

Fosfito de potássio e suas implicações no controle de *Phytophthora plurivora* em faia
Potassium phosphite and its implications for the control of *Phytophthora plurivora* in
beech

Fosfito de potasio y sus implicaciones en el control de *Phytophthora plurivora* en haya

Recebido: 26/09/2020 | Revisado: 02/10/2020 | Aceito: 07/10/2020 | Publicado: 08/10/2020

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

A faia (*Fagus sylvatica*) é uma das principais espécies das florestas na Europa e um dos principais entraves no cultivo dessa espécie é a ocorrência de doença causada por *Phytophthora plurivora*. Trabalhos apontam os fosfitos como boa alternativa para o controle de doenças causadas por oomicetos, entretanto, os mecanismos de ação ainda estão sendo estudados. O objetivo do trabalho foi avaliar o produto comercial à base de fosfito de potássio, Phytogard® no controle da doença causada por *P. plurivora* em faia, bem como avaliar os possíveis modos de ação do produto no patógeno. Foram utilizadas mudas de faia aspergidas com diferentes concentrações de Phytogard® e, posteriormente, inoculadas com o patógeno. Foram avaliados a incidência da doença, o consumo de água e a quantidade de DNA do patógeno nos tecidos das raízes do hospedeiro. Nos experimentos *in vitro*, foi determinado o crescimento micelial, produção de massa fresca de micélio e de zoósporos expostos ao Phytogard®. Avaliou-se também a perda de eletrólitos, peroxidação de lipídios e a atividade da enzima β -1,3-glucanase do micélio. A morfologia das hifas tratadas ou não com o Phytogard® foram observadas em microscópio eletrônico de varredura. O Phytogard®, em todas as concentrações aplicadas controla de maneira preventiva a doença causada por *P. plurivora* e também inibe o crescimento micelial e a produção de zoósporos. Além disso, modifica a morfologia das hifas, atua na permeabilidade de membrana e na síntese de parede celular do micélio do patógeno.

Palavras-chave: Controle alternativo; Fitopatologia; Espécie florestal.

Abstract

Beech (*Fagus sylvatica*) is one of the main forest species in Europe and one of the main problems in the cultivation of these species is the occurrence of disease caused by *Phytophthora plurivora*. Studies in the literature shows phosphites as a good alternative for the control of diseases caused by oomycetes. However, the mode of action is still being studied. This work aimed to evaluate the commercial product based on potassium phosphite Phytogard® on the control of disease caused by *P. plurivora* in beech plants and to understand the possible mode of action of the product on this pathogen. Beech plants were sprayed with different concentrations of Phytogard® and then inoculated with the pathogen. We evaluated the diseases incidence, water uptake and the amount of pathogens DNA in the host roots. In *in vitro* experiments, mycelial growth, production of fresh mycelium and zoospores by this pathogen were determined. We also evaluated the electrolyte leakage, lipid peroxidation and the β -1,3-glucanase activity in the mycelium. It was also evaluated the hyphae morphology

from mycelium treated or not with Phytogard[®] by using scanning electron microscopy. The results showed that in all concentrations of Phytogard[®] preventively controls diseases caused by *P. plurivora* in beech plants. The Phytogard[®] inhibited mycelial growth and zoospore production by *P. plurivora*. Furthermore, the product modified the hyphae morphology, changed membrane permeability and mycelium cell wall synthesis in the pathogens.

Keywords: Alternative control; Phytopathology; Forest specie.

