

Mecanismos de ação do fosfito de potássio no crescimento e desenvolvimento de

***Phytophthora nicotianae*, agente causal da gomose em citros**

Mode of action of potassium phosphite in the growth and development of *Phytophthora*

***nicotianae*, causal agent of gummosis in citrus**

Mecanismos de acción del fosfito de potasio en el crecimiento y desarrollo de

***Phytophthora nicotianae*, agente causal de la gomosis en cítricos**

Recebido: 26/09/2020 | Revisado: 02/10/2020 | Aceito: 06/10/2020 | Publicado: 07/10/2020

Dalilla Carvalho Rezende

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5572-4901>

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais, Brasil

E-mail: dalilla.rezende@ifsuldeminas.edu.br

Dayson Fernando Ribeiro Brandão

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0720-5060>

Stoller do Brasil, Brasil

E-mail: dayson.brandao@gmail.com

Simone Cristiane Brand

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0916-5448>

PlantCare Pesquisa Agrícola Ltda., Brasil

E-mail: scbrand@alumni.usp.br

Silvia Blumer

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6893-7639>

Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos, Brasil

E-mail: silviablumer@gmail.com

Sérgio Florentino Pascholati

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9690-9694>

Universidade de São Paulo, Brasil

E-mail: sfpascho@usp.br

Natália Moreira Mafra

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0083-0867>

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais, Brasil

E-mail: natalia.mafra@ifsuldeminas.edu.br

Resumo

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito direto do Phytogard[®], produto à base de fosfito de potássio, sobre o desenvolvimento de *Phytophthora nicotianae* e verificar possíveis mecanismos de ação desse produto sobre o patógeno. O micélio do patógeno foi exposto a concentrações crescentes de Phytogard[®] sendo avaliado o crescimento micelial, produção de massa fresca de micélio e produção de zoósporos. Quanto aos possíveis mecanismos de ação do Phytogard[®] sobre *P. nicotianae*, avaliou-se a morfologia das hifas, perda de eletrólitos, peroxidação de lipídios, síntese de proteínas e atividade da enzima β -1,3-glucanase. O micélio do patógeno foi inibido à medida que se aumentou a concentração de fosfito. A produção de zoósporos foi reduzida a partir da menor concentração de Phytogard[®] utilizada. Houve mudanças morfológicas nas hifas do patógeno e a perda de eletrólitos foi crescente à medida que se aumentou a concentração do produto e ao longo do tempo. Não houve diferença entre os tratamentos nas análises de peroxidação de lipídios e proteínas totais. Houve decréscimo na atividade da enzima β -1,3-glucanase à medida que as concentrações de Phytogard[®] aumentaram. Conclui-se que o Phytogard[®] inibe o crescimento micelial, a produção de massa fresca de micélio e de zoósporos de *P. nicotianae*. Além disso, o produto diminui a espessura das hifas e aumenta o número de ramificações atrofiadas, além de prejudicar a permeabilidade da membrana plasmática e a síntese de parede celular do patógeno.

Palavras-chave: Membrana plasmática; Parede celular; Controle alternativo.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the direct effect of Phytogard[®], a product based on potassium phosphite, on the development of *Phytophthora nicotianae* and to verify possible mode of action of this product on the pathogen. The pathogen's mycelium was exposed to increasing concentrations of Phytogard[®] and mycelial growth, production of fresh mycelium and zoospores production were evaluated. Regarding the possible mode of action of Phytogard[®] on *P. nicotianae*, the hypha morphology, electrolyte leakage, lipid peroxidation, protein synthesis and β -1,3-glucanase activity were evaluated. The pathogen mycelium was inhibited as the phosphite concentration was increased. The production of zoospores was reduced from the lowest concentration of Phytogard[®] used. There were morphological changes in the pathogen's hyphae and the electrolyte leakage increased as the concentration of the product increased and over time. There was no difference between treatments in the analysis of lipid peroxidation and total protein. There was a decrease in the activity of the enzyme β -1,3-glucanase as the concentrations of Phytogard[®] increased. It is concluded that

Phytogard® inhibited mycelial growth, production of fresh mycelium and zoospores production of *P. nicotianae*. Furthermore, the product decreases the thickness of hyphae and increases the number of atrophied ramifications, in addition to harming plasma membrane permeability and cell wall synthesis of the pathogen.

Keywords: Plasma membrane; Cell wall; Alternative control.

Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de Phytogard®, un producto a base de fosfito de potasio, sobre el desarrollo de *Phytophthora nicotianae* y verificar los posibles mecanismos de acción de este producto sobre el patógeno. El micelio del patógeno fue expuesto a concentraciones crecientes de Phytogard® y se evaluó el crecimiento del micelio, la producción de la masa fresca del micelio y la producción de zoosporas. En cuanto a los posibles mecanismos de acción de Phytogard® sobre *P. nicotianae*, se evaluaron la morfología de las hifas, la pérdida de electrolitos, la peroxidación de lípidos, la síntesis de proteínas y la actividad de la β -1,3-glucanasa. El micelio del patógeno se inhibió al aumentar la concentración de fosfito. La producción de zoosporas se redujo a partir de la menor concentración de Phytogard® utilizada. Se produjeron cambios morfológicos en las hifas del patógeno y la pérdida de electrolitos se incrementó a medida que la concentración del producto aumentaba y con el tiempo. No hubo diferencia entre tratamientos en los análisis de peroxidación de lípidos y proteínas totales. Hubo una disminución en la actividad de la enzima β -1,3-glucanasa a medida que aumentaron las concentraciones de Phytogard®. Se concluye que Phytogard® inhibe el crecimiento del micelio, la producción de la masa fresca del micelio y zoosporas de *P. nicotianae*. Además, el producto disminuye el grosor de las hifas y aumenta las ramificaciones atrofiadas, además de perjudicar la permeabilidad de la membrana plasmática y la síntesis de la pared celular del patógeno.

Palabras clave: Membrana plasmática; Pared celular; Control alternativo.

1. Introdução

Introduzida no Brasil logo no início da colonização, a laranja encontrou no país melhores condições para vegetar e produzir do que nas próprias regiões de origem (sul asiático), expandindo-se por todo o território nacional (Neves et al., 2010). Na safra de 2019-2020, a produção nacional de laranjas atingiu cerca de 18,3 milhões de toneladas, sendo o estado de São Paulo o maior produtor, seguido por Minas Gerais e Bahia (IBGE, 2020).

