enxerto (Bastos et al. 2014).

Podemos afirmar com certeza que o sucesso de um pomar cítrico passa diretamente pela escolha do porta-enxerto. Porém, ao se escolher o porta-enxerto deve-se considerar as doenças/pragas futuras. A história da citricultura vem mostrando a importância da diversificação. E se ponderarmos o atual cenário de mudanças climáticas, associado à globalização é prudente que os pomares sejam diversificados tanto em variedades copa quanto em porta-enxertos.

Até a década de 1940, 90% das plantas de laranja do estado de São Paulo estavam enxertadas em laranja azeda (*Citrus aurantium* L.) (Pompeu Júnior, 2005). A introdução do vírus da tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus*, CTV) nos pomares paulistas causou a morte de praticamente todas as plantas enxertadas sobre laranja azeda que é intolerante ao vírus (Pompeu Júnior, 2005). As boas características apresentadas pelo limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck) como: compatibilidade com todas as copas, produção precoce, altas produções de frutos de boa qualidade, resistência à seca, e tolerância à tristeza fizeram desse porta-enxerto o preferido dos citricultores. A partir de 1960, ele passou a ser praticamente o único porta-enxerto da citricultura paulista (Pompeu Júnior, 2005; Donadio; Mourão; Moreira, 2005).

No entanto, o limão cravo é altamente suscetível à morte súbita dos citros. E em 1999 houve um surto dessa doença, na ocasião cerca de 80% das plantas cítricas em campo eram enxertadas em 'limão cravo'. Os reflexos da doença ainda hoje são sentidos pelo citricultor, obrigando-o a diversificar seus pomares (Bastos et al. 2014).

Pensando em diversificar o pomar dois porta-enxertos a serem considerados são 'Tangerina Sunki' (*Citrus sunki* (Hayata) hort. Ex Tanaka) e 'Trifoliata' (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.).

A Tangerina Sunki é originária da China, onde é muito utilizada como porta-enxerto. No Brasil, este porta-enxerto passou por seleções naturais na Bahia, dando origem à seleção 'Sunki Tropical', cuja principal característica que a difere da Tangerina Sunki "original" é o maior número de sementes viáveis. Copas sobre tangerineira 'Sunki' geralmente apresentam precocidade de produção, boa produtividade e baixas oscilações de safra. Esse porta-enxerto é tolerante à seca e ao frio, confere maturação dos frutos e é tardia. É considerado intermediário, quanto às características do limoeiro 'Cravo', e 'Cleópatra', em relação à copa (Bastos et al. 2014). Do ponto de vista fitossanitário possui baixa resistência ao declínio, apresenta tolerância à tristeza, exocorte, xiloporose, ao declínio e à morte súbita dos citros (Pompeu Júnior, 2005; Souza; Schwarz; Oliveira, 2010).

O grande problema da utilização de Sunki, como porta-enxerto, é a sua alta susceptibilidade à gomose ou, podridão das raízes e do tronco (Feichtenberger et al. 2005; Pompeu Júnior, 2005; Bastos et al. 2014).

Trifoliata também é originário da China e tem sido utilizado como porta-enxerto cítrico, desde o início do primeiro milênio. As plantas são de porte baixo, com folhas trifolioladas e caducas e pecíolo alado.

P. trifoliata é considerado um porta-enxerto com potencial ananicante, que pode se expressar com maior ou menor intensidade, dependendo de condições edafoclimáticas, da variedade da copa, presença de viroses e uso da irrigação. Apresenta dormência, após períodos contínuos de baixas temperaturas, seguida de perda das folhas, o que favorece maior resistência ao frio (Bastos et al. 2014).

Em solos argilosos (onde há maior retenção de água) as plantas enxertadas em *P. trifoliata* crescem mais rapidamente e atingem maior tamanho, quando comparadas às enxertadas em limão Cravo.

É consideravelmente suscetível à seca, com bons resultados de produção, quando cultivado no Sul do País, sem irrigação, onde o número de brotações é menor e há possibilidade de safras tardias. Este porta-enxerto proporciona frutos com maior teor de açúcar, quando combinado com a acidez levemente acentuada, proporcionando ótimo sabor (Bastos et al. 2014). É um

porta-enxerto considerado tolerante à xiloporose, imune a tristeza e resistente a gomose de *Phytophthora* spp. (Carvalho, 2000; Pompeu Júnior, 2005).

2.3 - *Phytophthora* spp.

A junção das palavras gregas *phyton* (planta) e *phthora* (destruição), formam o nome do gênero *Phytophthora*, ou seja, destruidor de plantas. De fato, o nome se justifica, visto a sua ampla gama de hospedeiros, bem como o potencial de causar danos em diversas culturas agrícolas (Erwin & Ribeiro, 1996).

Embora estudado dentro da micologia o gênero *Phytophthora* não pertence ao reino Fungi. Dick (2001) classificou espécies de *Phytophthora* como sendo do reino Straminipila, sub-reino Chromophyta, filo Heterokonta, subfilo Peronosporomucotina, classe Peronosporomycetes, sub-classe Peronosporomycetidae, ordem Pythiales e família Pythiaceae. Já o site *index fungorum* (acesso em: 10 out. 2017) enquadra as espécies de *Phytophthora* dentro do Reino Chromista, filo Oomycota, divisão Incertae sedis, classe Peronosporae, subclasse Peronosporidae, ordem Peronosporales e família Peronosporaceae.

As principais características que diferem esses organismos dos fungos são: a presença de hifas diplóides e cenocíticas, parede celular composta principalmente de celulose e β -glucanas (Dick, 2001).

P. nicotianae foi isolada, pela primeira vez, de plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) por Breda de Haan (1896). Porém, Dastur (1913) isolou *Phytophthora* de plantas de mamona (*Ricinus communis* L.) com sintomas de requeima e observou que, a espécie apresentava anterídios anfígenos e não anterídios paráginos, como descrito por Breda de Haan. Então, deu-lhe o nome de *P. parasitica*. Waterhouse (1963) reclassificou a espécie dividindo-a em duas variedades, *P. nicotianae* var. *nicotianae* e *P. nicotianae* var. *parasitica*. Entretanto, Ho e Jong (1989) e Hall (1994) afirmam não haver evidências suficientes para que se justifique a separação das espécies. Ainda assim,

atualmente, a nomenclatura mais utilizada é *P. nicotianae* Breda de Haan (*P. parasítica* Dastur).

Estes oomicetos 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).

Mundialmente existem relatos de 13 espécies de *Phytophthora* como patógenos de citros: *P. arecae*, *P. boehmeriae*, *P. cactorum*, *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. mitricola*, *P. citrophthora*, *P. drechsleri*, *P. hibernalis*, *P. megasperma*, *P. nicotianae* (sin. *P. parasítica*), *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 de citros (Feichtenberger et al. 2005).

2.3.1 Gomose

A gomose de *Phytophthora* sp. é uma doença multicíclica. O patógeno pode sobreviver em órgãos de plantas mortas (como necrotrófico) e vivas (como biotrófico) e se reproduz sexuada e assexualmente (Bonnet et al. 2007). Quando em biotrofia, forma haustórios e redireciona o metabolismo do hospedeiro suprimindo suas defesas (Pastruga, 2003).

A infecção efetuada por zoósporos é a mais importante para epidemiologia da doença. Em condições de água livre eles são atraídos pelos exsudatos radiculares de plantas suscetíveis (Santos, 2015). Ao atingirem a superfície radicular, ou outras partes da planta, os zoósporos germinam, produzindo hifas que podem infectar outras partes das plantas (Feichtenberger et al. 2005).

Em plantas adultas, a gomose é caracterizada pela exsudação de goma em lesões de tronco e colo. Manifesta-se na parte externa do colo da planta, no

lenho do tronco, nas raízes e em ramos mais altos, sob a forma de pequenas gotas de goma de cor marrom. Os tecidos internos ficam necrosados, com tonalidade pardacenta a marrom (Ledo et al. 1996). Os frutos mais próximos ao solo podem apresentar podridão seca de cor marrom-parda e também ficam pequenos, de casca fina e maturação precoce. Em viveiros de mudas, a doença pode causar “damping-off” de pré e de pós-emergência, podridão de raízes e radículas, lesões nos ramos e morte dos ponteiros (Laranjeira et al. 2005).

O controle químico dessa doença é realizado, principalmente, com fungicidas a base de metalaxil e fosetyl Al. No entanto, esses produtos caíram em desuso devido ao alto custo de aplicação, além de danos ambientais e seleção de estirpes resistentes (Queiros; Melo, 2006).

A forma mais utilizada hoje para se manejar a doença é o uso de porta-enxertos resistentes. O uso de porta-enxertos resistentes, associado à obrigatoriedade do uso de mudas certificadas, fez com que a doença perdesse quase toda importância na citricultura paulista e gaúcha (De Oliveira et al. 2013). Porém, em outros estados como Paraná e alguns estados do Nordeste ainda não existe a obrigatoriedade do uso de mudas certificadas fazendo com que a gomose de *Phytophthora* sp. ainda cause muitos prejuízos (Caixeta et al. 2013). Uma outra alternativa também interessante e ainda pouco explorada é o controle biológico. Alguns pesquisadores têm obtido sucesso em trabalho *in vitro* e *in situ* com isolados e/ou “mix” microbianos ou mesmo com os metabolitos produzidos por agentes de controle biológico (Wehr, 2014; Bae et al. 2015; Hung et al. 2015)

2.4 Controle Biológico de fitopatógenos

Os problemas advindos do uso intensivo de agrotóxicos para o controle de pragas, fitopatógenos e plantas infestantes na agricultura são amplamente discutidos hoje em dia. O impacto causado pela intensificação do uso desses produtos vai desde a contaminação de alimentos, solos, águas, homens e ambientes até mais além. Desequilíbrios biológicos como a seleção de

organismos resistentes aos produtos químicos, alterações na ciclagem de nutrientes, eliminação de organismos benéficos e surgimento de doenças iatrogênicas são apenas alguns dos problemas ambientais causados pelos agrotóxicos (Morandi; Bettiol, 2009). Nos últimos anos a contaminação por agrotóxicos vem permeando a agenda ambiental de diversos países. A pressão da sociedade (principalmente dos países desenvolvidos) no sentido de consumir alimentos livres de contaminantes, está proporcionando um cenário de mudanças na agricultura (Junqueira; Luengo, 2000). Nesse cenário surge como alternativa o controle biológico. Trata-se de um método natural de controle de pragas e doenças, no qual organismos vivos são utilizados para controlar pragas e doenças da lavoura. A vantagem da utilização desse método é a ausência de resíduos químicos nos alimentos e no ambiente, a não exposição do aplicador aos agrotóxicos e o menor risco de seleção de patógenos resistentes.