Resumen

El haya (*Fagus sylvatica*) es una de las principales especies forestales de Europa y uno de los principales obstáculos para su cultivo es la aparición de enfermedades causadas por *Phytophthora plurivora*. Los estudios señalan a los fosfitos como una buena alternativa para el control de las enfermedades causadas por los oomicetos, sin embargo, los mecanismos de acción todavía se están estudiando. El objetivo del estudio fue evaluar el producto comercial basado en el fosfito de potasio, Phytogard[®] en el control de la enfermedad causada por *P. plurivora* en la haya, así como evaluar los posibles modos de acción del producto en el patógeno. Se utilizaron plántulas de haya rociadas con diferentes concentraciones de Phytogard[®] y posteriormente se inoculó el patógeno. Se evaluó la incidencia de la enfermedad, el consumo de agua y la cantidad de ADN del patógeno en los tejidos de la raíz del huésped. En los experimentos in vitro se determinó el crecimiento del micelio, la producción de la masa fresca del micelio y las zoosporas expuestas a Phytogard[®]. También se evaluaron la pérdida de electrolitos, la peroxidación de lípidos y la actividad de la enzima β -1,3-glucanasa en el micelio. La morfología de las hifas tratadas o no con Phytogard[®] se observó en un microscopio electrónico de barrido. Phytogard[®], en todas las concentraciones aplicadas, controla la enfermedad causada por *P. plurivora* de manera preventiva y también inhibe el crecimiento de los micelios y la producción de zoosporas. Además, modifica la morfología de las hifas, actúa sobre la permeabilidad de la membrana y la síntesis de la pared celular del micelio del patógeno.

Palabras clave: Control alternativo; Fitopatología; Especies forestales.

1. Introdução

A faia (*Fagus sylvatica*) é uma importante espécie arbórea e devido a sua alta tolerância a diferentes condições climáticas é considerada uma das principais espécies ocorrendo nas florestas da Europa (Packham et al., 2012). Essa espécie vegetal é

frequentemente usada como árvore ornamental em parques e possui alto valor econômico devido à produção de madeira (Schlink, 2010). No entanto, entre os diferentes fatores prejudiciais ao desenvolvimento da faia, patógenos do gênero *Phytophthora* estão associadas à morte dessas árvores na Europa (Brasier, 2009; Jung et al., 2005; Weiland, Nelson & Hudler, 2010).

O desenvolvimento de doenças em plantas ocorre devido ao desequilíbrio na interação patógeno, hospedeiro e meio ambiente. Os patógenos são organismos que incitam ou causam os processos de doenças no hospedeiro, devido as interferências causadas nas funções fisiológicas internas da planta (Leite et al., 2020). Nesse contexto, o controle de patógenos veiculados pelo solo, como é o caso de *P. plurivora*, é uma tarefa difícil, pois o solo é um ambiente complexo, onde medidas de controle da doença têm sua eficiência bastante prejudicada ou sua aplicação dificultada (Bedendo, 2011).

Muitos trabalhos apontam os fosfitos como uma das alternativas potenciais para o controle de diversas doenças, principalmente para aquelas causadas por oomicetos. Esses produtos são constituídos de sais inorgânicos originados do ácido fosforoso (H_3PO_3), sendo utilizados como alternativa aos fosfatos na fertilização do solo (Dalio et al., 2012). O fósforo (P) é um elemento essencial ao funcionamento da célula vegetal, pois é componente de ácidos nucléicos, enzimas, além de mediar importantes processos metabólicos na produção de energia. Muitos produtos comerciais possuem o fosfito como fonte de fósforo, entretanto, apesar de serem absorvidos pelas folhas e raízes, os fosfitos não são oxidados ou metabolizados pelas plantas (Guest & Grant, 1991; Carswell et al., 1996) e por isso são inúteis como fonte de P (Carswell et al., 1996; Schroetter et al., 2006). A grande vantagem da utilização dos fosfitos refere-se a sua capacidade de ação fungicida na planta sem apresentar fitotoxidez (Cohen & Coffey, 1986). Os fosfitos e produtos derivados do ácido fosforoso são classificados pelo Comitê de Ação a Resistência à Fungicidas (FRAC) como indutores de defesa da planta hospedeira (Frac, 2019).

Ainda é um desafio proteger as plantas contra patógenos, como espécies de *Phytophthora* (Dalio et al., 2014). Dessa forma, trata-se de um grande avanço o tratamento de plantas, principalmente em condições de viveiro, contra diferentes patógenos, através do uso de produtos menos tóxicos ao ambiente, como é o caso dos fosfitos.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do Phytogard[®], fosfito de potássio disponível comercialmente, no controle preventivo contra *P. plurivora* em plantas de faia. Além disso, avaliar o efeito direto desse produto sobre o desenvolvimento de *P. plurivora* e verificar os possíveis mecanismos de ação desse produto sobre esse patógeno.