Entretanto, a citricultura brasileira, particularmente a paulista, enfrenta problemas que envolvem ordem política, econômica e fitossanitária. Dentre a ocorrência de doenças, a gomose causada por diferentes espécies de oomicetos do gênero *Phytophthora*, é considerada uma das mais importantes (Graham & Timmer, 1994).

Ainda é um desafio para os fitopatologistas proteger as plantas contra patógenos, principalmente espécies de *Phytophthora* (Dalio et al., 2014). Devido ao fato de *Phytophthora* spp. produzirem estruturas de resistência, a eliminação desses patógenos do solo é praticamente impossível após sua introdução na área. Desse modo, a exclusão é o principal método de controle de doenças provocadas por espécies desse gênero (Feichtenberger et al., 2005).

Os fosfitos são compostos produzidos a base de fósforo (P), e apesar de serem absorvidos pelas folhas e raízes, os fosfitos não são oxidados ou metabolizados pelas plantas (Niere, Griffith & Grant 1990; Guest & Grant, 1991). Os fosfitos são capazes de prejudicar o desenvolvimento dos fitopatógenos e sua fungitoxicidade varia entre as espécies, dependendo principalmente da exposição do patógeno a estes compostos (Dalio et al., 2012). O Comitê de Ação a Resistência a Fungicidas (FRAC), classifica os produtos derivados do ácido fosforoso, como o fosetyl-alumínio, rotineiramente utilizado no controle de oomicetos, e os fosfitos, como indutores de defesa da planta hospedeira (FRAC, 2020).

Alguns autores recentemente relataram que o tratamento com fosfito tem levado algumas espécies de hospedeiro ao estado de *priming*, que é a potencialização de enzimas ligadas ao sistema de defesa da planta e no aumento de compostos fenólicos e fitoalexinas no sítio de infecção, mostrando significativas reduções da doença após a inoculação com o patógeno (Eshraghi et al., 2011; Dalio et al., 2014). Portanto, é possível inferir que o fosfito atue de duas formas sobre o patógeno: induzindo mecanismos de defesa do hospedeiro contra o fitopatógeno e/ou inibindo diretamente o desenvolvimento do microrganismo (Jackson et al., 2000; Dalio et al., 2012).

Considerando o baixo risco à saúde exibido por produtos que contêm resíduos de fosfito (European Commission, 2013) e o efeito deste produto no controle de doenças, seu uso torna-se uma alternativa ambiental, social e economicamente vantajosa, já que os fosfitos são produtos de baixo custo. Em vista disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito direto de diferentes concentrações do produto comercial à base de fosfito de potássio, o Phytogard[®], sobre o desenvolvimento de *P. nicotianae* e verificar os possíveis mecanismos de ação desse produto sobre esse patógeno.

2. Metodologia

2.1. Fosfito de potássio

A fonte de fosfito de potássio utilizada foi o Phytogard®, produzido pela Stoller do Brasil Ltda. O produto contém 28% de P_2O_5 , obtido a partir de ácido fosforoso e 26% de K_2O , com densidade de $1,51 \text{ g L}^{-1}$ e $\text{pH} = 7$.

2.2. Efeito sobre o crescimento micelial

Foram utilizadas placas de poliestireno de 90 mm contendo 20 mL de solução de Phytogard® em meio cenoura-ágar nas concentrações de 0; 2; 4; 6; 8 e 10 mL L^{-1} , com o intuito de identificar a concentração efetiva de produto capaz de inibir o crescimento do patógeno. Como controle, foram utilizadas placas contendo apenas o meio de cultivo.

Foi depositado no centro de cada placa um disco de meio (5 mm) contendo o patógeno, obtido de colônias com sete dias de idade de *P. nicotianae*. As placas foram incubadas à $25 \text{ }^\circ\text{C}$ no escuro e a avaliação consistiu em duas medições perpendiculares ao diâmetro da colônia com o auxílio de paquímetro digital. Com os resultados obtidos, foi calculada a inibição do crescimento micelial do patógeno, expressa em porcentagem.

A partir destes dados, foi estudada uma regressão linear para determinação da EC_{50} , a qual representa a concentração efetiva de Phytogard® capaz de inibir em 50% o crescimento micelial do patógeno (Russell, 2002).

2.3. Preparo das amostras para observação em Microscópio Eletrônico de Varredura

Foram retirados fragmentos (5x5 mm) do meio de cultivo dos bordos das colônias contendo o patógeno para o processamento de todos os tratamentos mencionados no ensaio anterior. Os fragmentos foram submersos em solução contendo glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,0%, tampão fosfato 0,05M, $\text{pH} 7$, por 12h. Posteriormente, os fragmentos foram imersos em tampão cacodilato 0,05M por 10 min e imersos novamente em tampão cacodilato 0,1M mais solução de tetróxido de ósmio por 1h. A desidratação das amostras foi realizada em soluções de concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%). As amostras foram levadas para secagem em ponto crítico e em seguida montadas em *stubs*,

metalizados com ouro e observadas em microscópio eletrônico de varredura quanto à morfologia das hifas.

2.4. Efeito sobre a produção de massa fresca de micélio

A partir dos resultados obtidos no ensaio de crescimento micelial, no qual foi determinada a concentração inibitória EC_{50} de Phytogard[®], (concentração que controla 50% da população do patógeno), novas concentrações do produto foram definidas para os demais ensaios.

Para avaliação da produção de massa fresca de micélio, foram transferidos cinco discos (5mm) de micélio de *P. nicotianae*, obtido de colônias com sete dias de idade, para erlenmeyers contendo 100 mL de solução de Phytogard[®] em meio líquido cenoura nas concentrações de 0; 0,5; 2 e 5 mL L⁻¹.

O material foi mantido à temperatura de 28° C sob agitação constante à 80 rpm por 6 dias. Ao final do experimento, o micélio do patógeno foi separado do meio líquido por meio de filtração com bomba a vácuo e papel filtro Whatman[®] 40 e as massas (g) mensuradas com auxílio de balança analítica.

2.5. Efeito sobre a produção de zoósporos

Em placas de poliestireno de 90 mm foram depositados 10 discos (5 mm) de micélio de *P. nicotianae*, obtido de colônias com sete dias de idade, juntamente com 20 mL de meio líquido cenoura autoclavado contendo Phytogard[®] nas concentrações finais de 0; 0,5; 2 e 5 mL L⁻¹, onde permaneceram por 72h em câmara tipo BOD a 25° C e luz contínua. Posteriormente, o meio líquido foi retirado das placas com auxílio de pipeta Pasteur descartável e substituído por 10 mL de água destilada estéril contendo as mesmas concentrações de Phytogard[®]. Os discos de micélio permaneceram na solução de água e Phytogard[®] por 48h para estimular a produção de esporângios e zoósporos. Em seguida, a suspensão contendo água, esporângios e zoósporos foi coletada das placas e procedeu-se a observação da formação de esporângios e contagem do número de zoósporos com auxílio de câmara de Neubauer. Foram considerados mortos os zoósporos que não se moviam durante o período da avaliação.