O uso de controle biológico de pragas nas lavouras avançou muito nos últimos anos. Temos disponíveis no mercado hoje vários organismos como parasitóides, ácaros predadores e entomopatógenos como fungos, bactérias e vírus (Gallo et al. 2002). Porém, o mesmo panorama não é observado para o controle biológico de doenças. Existem hoje poucos produtos comerciais disponíveis, sendo que grande parte são formulados a partir de espécies de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. (Morandi; Bettiol, 2009).

Segundo Cook e Baker (1983) controle biológico de doenças pode ser definido como, “a redução da densidade de inóculo ou, das atividades de um patógeno que determinam uma doença, realizada direta ou indiretamente por um ou mais organismos”.

São vários os mecanismos os quais um organismo pode exercer o controle biológico sobre um fitopatógeno. Competição: principalmente por nutrientes e espaço. Morandi et al (2001) verificaram que o fungo *Clonostachys rosea* germina mais rápido que o patógeno *Botrytis cinerea* em folhas de roseira, de forma a exaurir os nutrientes dos exsudatos não permitindo assim a germinação do patógeno. Antibiose: Consiste na produção de compostos (principalmente antibióticos) que são deletérios aos fitopatógenos. *Bacillus*

subtilis produz antibióticos que reduzem a germinação de esporos e a infecção de vários fungos (Mizubuti et al. 1995). Indução de resistência: Alguns microrganismos, principalmente, as rizobactérias promotoras de crescimento (PGPRs do inglês *plant growth promoting rhizobacteria*) são capazes de estabelecer uma associação com a planta ativando seu mecanismo de defesa natural sem provocar sintomas (Van Loon et al. 1998). Silva et al (2004) demonstraram que um isolado de *B. cereus* foi capaz de ativar o mecanismo de defesa e diminuir os sintomas causados por *Alternaria solani* em plantas de tomate.

Para que se possa avançar no controle biológico de doenças em plantas cultivadas, é de suma importância estudar novos microrganismos, bem como seus respectivos modos de ação, sua interação com as diferentes plantas e fitopatógenos. Nesse trabalho procuramos evidenciar o potencial de duas rizobactérias em promover a indução de resistência em porta-enxertos cítricos, de forma a conter a infecção de *Phytophthora nicotianae*.

2.5 Resistência de plantas

Resistência de plantas a patógenos pode ser definida como a capacidade da planta de atrasar ou evitar a colonização dos seus tecidos pelo microrganismo patogênico (Hammerschmidt, 1999; Van Loon; Van Strien, 1999). Os mecanismos de defesa podem ser divididos em pré-formados (passivos; constitutivos) e pós-formados (ativos; induzíveis). De forma bem resumida podemos traduzir isso em: mecanismos que existem antes da chegada do patógeno, ou, que são ativados após a chegada do patógeno. O primeiro é representado pela cutícula, tricomas, estômatos, vasos condutores ou fatores bioquímicos, os quais envolvem a presença de fenóis, alcalóides, fototoxinas, glicosídeos cianogênicos e glicosídeos fenólicos. Os mecanismos pós-formados são representados pelas barreiras estruturais e podem envolver a lignificação, suberificação, formação de papilas e de camadas de abscisão e de cortiça, bem como as tiloses (Schwan-Estrada, Stangarlin; Pascholati, 2008).

As barreiras estruturais podem ser vistas como defesas físicas que restringem o desenvolvimento do patógeno. Já os bioquímicos pós-formados podem englobar o acúmulo de fitoalexinas e de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-PR), que são substâncias capazes de inibir o desenvolvimento do patógeno (Pascholati; Leite, 1995; Ulbrecht; Bowman, 2007).

A tentativa de utilizar os mecanismos de defesa da planta, para controlar doenças causadas por fitopatógenos do gênero *Phytophthora* não é recente, nos últimos dez anos, o número de trabalhos sobre o tema tem aumentado significativamente. Embora grande parte dos estudos utilize moléculas e/ou produtos químicos como potenciais indutores, o cenário, do ponto de vista agroecológico, também, é animador. Muitos pesquisadores vêm estudando organismos não patogênicos como fungos micorrízicos, *Trichoderma* spp, *Bacillus* spp e proteínas eliciadoras secretadas pelo patógeno, como potenciais indutores de resistência em plantas (Shoresh; Yedidia; Chet, 2005; Cameron et al. 2013; Lai et al. 2016).

2.5.1 Resistência induzida

A forma mais usual de classificar a resistência induzida é em função dos sinalizadores das rotas metabólicas: A induzida por microrganismos patogênicos, cujo o principal sinalizador é o ácido salicílico (AS) leva à expressão, principalmente, de proteínas-PR, sendo designada como resistência sistêmica adquirida ou SAR (*systemic acquired resistance*) (Mauch-Mani; Métraux, 1996 enquanto que, a resistência induzida por rizobactérias promotoras de crescimento ou PGPR (*plant growth promoting rhizobacteria*) é sinalizada, principalmente, pelo jasmonato (AJ) e etileno (ET) e é independente do AS, conhecida por resistência sistêmica induzida ou ISR (*induced systemic resistance*), (Bostock, 1999). Porém, alguns autores preferem o uso do termo indução de resistência (Hammerschmidt; Métraux; Van Loon, 2001). Tratar apenas como indução de resistência parece apropriado independente do agente biótico indutor. Segundo Pieterse et al (2005), existe a comunicação

cruzada entre as diferentes rotas de sinalização, não existindo uma distinção muito clara entre as diferentes rotas.

A ativação dos mecanismos de defesa promove a indução de várias proteínas de defesa codificadas por genes da planta, que incluem proteínas estruturais, enzimas do metabolismo secundário e proteínas relacionadas à patogênese (Proteínas-PR), responsáveis pelas mudanças quantitativas nos teores de proteína solúvel durante as respostas de defesa (Schwan-Estrada, Stangarlin; Pascholati, 2008). As Proteínas-PR não só são acumuladas no sítio de infecção, mas também são sistemicamente associadas com o desenvolvimento da resistência sistêmica adquirida (SAR) (Hammerschmidt, 1999; Van Loon; Van Strien, 1999). Por outro lado, a resistência sistêmica induzida (ISR) é ativada pela exposição de raízes a algumas rizobactérias promotoras de crescimento, sendo dependente dos fitormônios etileno e jasmonato, não havendo acúmulo das Proteínas-PR (Hammerschmidt, 1999; Van Loon; Van Strien, 1999).

As plantas respondem muito rapidamente a infecções causadas por oomicetos e patógenos fúngicos (Hardham; Jones; Takemoto, 2007). Mudanças rápidas na estrutura, incluindo acúmulo de resíduos citoplasmáticos no local da infecção e reorganização do citoesqueleto da planta.

Em hemibiotróficos como *Phytophthora*, um efector pode ter diferentes efeitos na interação, dependendo se ele é expresso durante a fase biotrófica mais precoce ou, no estágio necrotrófico mais tardio da doença (Kamoun, 2005).

2.5.2 Peroxidases

Um mecanismo importante na resposta da planta ao ataque de patógenos é representado pelo estresse oxidativo. Nas células vegetais, as espécies reativas de oxigênio (ROS), principalmente, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são geradas no citosol, cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomas e espaço apoplástico. As ROS ocorrem naturalmente no metabolismo celular, porém, quando há um acúmulo tornam-se tóxicas (Navrot et al. 2007; Quan et

al. 2008). As células possuem um complexo sistema de enzimas que trabalham a fim de minimizar o estresse oxidativo como a superóxido dismutase, catalase e as peroxidases (Gupta et al. 1993; Banci, 1997).

As peroxidases (PODs) participam de inúmeros processos fisiológicos como lignificação, suberização, catabolismo de auxina, tolerância à salinidade, mecanismos de defesa contra patógenos e herbívoros (Olson; Varner, 1993; Heiser; Osswald, 2008; Hiraga et al. 2001). São classificadas como proteínas relacionadas à patogênese e desempenham várias funções na defesa celular devido a sua participação na lignificação e no metabolismo da parede celular (Guzoo, 2003). É um grupo de enzimas de extrema importância na via dos fenilpropanóides, elas estão envolvidas na biossíntese da lignina, reforçando a parede celular da planta após um ferimento, ataque de patógeno ou mesmo em resposta a um indutor de resistência não patogênico (Marjamaa et al. 2006). Também participa da oxidação de compostos fenólicos que se acumulam em resposta à infecção (Fry, 1986)

A atividade dessas enzimas pode ser diferente em função do nível de resistência da planta hospedeira (Asada, 1992).

2.5.3 Fenilalanina amônia-liase

A fenilalanina amônia-liase é a enzima chave da rota dos fenilpropanóides, catalisando a reação de desaminação do aminoácido L-fenilalanina em ácido trans-cinâmico e amônia (Schwan-Estrada; Stangarlin; Pascholati, 2008). Esse é o primeiro passo da síntese dos fenilpropanóides, onde o ácido trans-cinâmico origina vários fenilpropanóides simples que dão origem a lignina, conferindo maior resistência à parede celular das plantas e, por consequência, aumenta a resistência ao ataque de patógenos (Nakazawa; Nozue; Yasuda, 2001).