2. Metodologia

Os experimentos foram conduzidos na Seção de Fitopatologia de Plantas Lenhosas no Departamento de Ecologia da Universidade Técnica de Munique (TUM) em Freising, Alemanha.

A fonte de fosfito de potássio utilizada nesse trabalho foi um produto comercial, denominado Phytogard® que possui 28% de P₂O₅, cuja fonte é o ácido fosforoso e 26% de K₂O, com densidade de 1,51 g L⁻¹, sendo que o pH do produto é 7.

2.1. Ensaios *in vivo*

As sementes de faia, foram obtidas na Seção de Fitopatologia de Plantas Lenhosas no Departamento de Ecologia da TUM e a semeadura foi realizada em bandejas contendo vermiculita e mantidas em geladeira à 4°C por 30 dias. Posteriormente, as plântulas foram transferidas para bandejas plásticas maiores contendo o mesmo substrato, onde se desenvolveram em sala climatizada à 25 °C por 3 meses.

Para determinação do consumo de água em plântulas de faia, obtidas como descrito acima, as mesmas foram transferidas para tubos plásticos (50 mL). O fosfito de potássio foi aplicado via aspersão foliar nas concentrações de 0 e 2 mL L⁻¹. Decorridos seis dias da aplicação do produto, as plantas foram inoculadas com suspensão de *P. plurivora* na concentração de 1x10⁶ zoósporos mL⁻¹ via raiz. Os tubos foram novamente vedados com filme plástico e mantidos em sala climatizada à 25 °C.

O ensaio foi instalado em delineamento inteiramente casualizado constituído por quatro tratamentos, sendo eles: concentração do produto (0 e 2 mL L⁻¹) e plantas (inoculadas e não inoculadas com o patógeno) com dez repetições, sendo cada repetição representada por um tubo contendo uma planta. Ao final do experimento foi avaliada a incidência da doença. Posteriormente, o material vegetal foi coletado e utilizado para a realização das análises moleculares.

Para quantificação do patógenos nas raízes do hospedeiro, o DNA total foi obtido a partir da extração de amostras de raízes de faia utilizando-se DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen), conforme as recomendações do fabricante. Para a purificação do extrato de DNA utilizou-se o kit “Wizard DNA clean up System” da Promega que também foram seguidas de acordo as recomendações do fabricante.

Para realização do qPCR foram utilizados o master-mix universal para PCR, o qual contém tampão 10X, cloreto de magnésio (25 mM), dNTP-mix (10mM) e Taq polimerase (5U/ μ L).

As reações foram realizadas em placas com 96 cavidades onde foram depositados 12,5 μ L do máster-mix universal, 0,5 μ L do fluoróforo, 0,75 μ L de cada um dos iniciadores, 5,5 μ L de água e 5 μ L do DNA da amostra, a qual foi diluída em 10 vezes. Para realização da curva padrão, uma amostra de DNA de *P. plurivora* foi diluída de forma seriada nas seguintes proporções: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:1000000 (v/v).

As condições de PCR empregadas foram 15 minutos à 95 °C para uma desnaturação inicial, seguido por 40 ciclos de 15 segundos à 95 °C, 1 minuto à 62 °C e 5 minutos à 72 °C.

2.2. Ensaios *in vitro*

Para determinação do crescimento micelial, foram utilizadas placas de poliestireno contendo meio V8-ágar. O meio foi obtido a partir de suco caldo de vegetais V8 autoclavado, no qual foi adicionado o volume necessário para a obtenção das concentrações 0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 2 mL L⁻¹ de fosfito de potássio. Como controle, foram utilizadas placas contendo apenas o meio de cultivo. Foi depositado no centro de cada placa um disco de meio contendo o patógeno. As placas foram incubadas à 25°C no escuro e a avaliação consistiu de 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 CE₅₀, a qual representa a concentração efetiva do produto Phytogard® capaz de inibir em 50% o crescimento micelial do patógeno (Russel, 2002).