2.6. Perda de eletrólitos

O efeito do Phytogard® sobre a permeabilidade de membrana das células do patógeno foi determinado por meio do extravasamento de eletrólitos, conforme metodologia adaptada de Tarhanen et al. (1999). O micélio do patógeno foi obtido em meio líquido conforme mencionado no item 2.4. Posteriormente, o micélio foi pesado e transferido para copos plásticos (110 mL) contendo 20 mL de solução de sacarose 0,2 M. Decorrido 60 min, as soluções foram transferidas para tubos de ensaio e realizada a leitura da condutividade elétrica das soluções com auxílio de condutivímetro de bancada, com o objetivo de detectar a perda de eletrólitos por parte do micélio.

Para avaliação da perda de eletrólitos ao longo do tempo, após a obtenção do micélio sem adição do Phytogard®, o micélio foi filtrado e transferido para copos plásticos (100 mL), contendo 25 mL de solução de sacarose 0,2 M. Os tratamentos utilizados foram: 1) tratamento sem fosfito de potássio: o micélio do patógeno foi transferido para solução de sacarose 0,2 M; 2) tratamentos com fosfito de potássio: o micélio do patógeno foi transferido para solução de sacarose acrescida de Phytogard® na concentração de 2 mL L⁻¹ (concentração inibitória EC₅₀ obtida no ensaio de crescimento micelial). Decorridos 0, 5, 10, 20, 30 e 60 minutos, as soluções foram transferidas para tubos de ensaio e realizada a leitura da condutividade elétrica das soluções com auxílio de condutivímetro, com o objetivo de detectar a perda de eletrólitos por parte do micélio no decorrer do tempo.

2.7. Peroxidação de lipídios

Para a avaliação de possíveis alterações nos lipídios constituintes da membrana plasmática das células do patógeno, o micélio proveniente do ensaio de produção de massa fresca foi macerado em nitrogênio líquido, com auxílio de cadinho e pistilo e, a avaliação da peroxidação lipídica foi realizada conforme o método proposto por Cakmak & Packer (1968) e Cakmak & Host (1991). Foi quantificada a concentração de malonaldeído, que corresponde ao principal produto da reação entre o ácido tiobarbitúrico e os ácidos graxos poli-insaturados oxidados, o que permite inferir indiretamente sobre a integridade da membrana plasmática.

2.8. Síntese de proteínas

A extração das proteínas solúveis foi efetuada a partir da maceração do micélio na presença de nitrogênio líquido, com auxílio de cadinho e pistilo, seguido pela adição de

tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 1 mM de EDTA, na proporção de 3 mL de tampão para cada 1g de micélio fresco. O material foi centrifugado a 4 °C durante 45 min a 15000 g, sendo o sobrenadante considerado o extrato proteico que foi armazenado a -20° C para verificação da atividade da β -1,3-glucanase.

Utilizou-se o reagente Protein Assay (BioRAD[®]), para a determinação de proteínas totais, de acordo com o método de Bradford (1976). A curva padrão foi determinada utilizando-se albumina de soro bovino (ASB).

2.9. Atividade da β -1,3-glucanase

Utilizou-se o ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS) (Miller, 1959) para quantificação de açúcares redutores. A reação foi preparada com 150 μ L de laminarina (4 mg mL⁻¹) dissolvida em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) e 100 μ L do extrato proteico. Ao branco da reação foi adicionado apenas laminarina e, ainda, para cada amostra avaliada, também foi preparada uma reação controle composta de laminarina, extrato da amostra e reagente ADNS (Abeles e Foence 1970). As amostras foram constituídas do extrato proteico obtido conforme item anterior (2.8).

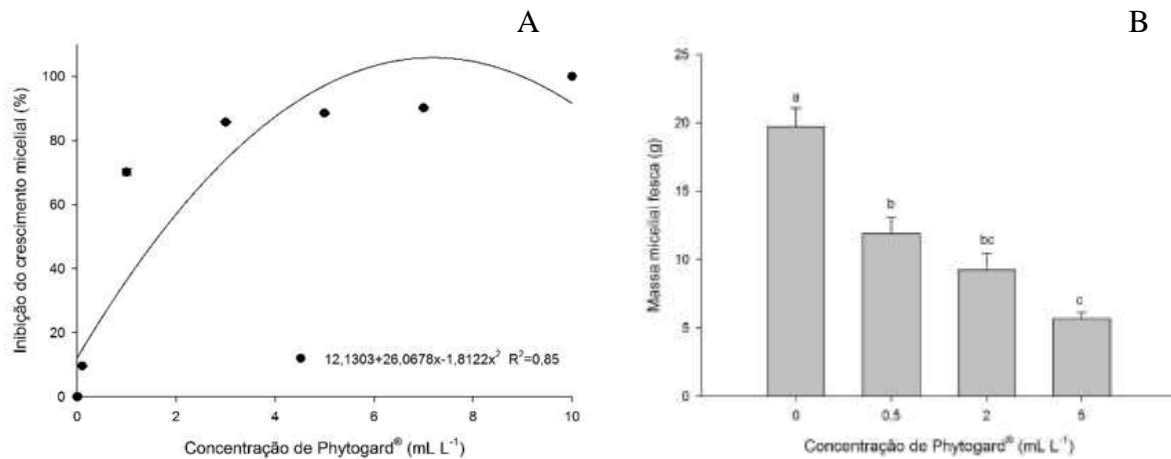
A atividade enzimática foi expressa em mg de glicose liberada h⁻¹ mg proteína⁻¹, com base em curva padrão de glicose. O experimento foi realizado duas vezes.

3. Resultados e Discussão

A investigação dos mecanismos de ação dos fosfitos pode oferecer aos fitopatologistas uma ferramenta para se estudar as interações planta-patógeno e com isso lançar mão de métodos de controle (Guest & Grant, 1991). Ensaios *in vitro* têm demonstrado que os fosfitos causam alterações no crescimento e reprodução de fitopatógenos e a fungitoxicidade pode variar de acordo com a espécie do patógeno e da exposição do microrganismo a estes compostos (Dalio et al., 2012). É possível verificar nos resultados desse trabalho que há ação direta do Phytogard[®] no crescimento micelial e produção de zoósporos por *P. nicotianae*.