Quando um fitopatógeno invade o tecido vegetal, induz a transcrição do mRNA que codifica para essa enzima, aumentando sua síntese, estimulando a produção de compostos fenólicos que possuem variadas funções na resposta da planta à infecção. Essa enzima, também, pode ser ativada por outros

fatores que não a infecção patogênica, como, hormônios, nutrientes, luz e ocorrência de ferimentos. (Jones, 1984).

2.5.4 Polifenoloxidase

Esse grupo de enzimas se encontra na forma “inativa” em membranas de tilacóides de cloroplastos, bem como em plastídeos e mitocôndria, devidamente separadas dos compostos fenólicos que estão armazenados no vacúolo. Quando há ferimentos, infecção por patógenos ou senescência acontece a ruptura da célula e essas enzimas são liberadas, iniciando o processo de oxidação de compostos fenólicos, que também são liberados dos vacúolos, dando origem ao o processo de lignificação (Jung et al. 2004; Thipyapong et al. 2004).

2.5.5 Fenóis

São todos os compostos que apresentam um anel benzeno ligado a uma (fenol) ou mais (polifenóis) hidroxilas. São produzidos ao acaso, ou em locais estratégicos, por células distribuídas pelos tecidos de plantas e são biossintetizados a partir de derivados da fenilalanina (Taiz; Zeiger, 2006; Lattanzio; Lattanzio; Cardinali, 2006). Esses compostos são mantidos em compartimentos, pois são tóxicos tanto para os patógenos, quanto para a célula vegetal. Em resposta a uma infecção esses compostos são liberados no citosol e rapidamente oxidados, pela ação das polifenoloxidase. (Isaac, 1992; Taiz; Zeiger, 2006).

Os compostos fenólicos apresentam ação sobre fungos e bactérias. Eles inibem a germinação de esporos, o crescimento micelial e afetam a produção da atividade de enzimas microbianas (Schwan-Estrada; Stangarlin; Pascholati, 2008). Além de promover os mecanismos de defesa da planta, os compostos fenólicos participam de outras importantes atividades fisiológicas das plantas como, germinação, crescimento de plantas e biossíntese de compostos alelopáticos (Taiz; Zeiger, 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e multiplicação das rizobactérias:

Os isolados de rizobactérias utilizados neste estudo foram BL06 (*Lactobacillus paracasei*) e CPMO3 (*Bacillus amyloliquefaciens*) pertencentes à coleção de microrganismos do Centro de Pesquisa Mokiti Okada (CPMO).

O isolado de *B. amyloliquefaciens* foi cultivado em placa de Petri contendo meio de cultura Nutriente-ágar, e incubado em estufa para BOD a temperatura de 28°C por 24 horas (Amorim; Melo, 2002). Para multiplicação de *L. paracasei* foi utilizado o meio ágar de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Brashers et al. 2003) e a incubação da cultura se deu em estufa para BOD a 35°C, por 48 horas.

Para a obtenção das suspensões bacterianas, adicionou-se 15 mL de água salina estéril (0,85% NaCl, com adição de 0,05% Tween 80) em cada placa de Petri contendo as culturas. Após fez-se a raspagem das culturas, para um tubo de ensaio. O processo se repetiu até obter uma concentração de $1,0 \times 10^9$ cel.mL⁻¹

3.2 Microbiolização das sementes com as rizobactérias

Sementes dos porta-enxertos de citros de tangerina Sunki (*Citrus sunki* Hort. ex Tan.) e Trifoliata (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf), considerados suscetível e tolerante à *P. nicotianae*, respectivamente, foram lavadas em água corrente, para retirada de resíduos e separação das sementes defeituosas. Logo após foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,7 % (v/v) por 5 minutos e lavadas em água destilada e esterilizada.

Após secagem (24 horas à 25°C), as sementes foram imersas em 100 mL das suspensões bacterianas ($1,0 \times 10^7$ cel.mL⁻¹, pela contagem em câmara de Neubauer) por 1 hora, sendo as sementes imersas em água, como tratamento controle. Três sementes de cada porta-enxerto foram semeadas em

tubetes de 50 cm³ contendo substrato esterilizado (Plantmax[®]) a 121°C e a 1 atm por 2 horas (Amorim; Melo, 2002).

Os tubetes foram mantidos em casa de vegetação climatizada com temperatura ajustada para 26 ± 3°C.

3.3 Preparo da suspensão contendo propágulos de *P. nicotianae*

Em 10 placas de Petri contendo meio de cultura cenoura-ágar (CA) foram adicionados um disco/placa de micélio de uma colônia ativa de *P. nicotianae* (isolado IAC 01/95) (Kaosiri; Zentmyer; Erwin, 1978). As culturas foram mantidas durante seis dias no escuro, para promover o crescimento micelial. Posteriormente, metade das placas foi mantida por 5 dias sob luz fluorescente contínua de maneira a estimular a produção de esporângios, enquanto que a outra metade das placas permaneceu no escuro. No final deste período, todas as placas, com as respectivas culturas, foram mantidas no escuro por mais três dias. O conteúdo das placas contendo micélio, esporângios e clamidósporos foi homogeneizado em liquidificador por 1 minuto e diluído em 800 mL de água destilada, segundo a metodologia descrita por Medina Filho et al (2004).

3.4 Preparo para os ensaios

Para esse estudo foram realizados três ensaios simultâneos ambos em delineamento inteiramente casualizado.

3.4.1 Ensaio 1

No primeiro ensaio, as sementes foram microbiolizadas com *B. amyloliquefaciens*, *L. paracasei* e água. Após microbiolização, as mesmas foram semeadas em tubetes de 50 cm³. Aos 75 e aos 79 dias após a

semeadura (DAS), as plantas foram retiradas (somente parte aérea) para quantificação enzimática.

A amostragem realizada aos 75 DAS, ocorreu junto com a primeira amostragem do ensaio 2.

3.4.2 Ensaio 2

No segundo ensaio as sementes foram microbiolizadas e semeadas em tubetes de 50 cm³ (assim como no primeiro ensaio). Aos 75 dias após a semeadura (DAS) foi feito no substrato (de todas as plantas), um pequeno furo com 1 cm de profundidade onde foi inoculado 5,0 mL da suspensão contendo propágulos de *P. nicotianae*. Para propiciar um microambiente ideal para o patógeno as plantas foram alocadas em uma câmara úmida.

A parte aérea das plantas foi retirada para quantificação enzimática nos tempos: 0, 24, 48, 72 e 96 horas após inoculação com *P. nicotianae*. O tempo 0 diz respeito ao momento logo após a inoculação.

3.4.3 Ensaio 3

Assim como no primeiro ensaio as sementes foram microbiolizadas com os tratamentos (*B. amyloliquefaciens*, *L. paracasei* e água) e semeadas em tubetes de 50 cm³. Aos 75 DAS, com auxílio de uma agulha de insulina foi realizado um pequeno ferimento na região do colo das plantas (5 cm acima do substrato). Com a mesma agulha foi retirado um pedaço de micélio de uma colônia ativa de *Phytophthora nicotianae*, e adicionado ao ferimento.

O local foi coberto com um algodão umedecido para propiciar um microambiente favorável ao patógeno. Durante 20 dias o algodão foi re-umedecido diariamente. Após esse período foi medido a área aproximada da lesão (comprimento x altura) e após as plantas foram retiradas para quantificação enzimática.

3.5 Análises bioquímicas

Para a quantificação e avaliação enzimática, foi utilizada toda parte aérea das plantas. Em seguida, as amostras foram higienizadas, cortadas em pedaços pequenos para facilitar a maceração. Logo após foram maceradas em nitrogênio líquido (-80°C), pesadas e, armazenadas em microtubo Eppendorf®, a -20°C até a avaliação das atividades enzimáticas.

3.5.1. Polifenoloxidase (PPO)

3.5.1.1 Preparo do tampão fosfato 0,2 mol.L⁻¹ pH 6,7

3.5.1.1.1 Solução de K₂HPO₄ (dibásico)

Para o preparo de 1 litro de solução foi adicionado à um frasco de Erlenmeyer 34,83 gramas de fosfato de potássio dibásico, e 1 litro de água deionizada. Logo após agitado até completa homogeneização.

3.5.1.1.2 Solução de KH₂ PO₄ (monobásico)

Para o preparo de 1 litro de solução foi adicionado à um frasco de Erlenmeyer 27,218 gramas de fosfato de potássio monobásico, e 1 litro de água deionizada. Logo após agitado até completa homogeneização.

Para o preparo do tampão fosfato (0,2 mol.L⁻¹), as soluções foram misturadas nas proporções para atingir o pH 6,7.

3.5.1.2 Montagem da reação

Em tubos Falcon® (15mL) foram colocados 30 mg do material macerado de cada amostra e 6 mL de solução tampão de fosfato de potássio (0,2 M) pH 6,7. Após as amostras foram centrifugadas a 5500 rpm por 40 minutos a 4°C.

Em um tubo de ensaio foram misturados 0,3 mL do sobrenadante e 1,85 mL de catecol (0,1 M). Para o branco da amostra foram misturados, 0,3 mL do sobrenadante e 1,85 mL de água destilada. E para o branco da solução (zerar o espectrofotômetro) foram misturados 0,3 mL da solução tampão e 1,85 mL de catecol.

Os tubos de ensaio foram incubados em banho-maria a 30°C, por 30 minutos. Após, a reação foi paralisada em banho-maria a 100°C. A leitura de absorbância foi feita em espectrofotômetro a 395 nm. A atividade da polifenoloxidase foi expressa em μmol de catecol consumido. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de massa fresca metodologia de Kar e Mishra, (1976), com modificações em Lima et al. (1999).

3.5.2. Peroxidase (POD)

3.5.2.1 Preparo das soluções

3.5.2.1.1 Solução A

Misturou-se 2,2 mL de H_2O_2 (30%) em 10 mL de água destilada. Desta solução, transferiu-se uma alíquota de 0,5 mL para um frasco de Erlenmeyer e completou-se com 50 mL de tampão fosfato de potássio, pH 6,7 a 0,2 M.