Para observação das amostras em microscópio eletrônico de varredura (MEV), foram retirados fragmentos (5x5 mm) do meio de cultivo dos bordos das colônias contendo o patógeno para o processamento de todos tratamentos mencionados no ensaio anterior. Os fragmentos foram submersos em solução contendo glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,0%, tampão fosfato 0,05M, pH 7, por 12 horas. Posteriormente, os fragmentos foram imersos em tampão cacodilato 0,05M por 10 minutos e imersos novamente em tampão cacodilato 0,1M mais solução de tetróxido de ósmio por 1 hora. A desidratação das amostras foi realizada em soluções de concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) (Karnovsky, 1965). As amostras foram levadas para secagem em ponto crítico e em seguida

montados em *stubs*, metalizados com ouro e observados em microscópio eletrônico de varredura.

Para determinação da massa fresca de micélio, foram transferidos cinco discos de micélio de *P. plurivora* para erlenmeyers contendo 100 mL de meio líquido V8 onde foram pipetados volumes para a obtenção das concentrações de 0; 0,5; 1 e 2 mL L⁻¹ de fosfito de potássio. 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 e as massas (g) mensuradas com auxílio de balança analítica.

Para verificar o efeito sobre a produção de zoósporos, em placas de poliestireno foram depositados 10 discos de micélio de *P. plurivora*, juntamente com 20 mL de meio líquido V8 autoclavado contendo o produto nas concentrações finais de 0; 0,5; 1 e 2 mL L⁻¹, onde permaneceram por 72 horas em câmara tipo BOD a 25° C e luz contínua. Posteriormente, o meio foi substituído por 10 mL de água estéril contendo as mesmas concentrações do fosfito de potássio, onde permaneceram por mais 48 horas. Em seguida, a água 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.

Para determinação da perda de eletrólitos, o micélio do patógeno foi obtido em meio líquido conforme mencionado anteriormente. Posteriormente, o micélio foi pesado e transferido para copos plásticos (110 mL) contendo 20 mL de solução de sacarose 0,2 M. Decorrido 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. Para avaliação da perda de eletrólitos ao longo do tempo, após a obtenção do micélio sem adição do produto, o mesmo 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 controle: o micélio do patógeno foi transferido para solução de sacarose 0,2 M e submetido à maceração com auxílio de bastão de vidro, levando a ruptura física da membrana do mesmo, alterando sua permeabilidade; 2) tratamento com fosfito de potássio 0 mL L⁻¹: o micélio do patógeno foi transferido para solução de sacarose 0,2 M; 3) tratamento com fosfito de potássio: o micélio do patógeno foi transferido para solução de sacarose acrescida de fosfito de potássio na concentração de 2 mL L⁻¹. 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.

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 e a avaliação da peroxidação lipídica de acordo com Heath & Packer (1968) e Cakmak & Host (1991).

A extração das proteínas solúveis foi efetuada a partir da maceração do micélio na presença de nitrogênio líquido, seguido pela adição de tampão fosfato de potássio 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 minutos a 15000 g, sendo o sobrenadante considerado o extrato proteico. 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).

Para mensurar a atividade da β -1,3-glucanase, utilizou-se o ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS) para quantificação de açúcares redutores. A reação foi preparada com 150 μ L de laminarina dissolvida em tampão acetato de sódio 100 mM e 100 μ L do extrato proteico conforme Abeles & Foence (1970). Ao branco da reação foi adicionado apenas laminarina. As amostras foram constituídas do extrato proteico obtido conforme mencionado anteriormente. A atividade enzimática foi expressa em mg de glicose liberada $\text{h}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$, com base em curva padrão de glicose.

3. Resultados e Discussão

A incidência da doença foi reduzida em 100% em mudas de faia pulverizadas com o produto à base de fosfito de potássio na concentração de 2 mL L^{-1} (Tabela 1).

Tabela 1. Incidência da doença (*Phytophthora plurivora*) em plântulas de faia (*Fagus sylvatica*) tratadas com Phytogard® (fosfito de potássio: $\text{P}_2\text{O}_5 = 28\%$; $\text{K}_2\text{O} = 26\%$) nas concentrações de 0 e 2 mL L^{-1} para avaliação do efeito protetor do produto. A inoculação com o patógeno foi realizada seis dias após a aspersão do produto e avaliação ocorreu aos treze dias após a inoculação. Cada tratamento consistiu de dez repetições.