Foi possível observar expressiva redução do crescimento micelial de *P. nicotianae* em concentrações crescentes de fosfito de potássio (Figura 1A). O patógeno teve seu crescimento inibido em 50% (EC₅₀) na concentração de Phytogard[®] 1,9 mL L⁻¹. De acordo com Pilbeam et al. (2011), para espécies de *Phytophthora*, os valores de EC₅₀ referentes à inibição de crescimento micelial podem variar de 1,3 a 244 μ g mL⁻¹ de fosfito.

Figura 1. Efeito de diferentes concentrações de Phytogard® (fosfito de potássio: P₂O₅ = 28%; K₂O = 26%) sobre o crescimento micelial de *Phytophthora nicotianae* em meio cenoura sólido (A) e produção de massa fresca de micélio em meio cenoura líquido (B). Colunas seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As barras indicam o erro padrão da média (n=5).

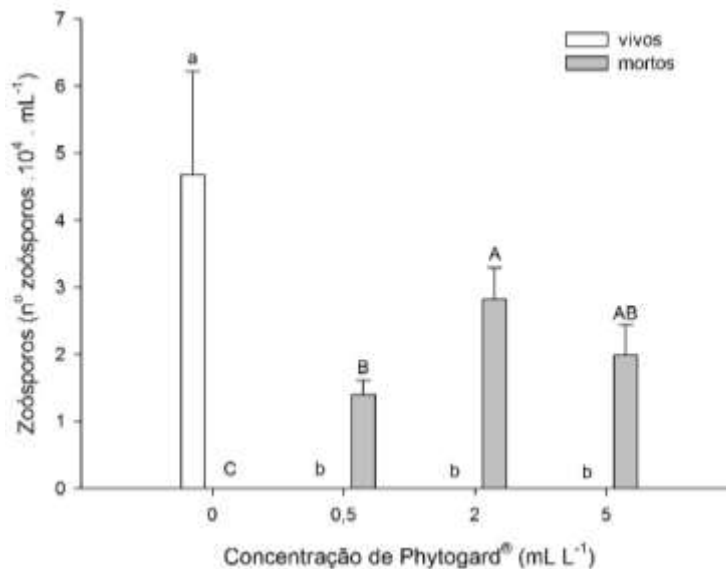


Fonte: Dados originais da pesquisa.

Do mesmo modo, o patógeno teve os valores de massa fresca de micélio reduzida à medida que se aumentou a concentração de Phytogard®, sendo que os valores de todas as concentrações avaliadas diferiram estatisticamente do controle (0 mL L⁻¹) (Figura 1B). *P. nicotianae* teve sua produção de massa fresca cerca de 3,5 vezes menor do que na concentração 5 mL L⁻¹ de Phytogard® quando comparado a concentração 0 mL L⁻¹. Resultados semelhantes foram relatados por King et al. (2010), onde o tratamento *in vitro* de *P. cinnamomi* com fosfito resultou na inibição de 68,6% do crescimento micelial do patógeno.

O fosfito também inibe a reprodução de *Phytophthora* (Pilbeam et al., 2011; Dalio et al., 2014; Coffey & Joseph, 1985). Essa afirmação pôde ser comprovada nesse trabalho pois o Phytogard® também inibiu a produção de zoósporos por *P. nicotianae* em todas as concentrações avaliadas quando comparadas ao controle (0 mL L⁻¹). Nos tratamentos com Phytogard®, os zoósporos encontrados estavam mortos (Figura 2).

Figura 2. Influência de diferentes concentrações de Phytogard® (fosfito de potássio: P₂O₅ = 28%; K₂O = 26%) sobre a produção de zoósporos por *Phytophthora nicotianae*. Colunas seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si quanto ao número de zoósporos vivos e seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si quanto ao número de zoósporos mortos, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As barras indicam o erro padrão da média (n=5).

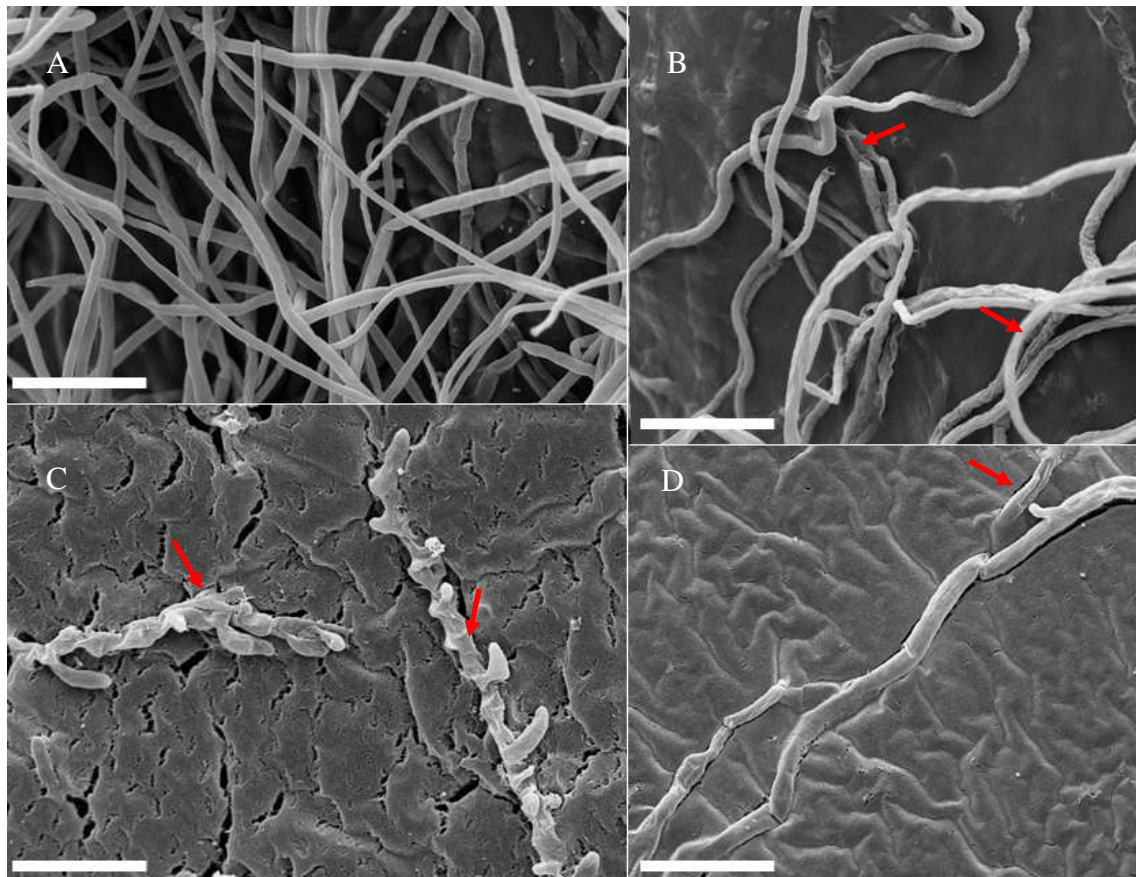


Fonte: Dados originais da pesquisa.