3.5.2.1.2 Solução B

Em um frasco de Erlenmeyer foram dissolvidos 81,5 mg de fenol em 40 mL de água destilada. Em outro frasco dissolveu-se 40,65 mg de aminoantipirina em 10 mL de água destilada. Após misturar com os 40 mL da solução de fenol já pronta.

3.5.2.2 Montagem da reação

Foi retirado 1 mL do mesmo sobrenadante utilizado na PPO (amostra) e adicionado a um tubo de ensaio juntamente com: 0,5 mL da solução "A" e 0,5 mL da solução "B". Para o "branco" da amostra foram misturados 1 mL do sobrenadante e 1 mL de água destilada. E para o branco da solução foram misturados 0,5 mL da solução "A", 0,5 mL da solução "B" e 1 mL de tampão fosfato $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,7.

Os tubos foram incubados em banho-maria a 30°C , por 30 minutos. Em seguida, de modo a parar a reação foram adicionados 2 mL de álcool etílico. A leitura de absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 505 nm. A atividade da peroxidase foi expressa em $\text{mmol de H}_2\text{O}_2 \text{ consumida min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de massa fresca (Allain et al.1974 com modificações em Lima et al.1999).

3.5.3. Fenilalanina amônia-liase (PAL)

3.5.3.1 Preparo das soluções

3.5.3.1.1 Tampão borato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 8,8

Em frasco de Erlenmeyer contendo 700 mL de água destilada diluiu-se 38,14g de borato de sódio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) com 50 g de PVP (polivinilpirrolidona). Essa solução foi deixada em banho ultrassônico por 1 hora, após esse tempo o pH foi ajustado para 8,8 com ácido clorídrico (HCl). O Volume foi completado para 1000 mL e no momento do uso foi adicionado 1,2 mL de β -mercaptoetanol.

3.5.1.2 Tampão borato 0,2 mol.L⁻¹

Em frasco de Erlenmeyer contendo 700 mL de água destilada diluiu-se 76,28g de borato de sódio (Na₂B₄O₇·10H₂O), a solução foi deixada em banho ultrassônico por 1 hora, após esse tempo o pH foi ajustado para 8,8 com ácido clorídrico (HCl) e o Volume foi completado para 1000 mL.

3.5.1.3 Solução de fenilalanina

Em 100 mL de água destilada foram dissolvidos 1,652 g de fenilalanina. Logo após essa solução foi colocada em banho-maria a 30°C para dissolver.

3.5.1.4 Montagem da reação

Em tubos Falcon[®] (15 mL) foram adicionados 50 mg de folhas maceradas e 10 mL de tampão borato de sódio 0,1 mol.L⁻¹ pH 8,8. Depois o material foi centrifugado por 40 minutos, a 4°C, 6000 rpm. 1 mL do sobrenadante foi adicionado a 1 mL de tampão borato 0,2 mol.L⁻¹ e 1 mL da solução de fenilalanina em cada tubo. Para o branco da amostra misturou-se 1 mL do sobrenadante e 2 mL de tampão borato 0,2 mol.L⁻¹. Para o branco da solução foram misturados 1 mL de tampão borato 0,1 mol.L⁻¹, 1 mL de tampão borato 0,2 mol.L⁻¹ e 1 mL da solução de fenilalanina. Incubou-se as amostras em banho-maria por 1 hora a 36°C. Para paralisar a reação acrescentou-se 0,1 mL de HCl 6,0 mol.L⁻¹. Posteriormente, realizou-se leitura a 290 nm em espectrofotômetro. A atividade PAL foi expressa em abs.min⁻¹.g⁻¹ de massa fresca (metodologia de Lisker et al. 1983, com modificações).

3.5.4 Fenóis totais

A análise foi realizada segundo o método espectrofotométrico com uso do reativo de Folin-Ciocalteu (Singleton; Rossi Jr, 1999). Para tal, foi colocado em tubos eppendorf[®] 30 mg de material macerado, e 2 mL de metanol 80%

(v/v). Os tubos foram colocados em banho ultrassônico por 20 minutos e submetidos à centrifugação a 15000 rpm por 10 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado e reservado em frascos escuros e selados. O processo foi repetido e o segundo sobrenadante combinado com o primeiro.

A reação foi conduzida em frascos escuros, sendo constituída de: 0,1 mL de sobrenadante; 0,9 mL de água destilada; 0,5 mL de reagente de Folin Ciocalteau; 2,5 mL de (carbonato de sódio) Na_2CO_3 (20% m/v). Para o “branco” foram misturados 0,1 mL de metanol; 0,9 mL de água destilada; 0,5 mL de reagente de Folin Ciocalteau; 2,5 mL de Na_2CO_3 (20% m/v)

Os frascos foram agitados e após 1 hora de descanso no escuro, foi realizada a leitura em 725 nm em espectrofotômetro. Para a curva padrão, foi utilizado 50 mg de ácido gálico, completando um balão volumétrico para 50 mL com metanol 80%.

3.6 Análise estatística

Os dados do ensaio 1 e os dados comparativos, entre o antes e o depois da inoculação de *P. nicotianae*, foram submetidos a análise de componentes principais (*principal component analysis* – PCA). Os dados do comportamento temporal das enzimas após a inoculação do patógeno, foram avaliados através de um boxplot estilo “violino” com densidade duplicada de kernel. As análises foram realizadas utilizando o programa R 3.3.3 (R Core Team 2017) em R-studio1.0.143 (R Studio 2017) com os seguintes pacotes: FactoMineR (Sebastien; Josse; Husson, 2008) e vioplot (Adler, 2005).

4 RESULTADOS

Comparando-se os dados do ensaio 1 percebe-se que a expressão enzimática foi distinta entre os porta-enxertos (Figura 1).

Em *C. sunki*, o tratamento com *B. amyloliquefaciens* se distinguiu dos demais pelos altos valores das enzimas fenilalanina amônia-liase (PAL) e polifenoloxidase (PPO). Os tratamentos controle e com *L. paracasei* apresentaram altos valores de atividade da peroxidase e dos compostos fenólicos. No PE *P. trifoliata* observa-se maior atividade apenas da POD.

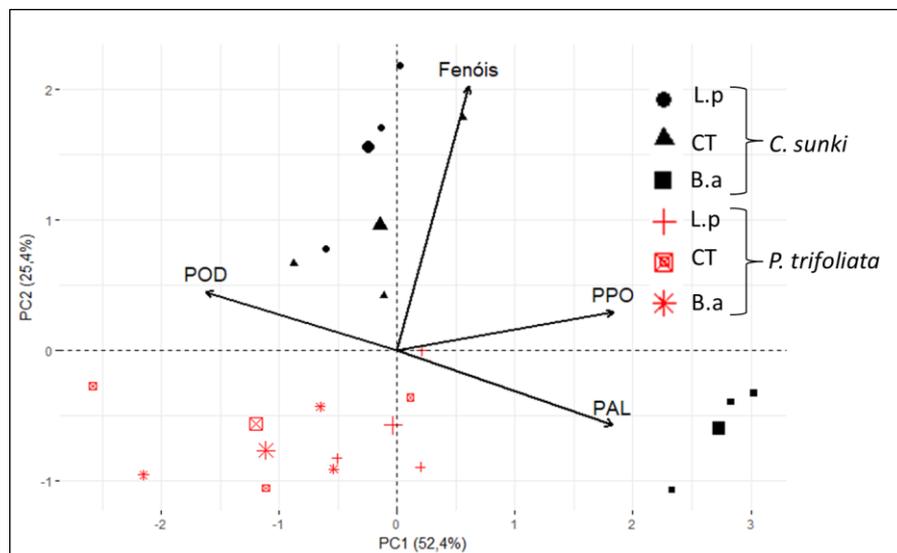


Figura 1 - Biplot da análise de componentes principais (PCA), realizada a partir da matriz de correlações entre os tratamentos e os porta-enxertos, *Citrus sunki* e *Poncirus trifoliata* sem inoculação do patógeno. Onde L.p = *Lactobacillus paracasei*, CT = Controle (água) e B.a = *Bacillus amyloliquefaciens*. No Biplot POD= peroxidase; PPO= polifenoloxidase; PAL= fenilalanina amônia-liase.

Os dados da Figura 2 mostram os resultados das atividades enzimáticas ao longo do tempo em porta-enxertos inoculados (ensaio 2) e tratados com as rizobactérias.

Para o PE *C. sunki* houve aumento no teor de fenóis em todos os tratamentos, em função do tempo (Figura 2A). Para atividade da peroxidase o tratamento com *B. amyloliquefaciens* provocou uma ligeira queda da atividade da enzima em função do tempo, enquanto que no tratamento com *L. paracasei* observou-se um leve aumento. Já o tratamento controle apresentou um

aumento expressivo dessa enzima. Para a polifeniloxidase, os tratamentos com as rizobactérias promoveram um ligeiro aumento da atividade enzimática, enquanto no controle houve queda nos teores da PPO. Observação repetida na fenilalanina amônia-liase, porém, com um aumento mais acentuado para o tratamento com *L. paracasei* e, uma queda drástica no tratamento controle.