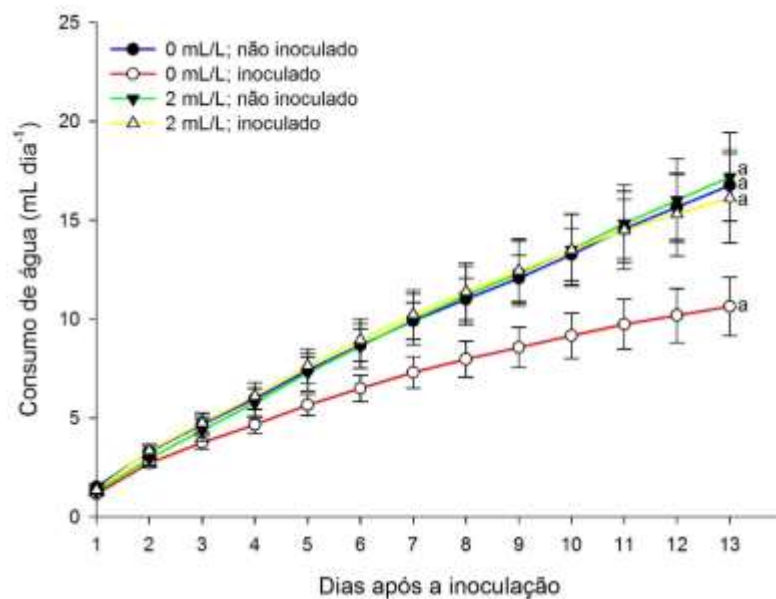
Concentração de Phytogard® (mL L^{-1})	Incidência (%)	
	Inoculadas	Não inoculadas
0	30	0
2	0	0

Fonte: Dados originais da pesquisa.

Dalio et al., (2014), verificaram que mudas de faia tratadas com concentração final de 0,5% de fosfito de potássio (Sigma-Aldrich) e inoculadas com *P. plurivora* não morreram e nem mostraram sintomas da doença durante todo o ensaio. Aplicações foliares de fosfito nas concentrações de 2,5; 5 e 10 g L⁻¹ foram realizadas em espécies florestais do gênero *Banksia*, sendo essas plantas submetidas a inoculações natural e artificial com *Phytophthora cinnamomi*. Todas as concentrações de fosfito reduziram a mortalidade das árvores. A porcentagem de sobrevivência das espécies arbóreas *Banksia baxteri* e *Lamberia inermis*, após a aplicação de fosfito, aumentou em 68% e 78% quando comparadas a 31% e 54% em plantas não tratadas com fosfito, respectivamente. Por sua vez, o fosfito aplicado na concentração de 6 g L⁻¹ em *Xanthorrhoea australis* preveniu a morte de árvores em vegetação infestada com *P. cinnamomi* (Shearer & Fairman, 2007). Em ecossistemas naturais no oeste da Austrália, o fosfito é utilizado com frequência para reduzir o impacto e a disseminação de *P. cinnamomi* (Hardy, Barret & Shearer, 2001).

Patógenos, como *Phytophthora* spp., podem causar extensa destruição do sistema radicular do hospedeiro mesmo antes dos sintomas tornarem-se visíveis na parte aérea (Agrios, 2005). A injúria causada por esses patógenos afeta diretamente os pêlos radiculares, comprometendo a quantidade de água absorvida e, por consequência, o balanço hídrico e o uso eficiente da água (Stangarlin & Leite, 2008). Observando os resultados de consumo de água de plântulas de faia inoculadas com *Phytophthora plurivora* podemos constatar a injúria causada pelo patógeno no hospedeiro, que apresentou menores taxas de absorção de água quando comparadas as não inoculadas (Figura 1). É interessante observar que plantas inoculadas e aspergidas com fosfito de potássio apresentaram valores de absorção de água semelhantes às plantas não inoculadas com o patógeno. Esses resultados são consequência da capacidade do produto em reduzir os danos causados pelo patógeno nos tecidos do hospedeiro de modo com que o metabolismo da planta não fosse prejudicado, garantindo dessa forma a manutenção do uso eficiente da água.