Segundo Guest e Grant (1991), a inibição do crescimento e da esporulação dos patógenos aos fosfitos se deve ao efeito fungistático devido à ação direta desse composto. Estudando o efeito de diferentes sais sobre o crescimento micelial, esporulação e germinação de esporos de diferentes patógenos, Mills, Platt e Hurta (2004) verificaram que o ácido fosfônico reduziu drasticamente o crescimento micelial de *Phytophthora erythroseptica* e *Phytophthora infestans*, e a esporulação e a germinação de *P. infestans*, chegando à conclusão que existem vários outros sais que possuem efeito fungistático, os quais podem ser utilizados para implementação de um manejo integrado e sustentável de doenças de plantas.

Foi possível observar modificações nas hifas de *P. nicotianae* (Figuras 3 B, C e D) quando o patógeno foi cultivado em concentrações crescentes de Phytogard®. Houve alterações na morfologia das hifas sendo essas mais finas e com maiores números de ramificações, as quais são menores e atrofiadas, quando comparadas ao micélio do patógeno cultivado sem o fosfito de potássio (Figura 3A).

Figura 3. Micrografia eletrônica de varredura. Micélio de *Phytophthora nicotianae* cultivado em meio cenoura-ágar nas concentrações de 0 mL L⁻¹ (A), 0,5 mL L⁻¹ (B), 2 mL L⁻¹ (C) e 5 mL L⁻¹ (D) de Phytogard® (fosfito de potássio: P₂O₅ = 28%; K₂O = 26%) após cinco dias. Setas indicam diferenças na morfologia das hifas do micélio tratado ou não com fosfito. Barras = 21,37 μm (A); 18,75 μm (B); 16,65 μm (C) e 37,5 μm (D).



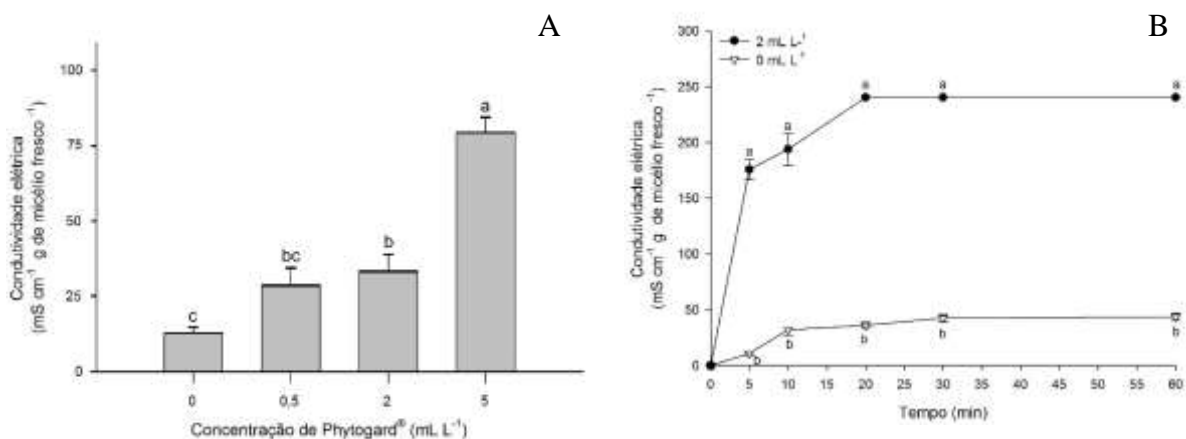
Fonte: Dados originais da pesquisa.

Além da inibição do crescimento micelial, King et al. (2010) observaram efeito adverso na morfologia da hifa do oomiceto relatando distorções e lise das paredes e a produção de ramificações atrofiadas dessas hifas quando comparadas ao micélio crescido em meio sem fosfito. Foram observadas mudanças morfológicas severas no micélio de *Phytophthora cactorum* e *Phytophthora capsici* em função do tratamento com o fungicida Fosetyl-Al. O micélio dos patógenos crescidos em meio de cultivo contendo o fungicida apresentou-se atrofiado e desorganizado, as hifas se mostraram mais grossas e com ramificações anormais quando comparadas ao micélio dos patógenos não tratados com o fungicida (Dercks & Buchenauer, 1987). O crescimento hifal está relacionado à produção de enzimas de síntese e degradação dos componentes da parede celular de oomicetos, como por exemplo, as β -1,3-glucana sintase e β -1,3-glucanase (Alexopoulos, Mims & Blackwell, 1996).

Dessa forma, modificações morfológicas nas hifas do patógeno podem estar relacionadas a possíveis alterações na atividade dessas enzimas responsáveis pela síntese e degradação de constituintes da parede celular.

Houve diferença significativa entre os tratamentos frente à perda de eletrólitos por parte do micélio de *P. nicotianae* quando cultivado em meio acrescido de fosfito de potássio em relação ao controle (0 mL L⁻¹) (Figura 4A). Observou-se, neste ensaio, que a condutividade elétrica média foi de 12, 28, 33 e 79 μS cm⁻¹ g micélio fresco⁻¹, a qual foi obtida junto ao micélio do patógeno cultivado nas concentrações de 0; 0,5; 2 e 5 mL L⁻¹ de Phytogard[®], respectivamente.

Figura 4. Efeito de diferentes concentrações de Phytogard[®] (fosfito de potássio: P₂O₅ = 28%; K₂O = 26%) sobre a perda de eletrólitos por parte do micélio de *Phytophthora nicotianae* cultivado em meio cenoura líquido após 6 dias de incubação e posteriormente imerso por 60 minutos na solução de sacarose (A). Efeito da concentração de 2 mL L⁻¹ de Phytogard[®] sobre a perda de eletrólitos ao longo do tempo por parte do micélio de *P. nicotianae* cultivado em meio cenoura líquido após seis dias de incubação (B). Os dados são expressos em micro-Siemens cm⁻¹ g micélio fresco⁻¹ (mS cm⁻¹ g micélio fresco⁻¹) em função das diferenças na condutividade. Colunas seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As barras indicam o erro padrão da média (n=5).