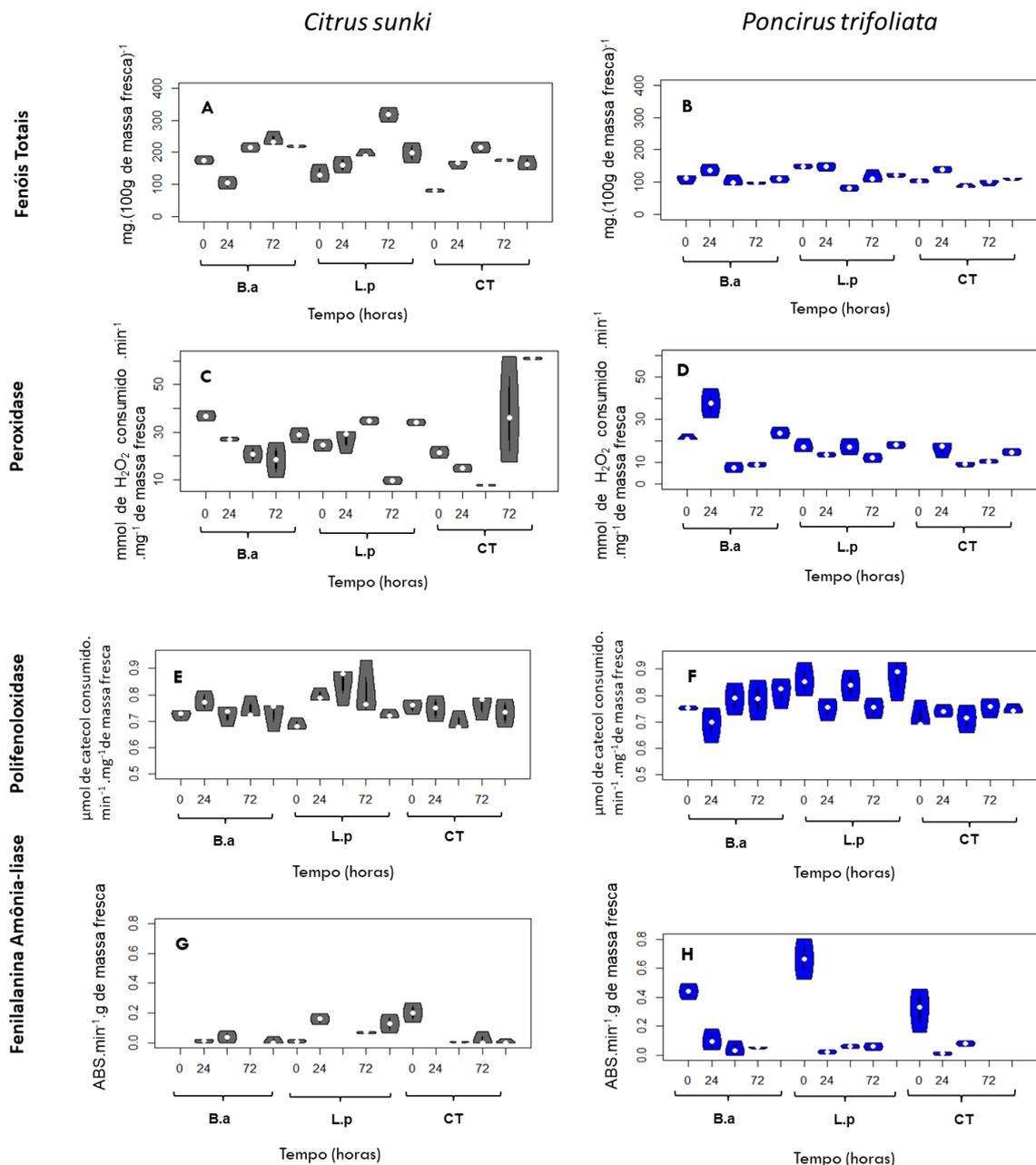


Figura 2 - Violin plot da atividade enzimática nos tempos 0; 24; 48; 72 e 96 horas após a inoculação de *P. nicotianae* aos 75 dias após a semeadura. Sendo compostos fenólicos (A e B), peroxidase (C e D), polifeniloxidase (E e F) e Fenilalanina amônia-liase (G e H), nos porta-enxertos *C. sunki* e *P. trifoliata* em função dos tratamentos com B.a (*Bacillus amyloliquefaciens*), L.p (*Lactobacillus paracasei*) e CT (água).

No porta-enxerto *P. trifoliata* os valores de fenóis totais não diferiram no tempo e nem entre os tratamentos. Para POD os tratamentos com as rizobactérias não diferiram, embora o tratamento com *B. amyloliquefaciens* mostrou ligeiro aumento. O tratamento controle apresentou elevação acentuada nos teores da POD no tempo. Para a enzima PPO todos os tratamentos apresentaram tendência crescente, sendo os maiores valores apresentados pelo tratamento com *L. paracasei*, seguidos de *B. amyloliquefaciens* e o controle, respectivamente. Para a PAL todos os tratamentos apresentaram queda abrupta, sendo o último valor registrado igual a zero. O tratamento com bactéria láctica apresentou maior valor inicial para essa enzima.

Para entender o efeito da inoculação de *P. nicotianae* precedido dos tratamentos, comparou-se a ativação das enzimas entre os tratamentos inoculados e não inoculados, aos quatro dias após a inoculação de *P. nicotianae*, no porta-enxerto *C. sunki* (Figura 3) e *P. trifoliata* (Figura 4).

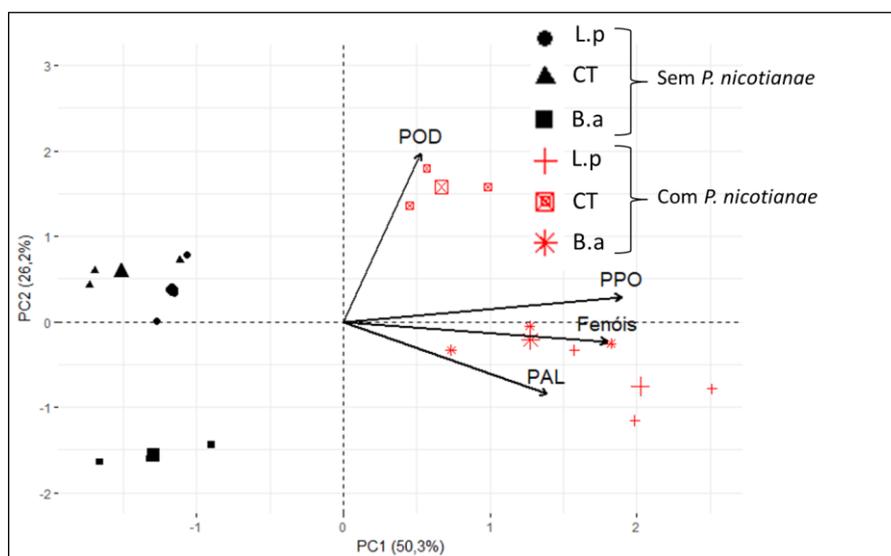


Figura 3 - Biplot da análise de componentes principais (PCA), realizada a partir da matriz de correlações para o porta-enxerto, *Citrus sunki*, inoculado e não inoculado com *Phytophthora nicotianae* cujas sementes foram tratadas com os B.a (*Bacillus amyloliquefaciens*), L.p (*Lactobacillus paracasei*) e CT (água). A coleta para quantificação das enzimas peroxidase (POD), polifenoloxidase (PPO) e Fenilalanina amônia-liase (PAL) foi realizada quatro dias após a inoculação com *P. nicotianae*.

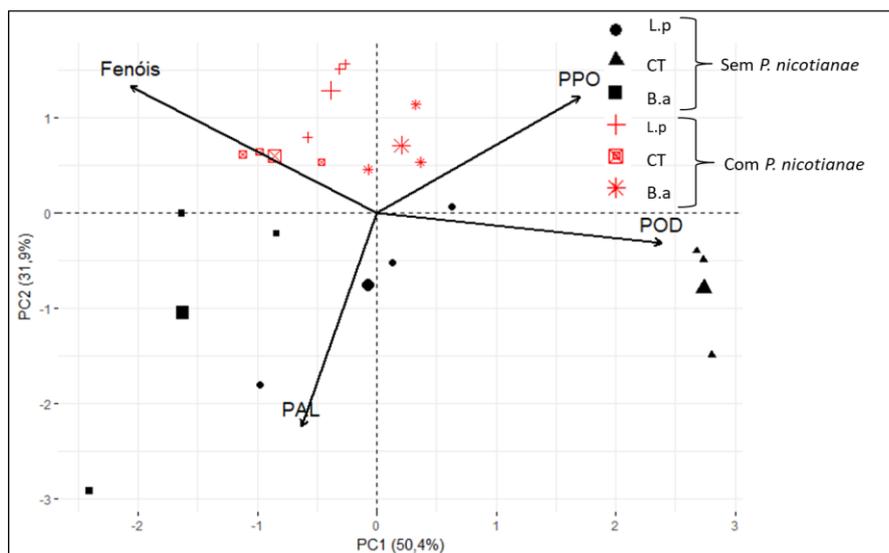


Figura 4 Biplot da análise de componentes principais (PCA), realizada a partir da matriz de correlações para o porta-enxerto, *Poncirus trifoliata*, inoculado e não inoculado com *Phytophthora nicotianae* cujas sementes foram tratadas com os B.a (*Bacillus amyloliquefaciens*), L.p (*Lactobacillus paracasei*) e CT (água). A coleta para quantificação das enzimas peroxidase (POD), polifenoloxidase (PPO) e Fenilalanina amônia-liase (PAL) foi realizada quatro dias após a inoculação com *P. nicotianae*.

Os dados da Figura 3 mostram que houve um aumento significativo da atividade enzimática nas plantas inoculadas, de um modo geral. As maiores atividades foram da PPO e da PAL nos tratamentos com as rizobactérias, enquanto que a POD foi menor, porém, no tratamento controle ela apresentou uma atividade mais expressiva. Com relação aos compostos fenólicos eles foram maiores nos tratamentos com as rizobactérias. As duas rizobactérias foram efetivas em ativar o sistema de defesa da planta, sendo *L. paracasei* mais eficiente em *C. sunki*. É importante mencionar que o alto teor dos compostos fenólicos foi observado nas plantas tratadas com *L. paracasei* em plantas não inoculadas, porém, com a inoculação do patógeno, o teor destes compostos foi maior. O tratamento com *B. amyloliquefaciens* antes da inoculação do patógeno já apresentava alta atividade de PAL, PPO e altos teores de fenóis totais, porém, com a inoculação do patógeno os valores observados aumentaram.

No porta-enxerto *P. trifoliata* houve um aumento a atividade enzimática após a inoculação do patógeno. Quando comparada a atividade enzimática antes e após 96 horas da inoculação do patógeno (Figura 4) as diferenças

foram pequenas, exceto para a POD. No tratamento controle sua atividade diminuiu significativamente, enquanto o oposto aconteceu com as plantas tratadas com o *B. amyloliquefaciens* (Figura 2).