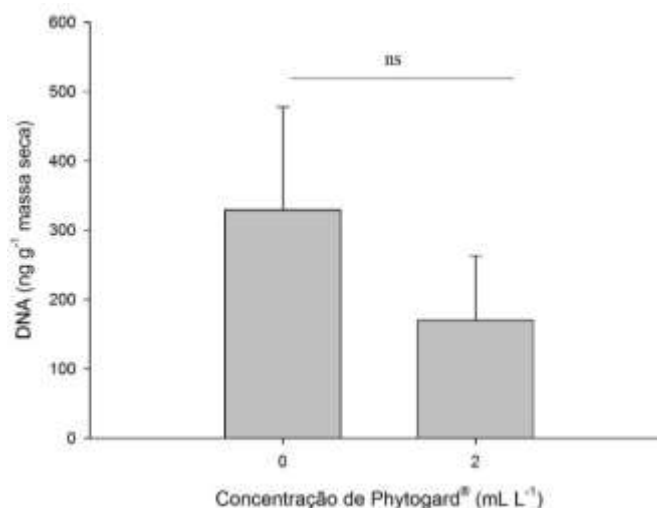
Figura 1. Consumo de água de plântulas de faia tratadas com Phytogard® (fosfito de potássio: $P_2O_5 = 28\%$; $K_2O = 26\%$) nas concentrações 0 e 2 mL^{-1} e inoculadas ou não com *Phytophthora plurivora* para avaliação do efeito protetor do produto. A inoculação com o patógeno foi realizada seis dias após a aspersão do produto. Linhas seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade na última avaliação. As barras indicam o erro padrão da média (n=10).



Fonte: Dados originais da pesquisa.

Foi realizada também a quantificação do patógeno *P. plurivora* nos tecidos de raízes de faia inoculados e tratados ou não com Phytogard® e observando a Figura 2 é possível notar que as raízes das plantas tratadas com o produto apresentaram menores quantidades do patógeno em seus tecidos, com uma redução variando no mínimo em 50%.

Figura 2. Concentração de *Phytophthora plurivora* em raízes de faia (*Fagus sylvatica*) tratadas com Phytogard® (fosfito de potássio: P₂O₅ = 28%; K₂O = 26%) nas concentrações de 0 e 2 mL L⁻¹ e inoculadas com o patógeno. A análise estatística foi realizada por meio de Teste T à 5 % de probabilidade e distingue apenas os tratamentos em que houve a inoculação do patógeno. As barras indicam o erro padrão da média (n=10).

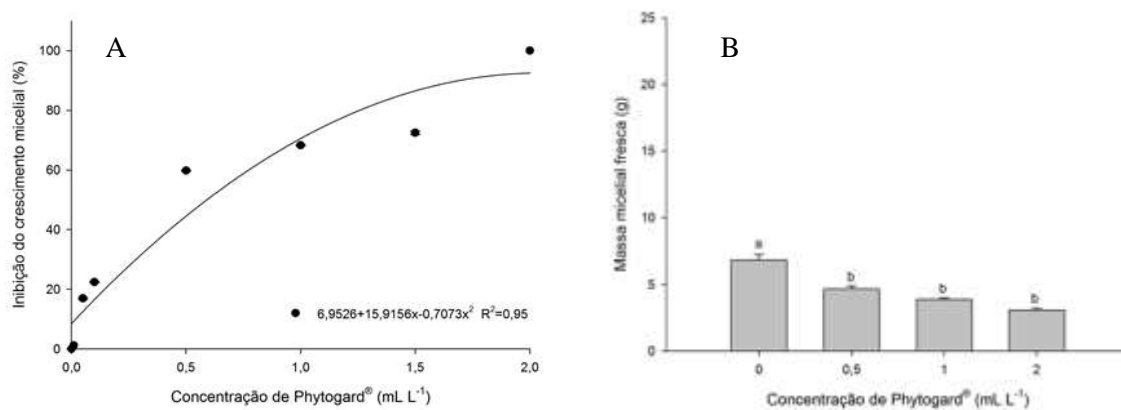


Fonte: Dados originais da pesquisa.