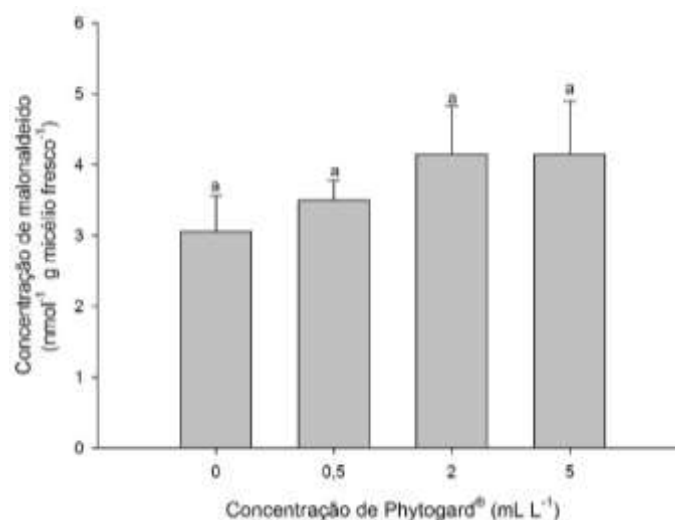
Fonte: Dados originais da pesquisa.

Foi avaliada também a perda de eletrólitos ao longo do tempo por parte do micélio do patógeno na presença de solução de sacarose contendo Phytogard[®] na concentração de 2 mL.L⁻¹ (Figura 4B). Houve diferença estatística entre os tratamentos para os valores de condutividade do micélio de *P. nicotianae* aos 60 minutos. Os valores de condutividade foram aumentando ao longo do tempo, sendo que, o micélio exposto ao fosfito de potássio

apresentou valores superiores ao controle. Não houve variação na condutividade a partir dos 20 e 30 minutos (Figura 4B). Dercks e Buchenauer (1987) observaram que o micélio de diferentes espécies de *Phytophthora* quando exposto ao fungicida à base de fosfito, Fosetyl-Al, aumentou o efluxo de íons à medida que se aumentou a dose e o tempo de exposição ao fungicida. Em *P. megasperma*, houve extravasamento exponencial de íons durante 3 a 6 horas de exposição do micélio ao fosfito a 200ppm. Em *P. infestans*, o tratamento com 100 e 200ppm de fosfito resultou num aumento exponencial do efluxo de íons durante 3 a 6 horas de exposição ao produto, sendo mais expressivo na maior concentração. Melo (2017) também constatou alterações na permeabilidade da membrana plasmática do micélio de *Colletotrichum gloeosporioides* exposto a diferentes concentrações do produto à base de fosfito de potássio Phytogard®. Quanto maior a concentração do produto utilizada e maior o tempo de exposição ao produto, maior foi a perda de eletrólitos pelo micélio do patógeno.

A peroxidação de lipídios foi determinada com o objetivo de avaliar o efeito do fosfito sobre os lipídios constituintes da membrana plasmática de *P. nicotianae*. Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de malonaldeído no micélio do patógeno nas concentrações de Phytogard® utilizadas (Figura 5).

Figura 5. Efeito de diferentes concentrações de Phytogard® (fosfito de potássio: P₂O₅ = 28%; K₂O = 26%) sobre a peroxidação de lipídios em micélio de *Phytophthora nicotianae* cultivado em meio cenoura líquido após seis dias de incubação. Colunas seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As barras indicam o erro padrão da média (n=5).

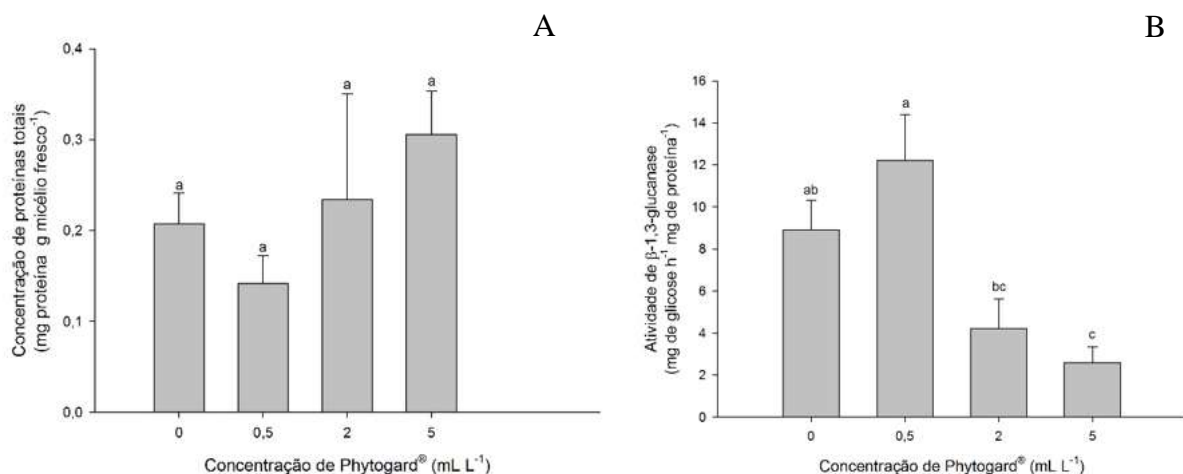


Fonte: Dados originais da pesquisa.

Apesar de não ter ocorrido alteração na estrutura lipídica da membrana plasmática do patógeno, a elevada perda de eletrólitos indica uma alteração funcional desta estrutura. Segundo Ferreira et al. (2007), os fosfitos podem atuar por meio dos poros da membrana celular do patógeno, causando alterações no potencial de membrana e o efluxo do conteúdo celular. Além disso, a atuação do fosfito pode ocorrer em outros constituintes da membrana lipoproteica de oomicetos, como por exemplo, polifosfatos e triagliceróis. Niere, Griffith e Grant (1990) mostraram que fosfonatos reduziram o comprimento de polifosfatos e a quantidade de triagliceróis presentes em *P. palmivora*, mas não observou efeito na quantidade de fosfolipídios presentes. Existem relatos a respeito da ausência do efeito de fosfonados sobre o metabolismo de fosfolipídios em oomicetos em vários trabalhos na literatura (Creamer & Bostock, 1986).