No ensaio 3 onde se inoculou o patógeno no colo das plantas cítricas, observa-se a maior severidade da doença em plantas de *C. sunki*, quando comparado com *P. trifoliata*. No entanto, quando as plantas de *C. sunki* foram tratadas com *B. amyloliquefaciens*, as lesões foram menores que o tratamento controle e, em relação à atividade enzimática, verificou-se baixa concentração de PPO e PAL, porém, alta concentração da POD e maior quantidade de compostos fenólicos. Para *P. trifoliata* se observou maiores valores de PPO e PAL.

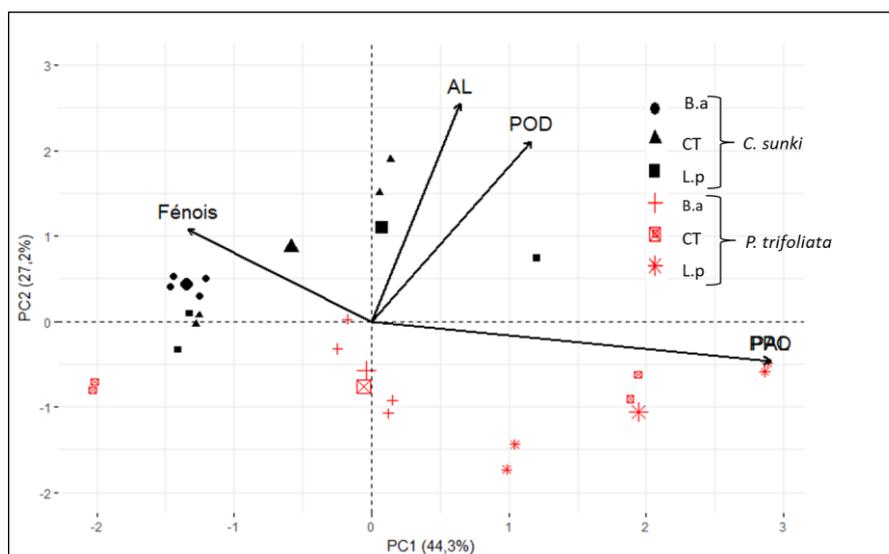


Figura 5 - Biplot da análise de componentes principais (PCA), realizada a partir da matriz de correlações entre os tratamentos e os porta-enxertos, *Citrus sunki* e *Poncirus trifoliata* com inoculação do patógeno no colo das plantas. Onde L.p = *Lactobacillus paracasei*, CT = Controle (água) e B.a = *Bacillus amyloliquefaciens*. No Biplot POD= peroxidase; PPO= polifenoloxidase; PAL= fenilalanina amônia-liase.

5 DISCUSSÃO

Esse estudo mostrou que a atividade das enzimas polifenoloxidase, peroxidase e fenilalanina amônia-liase, assim como, a produção de compostos fenólicos por *B. amyloliquefaciens* e *L. paracasei* dependeram dos porta-enxertos avaliados e da inoculação das plantas com *P. nicotianae*.

De um modo geral, foi possível observar que plantas de *C. sunki* apresentaram maiores teores de fenóis do que as plantas de *P. trifoliata* (ensaio 1, sem inoculação do patógeno). As plantas de *C. sunki* tratadas com *B. amyloliquefaciens* apresentaram menor teor de compostos fenólicos em relação às plantas tratadas com *L. paracasei* e o controle, por outro lado, mostrou uma elevada atividade das enzimas PPO e PAL. A PAL catalisa a primeira reação na via geral dos fenilpropanóides, oxidando compostos fenólicos para síntese e produção de lignina (Hemm et al. 2004; Ballester et al. 2013). O menor acúmulo de compostos fenólicos e a maior atividade da PAL apresentada em plantas de *C. sunki* tratadas com *B. amyloliquefaciens*, em relação ao tratamento controle, sugerem que essas plantas possam apresentar uma camada maior de lignina, considerando que a lignina confere uma resistência física às plantas, dificultando a entrada de patógenos (Nakazawa; Nozue; Yasuda, 2001). Resultado semelhante foi encontrado por Surekha et al (2014), onde os autores observaram que as plantas de *Vigna mungo*, provenientes de sementes microbiolizadas com *Trichoderma viride*, apresentaram baixo teor de fenóis e maior atividade da PAL.

Somente as plantas de *C. sunki* tratadas previamente com *B. amyloliquefaciens* e *L. paracasei* e inoculadas com *Phytophthora* apresentaram maior acúmulo de compostos fenólicos em relação ao tratamento controle. Segundo Cahill e Hardham (1994) raízes de plantas suscetíveis, como as de *C. sunki* secretam junto com seus exsudatos compostos que são atrativos aos zoósporos de *Phytophthora* spp. Albrecht e Bowman (2007), testando diferentes genótipos de citros verificaram maior concentração de fenóis em genótipos suscetíveis de citros, quando inoculados com *P. palmivora* corroborando com os resultados obtidos neste ensaio. Por outro lado, Duncan et al (1993)

observaram maior conteúdo fenólico em plantas de citrumelo Swingle (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf x *Citrus paradisi* Macf) (consideradas tolerantes) inoculadas com *P. nicotianae*. Mesmo resultado foi encontrado por Sahoo et al (2008) que ao inocularem *P. colocasiae* em plantas de inhame [*Colocasia esculenta* (L.) Schott] perceberam um aumento de mais de 50% na concentração de compostos fenólicos em folhas do cultivar resistente e de apenas 11,5% no cultivar suscetível.

Em ambos os porta-enxertos, a maior atividade da POD ocorreu nas primeiras 24 horas em plantas que foram tratadas com *B. amyloliquefaciens* (Figuras 2 C e D) e inoculadas com o patógeno. A atividade da POD é uma resposta ao estresse oxidativo, que pode ser gerado em resposta à infecção patogênica (Marjamaa et al. 2006). Logo a maior atividade observada dessa enzima em plantas tratadas com *B. amyloliquefaciens* pode ser atribuída a uma maior eficiência na geração de espécies reativas de oxigênio, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) que é tóxico a diversos patógenos (Hu et al. 2003). Dados similares foram obtidos por Faldoni et al (2015), segundo os autores plantas de laranja Caipira (genótipo suscetível) tratadas com biofertilizante e inoculadas com *P. parasítica* foram capazes de aumentar a expressão dos genes que codificam quitinase, lipoxigenase, peroxidase, β-1,3-glucanase e chalcona sintase. Araujo (2008) ao inocular *P. nicotianae* em sete clones de microtangerina, laranja azeda (resistente) e limão cravo (suscetível) verificou que houve alteração na atividade da POD apenas em folhas dos clones suscetíveis. Já Albrecht e Bowman (2007), testando porta-enxertos de citros com diferentes níveis de resistência, não observaram alteração na atividade da enzima depois de quatro semanas da inoculação de *Phytophthora* spp. Portanto, diferentes resultados foram encontrados por vários autores, o que sugere que a atividade da POD pode estar ligada também a outros fatores que não somente a infecção patogênica e/ou utilização de um agente indutor.

A atividade da PPO depois da inoculação do patógeno também aumentou nos dois porta-enxertos. É importante mencionar que em *P. trifoliata* a maior atividade da enzima foi observada logo após a inoculação das plantas

tratadas com *L. paracasei*. Partes desses resultados corroboram com Chandrasekaran e Chun (2016), que observaram tendência crescente na atividade da POD e da PPO em tomate (*Solanum lycopersicum*), quando tratados com *B. subtilis*.

Plantas de *P. trifoliata* tratadas, principalmente, com *L. paracasei* apresentaram uma atividade alta da PAL após a inoculação com o fitopatógeno. Vanitha, Niranjana e Umesha (2009) ao trabalharem com 20 cultivares de tomate, inoculados com *Ralstonia solanacearum*, verificaram que, os genótipos resistentes apresentaram maior atividade de PAL e PPO do que os genótipos suscetíveis, bem como, acumularam mais compostos fenólicos. Cahill e McComb (1992) verificaram que a inoculação de *P. cinnamomi* em raízes de *Eucalyptus calophylla* (resistente) e *E. marginata* (suscetível) apresentou aumento da atividade da PAL, somente no genótipo resistente. O menor acúmulo de compostos fenólicos associado à alta atividade da PPO e PAL em plantas de *P. trifoliata*, no tratamento controle, sugerem que o processo de lignificação e suberização é ativado rapidamente em resposta à infecção do patógeno, o que explicaria a tolerância natural de *P. trifoliata* a *P. nicotianae*.

Os resultados apresentados neste estudo sugerem que o período de tempo entre a inoculação de *P. nicotianae* no colo das plantas, e a avaliação dos sintomas deve ser mais longo para que diferenças entre os tratamentos com as rizobactérias possam ser evidenciados.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nesse trabalho, conclui-se que:

a) *Lactobacillus paracasei* e *Bacillus amyloliquefaciens* foram capazes de ativar o sistema de defesa de plantas cítricas, porém, a atividade enzimática varia em função do porta-enxerto;

b) A atividade enzimática foi maior quando as plantas foram inoculadas com *Phytophthora nicotianae*;

c) As rizobactérias interagem de formas distintas com cada um dos porta-enxertos, havendo necessidade de novos estudos para elucidar essas interações.

7 LITERATURA CITADA

ADAMI, A. C. D. O.; MIRANDA, S. H. G. D. Seguro Sanitário para citricultura: oportunidades e desafios. **Revista de Política Agrícola**, v. 23, n.1, 77-90, 2014.

ADLER, D. (2005). vioplot: Violin plot. R package version 0.2. <http://wsopuppenkiste.wiso.uni-goettingen.de/~dadler>.

Agriannual. 2017. Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: informa economics/FNP. 431 p.

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.

ALLAIN, C. C.; POON, L. S.; CHAN, C. S.; RICHMOND, W. F. P. C.; FU, P. C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical chemistry**, v. 20, n.4, p. 470-475, 1974.

AMORIM, E.P.R.; MELO, I.S. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasítica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, p.565-568, 2002.