Não foram verificadas diferenças significativas nas concentrações de proteínas totais no micélio do patógeno em resposta as diferentes concentrações de fosfito de potássio (Figura 6A). Entretanto, a síntese de proteínas do micélio cultivado em concentração 5 mL L⁻¹ de Phytogard[®] foi maior quando comparado ao controle.

Figura 6. Efeito de diferentes concentrações de Phytogard[®] (fosfito de potássio: P₂O₅ = 28%; K₂O = 26%) sobre a síntese de proteínas (A) e atividade de β-1,3-glucanase (B) no micélio de *Phytophthora nicotianae* cultivado em meio cenoura líquido após seis dias de incubação. Colunas seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As barras indicam o erro padrão da média (n=5).



Fonte: Dados originais da pesquisa.

Embora não haja diferença significativa nas concentrações de proteínas totais, as maiores concentrações de fosfito de potássio provocaram mudanças morfológicas nas hifas do patógeno, o que poderia gerar aumento na síntese de proteínas em resposta ao dano celular. Entretanto, é possível que o método de detecção do teor de proteínas totais utilizado nesse trabalho não tenha sido eficiente para quantificar a produção de proteínas específicas relacionadas ao crescimento desse oomiceto. King e colaboradores (2010) verificaram que a toxicidade do fosfito às células de *Phytophthora* resultou em diferenças no crescimento e morfologia das hifas, e essas mudanças foram atribuídas às alterações na transcrição de vários genes putativos, como os que codificam proteínas envolvidas na biossíntese dos componentes da parede celular, síntese de aminoácidos, metabolismo de proteínas, formação e tráfico de vesículas, metabolismo energético, desintoxicação e estresse oxidativo.

Observa-se na Figura 6B, decréscimo na atividade de β -1,3-glucanase à medida que as concentrações de Phytogard[®] aumentaram, com exceção para a concentração de 0,5 mL L⁻¹. Para *P. nicotiane*, a concentração de 5 mL L⁻¹ de fosfito de potássio interferiu negativamente na atividade da β -1,3-glucanase que apresentou valores estatisticamente menores quando comparados a concentração de 0 mL L⁻¹.

Uma das principais características dos oomicetos é a presença de parede celular constituída por glucanas (β -1,3 e β -1,6 glucanas) e celulose e não por quitina, polímero de N-acetil glucosamina encontrada na parede celular de fungos verdadeiros (Alexopoulos, Mims & Blackwell, 1996). Em função dessa característica, umas das etapas para se estudar possíveis mecanismos de ação do Phytogard[®] procurou descobrir se há interferência desse produto na degradação das β -1,3-glucanas. Houve redução da atividade da enzima β -1,3-glucanase à medida que se aumentou as concentrações de fosfito de potássio no meio de cultivo para o crescimento de *P. nicotianae*. Em função desses resultados, podemos inferir que quanto maior a concentração de fosfito, provavelmente menor é a produção de β -1,3-glucanas produzidas pelo micélio do patógeno, indicando que o Phytogard[®] pode estar associado à inibição da produção desse componente de parede. Por consequência, essa inibição afeta a estrutura da parede celular, em concordância com as alterações observadas na morfologia da hifa do micélio de *P. nicotianae* exposto ao fosfito (redução de espessura e ramificações atrofiadas). Resultados semelhantes foram relatados por Roma (2013) que estudou possíveis mecanismos de ação do Phytogard[®] sobre *Rhizopus stolonifer*. Quanto maior a dose do produto, menor era a atividade da β -1,3-glucanase. Melo (2017) também obteve resultado semelhante, com redução da atividade da enzima β -1,3-glucanase pelo micélio de *C. gloeosporioides*, a partir da utilização do Phytogard[®].

Embora não seja um fungo verdadeiro, o *P. nicotianae* também possui β -1,3-glucanas como componente da parede celular de suas hifas. Dessa forma, em decorrência das alterações geradas por agentes perturbadores da parede celular, há a indução da produção de enzimas relacionadas à síntese de parede, de forma a compensar o dano ocorrido na busca da manutenção da integridade da mesma (Adams, 2004; Lenardon, Munro & Gow, 2010). Isto ocorre em microrganismos que tratados com um ingrediente ativo da classe das equinocandinas, o qual é utilizado com antifúngico para tratamento em humanos (Lenardon, Munro & Gow, 2010).

A redução do crescimento micelial, as alterações morfológicas observadas nas hifas, a maior perda de eletrólitos e o efeito negativo na síntese de parede proporcionado pelo fosfito sobre o patógeno *P. nicotianae* cultivado na presença do produto, podem ser correlacionados a atuação do fosfito em alvos como a membrana e a parede celular. Entretanto, este estudo se limitou a investigar a ação do Phytogard® sobre o desenvolvimento *in vitro* de *P. nicotianae* em nível bioquímico. Portanto, outros ensaios devem ser conduzidos para maior compreensão da atuação deste ingrediente ativo (Roma, 2013), tais como, ensaios moleculares, para investigar de maneira detalhada o metabolismo do patógeno e possíveis alterações em nível de proteínas, RNA e /ou DNA de *P. nicotianae* induzidas pelo fosfito. Estudos com *Phytophthora citrophthora* demonstraram que uma concentração capaz de inibir apenas 20% do crescimento micelial gerou alterações na síntese de DNA (Barchietto, Saindrenan & Bompeix, 1992).

4. Conclusão

Conclui-se que o produto a base de fosfito de potássio, denominado Phytogard®, em todas as concentrações testadas, inibe o crescimento micelial, a produção de massa fresca de micélio e a produção de zoósporos de *P. nicotianae*. Além disso, o produto diminui a espessura das hifas e aumenta o número de ramificações atrofiadas, além de prejudicar a permeabilidade da membrana plasmática do patógeno. Nas concentrações de 2 e 5 mL L⁻¹, o Phytogard® compromete a síntese de parede celular de *P. nicotianae* por queda na atividade da enzima β -1,3-glucanase.

Os resultados desse trabalho poderão direcionar estudos de aplicação do fosfito de potássio em campo, de maneira a colaborar para o uso seguro deste produto no controle da gomose em citros e ampliar os recursos disponíveis ao produtor para execução do manejo integrado dessa enfermidade.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Stoller do Brasil pela disponibilização do produto para os ensaios, à Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios/ Instituto Agronômico de Campinas pelo isolado de *Phytophthora nicotianae* cedido para o experimento e ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Agricultura da Esalq/USP pelo apoio e utilização do microscópio eletrônico de varredura. Agradecem também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos e ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais (IFSULDEMINAS) pelo apoio à publicação deste trabalho.