ARAÚJO, J.R.G.; BROETTO, F.; SALIBE, A.A.; FEICHTENBERGER, E. Alteração na atividade de peroxidase e concentração de fenóis em microtangerinas (*Citrus* spp.) infectadas por *Phytophthora parasítica*. **Revista Brasileira Biociências** v.6, p.1-5, 2008

ASADA, K. Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 85, p. 235-241, 1992.

ASSIS, R. L. de; ROMEIRO, A. R. Agroecologia e Agricultura Orgânica: controvérsias e tendências. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 6, p. 67-80, 2002.

ATTANASIO, C.M. **Planos de manejo integrado na microbacia hidrográfica com uso agrícola: Uma abordagem hidrológica na busca da sustentabilidade**. 2004. 206f. Tese (Doutorado em Recursos Florestais), Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”/ Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

BAE, S. J.; MOHANTA, T. K.; CHUNG, J. Y.; RYU, M.; PARK, G.; SHIM, S.; HONG, S. B.; SEO, H.; BAE, D.W.; KIM, J. J.; BAE, H. *Trichoderma* metabolites as biological control agents against *Phytophthora* pathogens. **Biological Control**, v. 92, p. 128-138, 2016.

BALDOTTO, L.E.B.; OLIVARES, F.L. Phylloepiphytic interaction between bacteria and different plant species in a tropical agricultural system. **Canadian Journal Microbiology**. V. 54, p. 918-931, 2008

BALLESTER, A. R.; LAFUENTE, M.T.; DEVOS, R.C.H., BOVY, A.G.; GONZÁLEZ-CANDELAS, L. *Citrus* phenylpropanoids and defense against pathogens. Part I: Metabolic profiling in elicited fruits. **Food Chemistry**, v. 136, p. 178–185, 2013.

BANCI, L. Structural properties of peroxidases. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 53, n.1, p. 253- 263, 1997.

BASTOS, D.; FERREIRA, E.; PASSOS, O.; ATAÍDE, E.; CALGARO, M. (2014). Cultivares copa e porta-enxertos para a citricultura brasileira. **Embrapa Semiárido-Artigo em periódico indexado (ALICE)**.

BELASQUE JÚNIOR, J.; YAMAMOTO, P. T.; MIRANDA, M. P.; BASSANEZI, R. B.; AYRES, A. J.; BOVÉ, J. M. Controle do huanglonghing no estado de São Paulo, Brasil. **Revista Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.31, n.1, p.53-64, 2010.

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

BONNET, J.; DANAN, S.; BOUDET, C.; BARCHI, L.; SAGE-PALLOIX, A. M.; CAROMEL, B.; PALLOIX, A.; LEFEBVRE, V. Are the polygenic architectures of resistance to *Phytophthora capsici* and *P. parasitica* independent in pepper?. **Theoretical and Applied Genetics**, v.115, n.2, p. 253-264, 2007.

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

BOTEON, M.; NEVES, E. M. Citricultura brasileira: aspectos econômicos. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag, 2005. p.1-18.

BRASHERS, M. M.; JARONI, D; TRIMBLE, J. Isolation, selection and characterization of lactic acid bacteria for a competitive exclusion product to reduce shedding of *Eschericia coli* 0157:H7. in cattle. **Journal of Food Protection**, v. 66, p.355-363, 2003.

BREDA de HAAN, J. VAN. De bibitziekte in de Deli Tabak veroorzaakt door *Phytophthora nicotianae*. **Mededeelingen uit 's Lands Plantentuin**, v. 15, p. 57, 1896.

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

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.

CAIXETA, M. P.; NUNES, W. D. C.; DOS SANTOS, A. F.; TESSMANN, D. J.; VIDA, J. B. (2013). Espécies de *Phytophthora* associadas à gomose em pomares de citros no Estado do Paraná, Brasil. **Embrapa Florestas-Artigo em periódico indexado (ALICE)**.

CAMERON, D.D.; NEAL, A.L.; VAN WEES, S.C.M.; TON, J. Mycorrhiza-induced resistance: more than the sum of its parts? **Trends in Plant Science**. v.18, p. 539–545, 2013.

CAPORAL, F.R.; COSTABEBER, J.A. Agroecologia. Enfoque científico e estratégico. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**. Porto Alegre, v. 3, n. 2, p. 13-16, 2002.

CARVALHO, M. **Reação de porta-enxertos híbridos de citros à infecção de tronco e raízes por *Phytophthora parasitica***. 2000. 87 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento)–Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

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

CHANDRASEKARAN, M.; CHUN, S. C. Induction of defence-related enzymes in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants treated with *Bacillus subtilis* CBR05 against *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. **Biocontrol Science and Technology**, v. 26, p.10, p. 1366-1378, 2016.

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.

COOK, R.J.; BAKER, K.F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. **American Phytopathology Society**, 1983. 539p.

COSTA GOMES, J. C.; BORBA, M. Limites e possibilidades da agroecologia como base para sociedades sustentáveis. **Ciência & Ambiente**, Santa Maria: UFSM, n. 29, p. 05 -14, 2004.

DA SILVA, H. J. T.; Marques, P. V. Preços e margens de comercialização da indústria de citros no Brasil. **Revista de Política Agrícola**, v.24, n.4, 114-133, 2015.

DASTUR, J. F. *Phytophthora parasitica* n. sp., a new disease of the castor oil plant. **Memoirs of the Department of Agriculture in India. Botanical Series**, v. 5, p. 177-231, 1913.

DE OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W.; BORGES, R. D. S.; de CASTRO, L. A. S.; JOÃO, P. (2013). Mudras de citros. **Embrapa Clima Temperado-Sistema de Produção (INFOTECA-E)**.

DICK, M.W. Systematics (The Straminipila). In: DICK, M.W. **Straminipilous fungi: Systematics of the Peronosporomycetes including accounts of the**

marine straminipilous protists, the plasmodiophorids and similar organisms. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 267–432, 2001.

DONADIO, L. C.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MOREIRA, C. S. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag, p.1-18, 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.

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

FALDONI, L.; CRISTOFANI-YALY, M.; BOAVA, L. P.; SCHINOR, E. H.; KUPPER, K. C. (2015). Effect of Organic Manure in the Induction of Resistance of Citrus to *Phytophthora parasitica*. **Journal of Agricultural Science**, v.7, n.4, p.135.

FAWKE, S.; DOUMANE, M.; SCHORNACK, S.. Oomycete interactions with plants: infection strategies and resistance principles. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 3, p. 263-280, 2015.

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, cap 28, v.2, p. 239-269, 2005.

FEIDEN, A. Agroecologia: Introdução e Conceitos. In: AQUINO, A.M.; ASSIS, R.L. **Agroecologia: princípios e técnicas para uma agricultura orgânica sustentável**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 21-45, 2005.

FIGUEIREDO, M. G. D.; BARROS, A. L. M. D.; CONCEIÇÃO J. C. P. R. D.; (2012). Retorno econômico dos investimentos em P&D na citricultura paulista. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v.50, n.3, p. 493-502.

FRAVEL, D.R. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual Review Phytopathology**, v.43, p. 337–359, 2005.

FRY, S.C. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell wall of angiosperms. **Annual Review of Plant pathology**, v. 37, p. 165-186, 1986.

FUNDECITRUS - Fundo de Defesa da Citricultura. **Alerta fitossanitário**. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/alerta-fitossanitario>> acessado em 11 de ago. de 2017.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN. J.D.; MARCHINI. J.D.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Pragas das Plantas e Seu Controle**. In: Manual de Entomologia Agrícola. Piracicaba. FEALQ, cap. 12, v.10, 2002. p. 615-642.

GIASSI, V; KIRITANI, C; KUPPER, K.C. Bacteria as growth-promoting agents for citrus rootstocks. **Microbiological Research**, v. 190, p. 46-54, 2016.

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

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

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

HALL, G. *Phytophthora nicotianae*. IMI (International Mycological Institute) Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria Nº 1200. **Mycopathologia**, v. 126, p. 61-63, 1994.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p.895-914, 1997.

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

HAMMERSCHMIDT, R.; MÉTRAUX, J. P.; LOON, L. C. van. Inducing resistance: a summary of papers presented at the First International Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases, Corfu, may 2000. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, n. 1, p. 1-6, 2001.

HARDHAM, A. R.; JONES, D. A.; TAKEMOTO, D. Cytoskeleton and cell wall function in penetration resistance. **Current opinion in plant biology**, v.10, n.4, p. 342-348, 2007.

HART, R.D. **Agroecosistemas: conceptos básicos**. Turrialba: CATIE, 1980, 211 p.

HASSAN, M. N.; SHAH, S. Z. U. H.; AFGHAN, S.; HAFEEZ, F. Y. (2015). Suppression of red rot disease by *Bacillus* sp. based biopesticide formulated in non-sterilized sugarcane filter cake. **BioControl**, v.60, n.5, p. 691-702.

HECHT, S. B. A Evolução do pensamento agroecológico. In: ALTIERI, M. (Ed.). **Agroecologia - as bases científicas da agricultura alternativa**. Rio de Janeiro: PTA-FASE, 1989. p. 25-41.

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

HEMM, M.R.; RIDER, S.D.; OGAS, J.; MURRY, D.J.; CHAPPLE C. Light induces phenylpropanoid metabolism in *Arabidopsis* roots. **The Plant Journal**, v.38, p.765–778, 2004.

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

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

HUNG, P. M.; WATTANACHAI, P.; KASEM, S.; POEAIM, S. Efficacy of *Chaetomium* Species as Biological Control Agents against *Phytophthora nicotianae* Root Rot in Citrus. **Mycobiology**. v.43, n.3, p. 288-296, 2015.

HU, X.; BIDNEY, D.L.; YALPANI, N.; DUVICK, J.P.; CRASTA, O.; FOLKERTS, O.; LU, G. Overexpression of a Gene encoding hydrogen peroxide-Generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. **Plant Physiology**. V.133, p.170- 181, 2003.

IDRIS, E. E.; IGLESIAS, D. J.; TALON, M.; BORRIS, R. Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Molecular plant-microbe interactions**, v.20, n.6, p.619-626, 2007.

INDEX FUNGORUM. *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan. Egham: Centre for Agriculture and Biosciences International, 2014. Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=194443>>. Acesso em: 10 ago. 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Rio de Janeiro: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, v. 30, n. 06, p. 1–83, 2017.

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

JONES, D. H. Phenylalanine ammonia-lyase: regulations of its induction, and its role in plant development. **Phytochemistry**, Oxford, v. 23, n. 7, p. 1349-1359, 1984.

JUNG, W.J.; JIN, Y.L.; KIM, Y.C.; KIM, K.Y.; PARK, R.D.; KIM, T.H. Inoculation of *Paenibacillus illinoisensisalleviates* root mortality, activates of lignification-related enzymes, and induction of the isozymes in pepper plants infected by *Phytophthora capsici*. **Biological Control**. v. 30, p. 645–652, 2004.

JUNQUEIRA AH.; LUENGO RFA. Mercados diferenciados de hortaliças. **Horticultura Brasileira**, v.18, p. 98-99, 2000.

KALAKI, R. B.; NEVES, M. F. Strategic plan for the Brazilian agro-industrial citrus system. **Gestão & Produção**, São Carlos, v.24, n.2, p. 338-354, 2017.

KAMOON, S. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, v.44, p.41–60, 2005.

KAOSIRI, T.; ZENTMYER, G. A.; ERWIN, D. C. Stalk length as a taxonomic criterion for *Phytophthora palmivora* isolates from cacao. **Canadian Journal of Botany**, v.56, n15, p.1730-1738, 1978.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v.57, p.315- 319, 1976

LAI, Y. R.; LIN, P. Y.; CHEN, C. Y.; HUANG, C. J. Feasible Management of Southern Corn Leaf Blight via Induction of Systemic Resistance by *Bacillus cereus* C1L in Combination with Reduced Use of Dithiocarbamate Fungicides. **The plant pathology journal**, v.32, n.5, p. 481, 2016.

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. V.1, 929 p.

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, v.2, 2006. p. 23-67.

LEDO, A. da S.; ALMEIDA, N. F. de; AZEVEDO, F. F de. **Recomendações para o cultivo de citros no Estado do Acre**. Rio Branco: EMBRAPA–CPAF/AC, 1996. 29 p. (EMBRAPA–CPAF/AC. Circular Técnica, 18).

LIMA, G. P. P.; BRASIL, O. G.; OLIVEIRA, A. M. D. Poliaminas e atividade da peroxidase em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado sob estresse salino. **Scientia Agricola**, v. 56, n.1, p.21-26, 1999.

LISKER, N.; COHEN, L.; CHALUTZ, E.; FUCHS, Y. Fungal infections suppress ethylene-induced phenylalanine ammonia-lyase activity in grapefruits. **Physiological Plant Pathology**, v.22, n.3, 331-338, 1983.

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

MAREIDA, M.; PINGALI, P. **Environmental impacts of productivity enhancing crop research: a critical review**. Doc. No. SDR/TAC: IAR/01/14, Durban, South Africa, 2001.

MARJAMAA, K.; KUKKOLA, E.; LUNDELL, T.; KARHUNEN, P.; SARANP, A.A. P.; FAGERSTEDT, K.V. Monolignol oxidation by xylem peroxidase isoforms of Norway spruce (*Picea abies*) and silver birch (*Betula pendula*). **Tree Physiology**, v. 26, p. 605-611, 2006.

MAUCH-MANI, B; MÉTRAUX, J.-P. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 8, p. 203-212, 1996.

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

MEDINA FILHO, H. P.; BORDIGNON, R.; SIQUEIRA, W. J.; FEICHTENBERGER, E.; CARVALHO, M. R. T. Tolerância de híbridos e de

clones de porta-enxertos de citros à infecção de raízes por *Phytophthora nicotianae*. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.2, 2004.

MIZUBUTI, E.S.G.; MAFFIA, L.A.; MUCHOVEI, J.J.; ROMEIRO, R.S.; BATISTA, U.G. Epidemiological aspects of *Uromyces appendiculatus* on dry bean (*Phaseolus vulgaris*) after treatment with *Bacillus subtilis*. **Journal of Phytopathology**, v.143, p.689-691, 1995.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Org.). **Biocontrole de Doenças de Plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna-SP: Embrapa Meio Ambiente, 2009 p. 7-14.

MORANDI, M.A.B.; MAFFIA, L.A.; SUTTON, J.C. Development of *Clonostachys rosea* and interactions with *Botrytis cinerea* in rose leaves and residues. **Phytoparasitica**, v.29, p.103–113, 2001.

MOREIRA, J.C.; JACOB, S.C.; PERES, F.; LIMAS, J.S.; MEYER, A.; SILVA, J.J.O.; SARCINELLI, P.N.; BATISTA, D.F.; EGLER, M.; FARIA, M.V.C.; ARAÚJO, A.J.; KUBOTA, A.H.; SOARES, M.O.; ALVES, S.R.; MOURA, C.M.; CURI, R. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.7, n.2, p.299-311, 2002.

NAKAZAWA, A.; NOZUE, M.; YASUDA, H. Expression pattern and gene structure of phenylalanine ammonia-lyase in *Phaseolus nil*. **Journal of Plant Research**, v. 114, p. 323-328, 2001.

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

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**. São Paulo: Independente, v.1, 137 p., 2010. Disponível em:

<http://www.citrusbr.com.br/download/biblioteca/o_retrato_da_citricultura_brasileira_baixa.pdf >. Acesso em: 05 jun. 2017.

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

PAÇO, R. S.; LEME, I. L.; BOTTINO, J. A.; FERREIRA, A. J. P. Identification of *Lactobacillus* spp. from broiler litter in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, n.3, p.236-237, 2003.

PANSTRUGA, R. Establishing compatibility between plants and obligate biotrophic pathogens. **Current opinion in plant biology**, v.6, n.4, p.320-326, 2003.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência: In: BERGAMIN, F.A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed) **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. São Paulo: Ed. Agrônoma Ceres. v.1. cap.22, 1995, p. 417-452.

PIETERSE, C. M. J.; VAN PELT, J. A.; VAN WEES, S. C. M.; TON, J.; VERHAGEN, B. W. M.; LÉON-KLOOSTERZIEL, K.; HASE, S.; DE VOS, M.; OOSTEN, V. V.; POZO, M.; SPOEL, S.; VAN DER ENT, S.; KOORNNEEF, A.; CHALFUN-JUNIOR, A.; RESENDE, M. L.V.; VAN LOON, L. C. Indução de resistência sistêmica por rizobactérias e comunicação na rota de sinalização para uma defesa refinada. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 13, p. 277-295, 2005;

POMPEU JÚNIOR, J. Porta-enxertos. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC/FUNDAG, 2005. V.1, p. 63-104.

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

QUEIROZ, B. P. V. D.; MELO, I. S. D. (2006). Antagonism of *Serratia marcescens* towards *Phytophthora parasitica* and its effects in promoting the growth of citrus. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, n.4, p. 448-450.

R CORE TEAM (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

R STUDIO (2017): integrated development environment for R. R Studio, Boston, MA.

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.

SANDERS, M.E.; KLAENHAMMER, T.R. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. **Journal Dairy Science**, Savoy, v.84, p.319-331, 2001.

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

SEBASTIEN, L.; JOSSE, J.; HUSSON, F. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. **Journal of Statistical Software**, v.25, n.1, p.1-18, 2008.

SHORESH, M.; YEDIDIA, I.; CHET, I. Involvement of jasmonic acid/ ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. **Phytopathology**, v.95, p.76-84, 2005.

SILVA, H.S.A.; ROMEIRO, R.S.; CARRER, R.; PEREIRA, J.L.A.; MIZUBUTI, E.S.G.; MOUNTEER, A. Induction of systemic resistance by *Bacillus cereus* against tomato foliar diseases under field conditions. **Journal of Phytopathology**. V.152 p.371–375, 2004.

SILVA, K. S.; REBOUÇAS, T. N. H.; BOMFIM, M. P.; SILVA, D. S.; SÃO JOSÉ, A. R.; BENETT, C. G. S. Atividade antagônica in vitro de isolados de *Trichoderma* spp. ao fungo *Phytophthora citrophthora*. **Semina: Ciências Agrárias**, v.29, p. 749-754, 2008.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v.16, n.3, p.144-158, 1965.

SOUZA, E.L.S.; SCHWARZ, S.F.; OLIVEIRA, R.P. Porto-enxertos para citros no Rio Grande do Sul. In: SOUZA, P.V.D.; SOUZA, E.L.S.; OLIVEIRA, R.P.; BONINE, D.P. (Ed.). **Indicações técnicas para a citricultura no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, 2010. p. 19–29.

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

SUREKHA, C.; NEELAPU, N.; Prasad, B. S.; Ganesh, P. S. Induction of defense enzymes and phenolic content by *Trichoderma viride* in *Vigna mungo* infested with *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata*. **International Journal of Agricultural Science and Research**, v.4, n.4, p. 31-40, 2014.

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

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.

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

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual review of phytopathology**, v.36, n.1, p.453-483, 1998.

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

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.

VÁSQUEZ A.; MOLIN G.; PETTERSSON B.; ANTONSSON, M.; AHRNE S. DNA-based classification and sequence heterogeneities in the 16S rRNA genes of *Lactobacillus casei/paracasei* and related species. **Systematic and Applied Microbiology**, v.28, p.430-441, 2005.

WANG, N.; TRIVEDI, P. Citrus Huanglongbing: A Newly Relevant Disease Presents Unprecedented Challenges. **Phytopathology**, v. 103, n. 7, p. 652–665, 2013.

WATERHOUSE, G. M. **Key to the species of Phytophthora de Bary**. Kew, UK: Commonwealth Mycological Institute, Mycological Papers, n. 92. 1963. 22 p.

WEHR, P. P. **Biofertilizantes, a base de esterco bovino, no controle de *Phytophthora nicotianae* em citros**. 2014. 73 f. Dissertação (Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural)-Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2014.