Referências

- Abeles, F. B., & Foence, L. E. (1970). Temporal and hormonal control of β -1,3-glucanase in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology*, 45, 305-400.
- Adams, D. J. (2004). Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*, 150, 2029-2035.
- Alexopoulos, C. J., Mims C. W., & Blackwell, M. (1996). *Introductory mycology*. (4th ed.), New York: John Wiley.
- Barchietto, T., Saindrenan, P., & Bompeix, G. (1992). Physiological responses of *Phytophthora citrophthora* to a sub-inhibitory concentration of phosphonate. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 42, 151-166.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-257.
- Cakmak, I., & Horst, W. J. (1991). Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean. *Physiology Plantarum*, 83, 463-468.

Coffey, M. D., & Joseph, M. C. (1985). Effects of phosphorus-acid and fosetyl-Al on the life-cycle of *Phytophthora cinnamomi* and *Phytophthora citricola*. *Phytopathology*, 75, 1042–1046.

Creamer, J. R., & Bostock, R. (1986). Characterisation of biological activity of phospholipids from *Phytophthora infestans* in the hypersensitive response of potato tuber. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 28, 215-225.

Dalio, R. J. D., Ribeiro Junior, P. M., Resende, M. L. V., Silva, A. C., Blumer, S., Pereira, V. F., Osswald, W., & Pascholati, S. F. (2012). O triplo modo de ação dos fosfitos em plantas. In: Luz WC (Org.). *Revisão Anual de Patologia de Plantas – RAPP*, 20 (pp. 206-242). Passo Fundo: Gráfica e Editora Padre Berthier dos Missionários da Sagrada Família.

Dalio, R. J. D., Fleischmann, F., Humez, M., & Wolfgang, O. (2014). Phosphite protects *Fagus sylvatica* seedlings towards *Phytophthora plurivora* via local toxicity, priming and facilitation of pathogen recognition. *Plos One*, 9 (1).

Dercks, W., & Buchenauer, H. (1987). Comparative studies on the mode of action of aluminium ethyl phosphite in four *Phytophthora* species. *Crop Protection*, 6, 82-89.

Eshraghi, L., Anderson, J., Aryamanesh, N., Shearer, B., McComb, J., Hardy, G. E. S., & O'Brien, P. A. (2011). Phosphite primed defence responses and enhanced expression of defence genes in *Arabidopsis thaliana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology*, 60, 1086-1095.

European Commission. Health & Consumers Directorate-General (2013). *Review report for the active substance potassium phosphonates*. SANCO/10416/2013 rev 2, 15 March. Recuperado de <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.ViewReview&id=689>.

Feichtenberger, E., Bassanezi, R. B., Spósito, M. B., & Belasque Júnior, J. (2005). Doenças dos Citros. In: Kimati, H., Amorim, L., Rezende, J. A. M., Bergamin Filho, A., & Camargo, L. E. A. (Ed). *Manual de Fitopatologia* (pp. 239-269). São Paulo: Editora Agronômica Ceres.

Ferreira, R. B., Monteiro, S., Freitas, R., Santos, C. N., Chen, Z., Batista, L. M., Duarte, J., Borges, A., & Teixeira, A.R. (2007). The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. *Molecular Plant Pathology*, 8:5, 677-700.

Frac, Fungicide resistance action committee (2020). *Fungal control agents sorted by cross resistance pattern and mode of action*. Obtido em https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2020-finalb16c2b2c512362eb9a1eff00004acf5d.pdf?sfvrsn=54f499a_2.

Guest, D., & Grant, B. R. (1991). The complex action of phosphonates as antifungal agents. *Biological Review*, 66, 159-187.

Graham, J. H., & Timmer, L. W. (1994). *Phytophthora diseases of Citrus*. Soil and Science Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. SL 127. Obtido em <https://ufdc.ufl.edu/IR00004644/00001>.

Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry Biophysics*, 25, 189-198.

Ibge, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2020). *Levantamento Sistemático da Produção Agrícola*. Obtido em <https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>.

Jackson, T. J., Burgess, T., Colquhoun, I., Hardy, G. E. S., & Jackson, T. J. (2000). Action of the fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology*, 49, 147-154.

King, M., Reeve, W., Van der Hoek, M. B., Williams, N., McComb, J., O'Brien, P. A., & Hardy, G. E. S. J. (2010). Defining the phosphite-regulated transcriptome of the plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Genetics & Genomics*, 284, 425-435.

Lenardon, M., Munro, C. A., & Gow, N. A. R. (2010). Chitin synthesis and fungal pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, 13, 416-423.

Melo, T. A. (2017). *Efeito do extrato da alga marinha Ascophyllum nodosum e do fosfite de potássio na morfofisiologia do fungo Colletotrichum gloeosporioides, na indução de resistência em mangas 'Tommy Atkins' contra a antracnose e em características físicas e químicas desses frutos*. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP.

Miller, G. H. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-429.

Mills, A. A. S, Platt, H. W., & Hurta, R. A. R. (2004). Effect of salt compounds on mycelia growth, sporulation and spore germination of various potato pathogens. *Postharvest Biology and Technology*, 34, 341-350.

Neves, M. F., Trombin, V. G., Milan, P., Lopes, F. F., Cressoni, F., & Kalaki, R. (2010). *O retrato da citricultura brasileira*. São Paulo: CitrusBR.

Niere, J. O., Griffith, J. M., & Grant, B. R. (1990). P-31NMR studies on the effect of phosphite on *Phytophthora palmivora*. *Journal of General Microbiology*, 136, 147-156.

Pilbeam, R. A., Howard, K., Shearer, B. L. & Hardy, G. E. S. J. (2011). Phosphite stimulated histological responses of *Eucalyptus marginata* to infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Trees-Structure and Function*, 25, 1121-1131.

Roma, R. C. C. (2013). *Fosfite de potássio no controle de doenças pós-colheita em bagas de uva 'Itália' e possíveis mecanismos de ação à Rhizopus stolonifer*. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP.

Russell, P. E. (2002). *Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management*. Cambridge UK: FRAC.

Tarhanen, S., Metsarinne, S., Holopainen, T., & Oksanen, J. (1999). Membrane permeability response of lichen *Bryoria fuscescens* to wet deposited heavy metals and acid rain. *Environmental Pollution*, 104:1, 121-129.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Dalilla Carvalho Rezende – 22%

Dayson Fernando Ribeiro Brandão – 18%

Simone Cristiane Brand – 16%

Silvia Blumer – 16%

Sérgio Florentino Pascholati – 18%

Natália Moreira Mafra – 10%