Como pode ser notado nesse trabalho, a aplicação foliar preventiva de fosfito de potássio controlou a doença por meio da redução da quantidade de patógeno que infecta e coloniza raízes. Esse dado nos faz refletir a respeito da mobilidade do fosfito, caso esse tenha atuado diretamente no desenvolvimento do patógeno (Wilkinson et al., 2001; Dalio et al., 2014). Diferente da maioria dos fungicidas sistêmicos, o fosfito possui a capacidade de ser translocado via xilema e floema (Lüttringer & De Cormis, 1985; Guest & Grant, 1991). Orbovic et al. (2008) detectou a presença de fosfito em folhas e raízes de citros dez dias após a aplicação do mesmo via foliar e solo. Esses autores relataram que o fosfito nas condições experimentais utilizadas, translocou via xilema com maior eficiência do que via floema. Dalio et al. (2014), após pulverizar fosfito de potássio em folhas de faia, verificou quantidades dez vezes maiores desse composto nas raízes do que as necessárias para inibir em 50% o crescimento *in vitro* de *P. plurivora*. Essa alta concentração de fosfito foi encontrada nas raízes aos seis dias após a aplicação na parte aérea das plantas e também ao final do experimento. A importância das relações fonte-dreno e a translocação de fosfatos para contribuir com o controle de doenças, principalmente em culturas perenes, se torna visível. Com a utilização desses produtos, tornou-se possível a aplicação foliar como tratamento preventivo para doenças radiculares (Guest & Grant, 1991).

Com a finalidade de estudar os possíveis efeitos diretos do fosfito de potássio sobre *P. plurivora*, foram realizados alguns ensaios *in vitro*. Como pode ser observado na Figura 3, tanto o crescimento micelial quanto a produção de massa fresca de micélio do patógeno foram reduzidos à medida que se aumentou a concentração de Phytogard[®] aplicado. *P. plurivora* teve seu crescimento micelial inibido em 50% (EC₅₀) na concentração de Phytogard[®] de 0,6 mL L⁻¹ enquanto que os valores de massa fresca na concentração de 2 mL L⁻¹ de Phytogard[®] inibiu cerca de 2,8 vezes comparada ao controle.

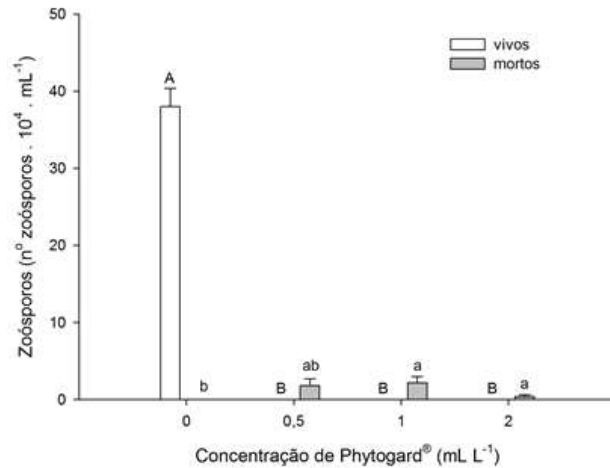
Figura 3. Efeito de diferentes concentrações de Phytogard[®] (fosfito de potássio: P₂O₅ = 28%; K₂O = 26%) sobre o crescimento micelial de *Phytophthora plurivora* em meio V8-ágar (A) e produção de massa fresca de micélio em meio V8 líquido (B). Colunas seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As barras indicam o erro padrão da média (n=5).



Fonte: Dados originais da pesquisa.

Da mesma forma o Phytogard[®] inibiu a produção de zoósporos por *P. plurivora* em todas as concentrações avaliadas quando comparadas ao controle. Em todos esses tratamentos, com exceção do controle, os zoósporos encontrados estavam sem motilidade (Figura 4). 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*. Esses autores concluíram que existem vários outros sais que possuem efeito fungistático para diferentes patógenos, os quais podem ser utilizados para implementação de um manejo integrado e sustentável de doenças de plantas.

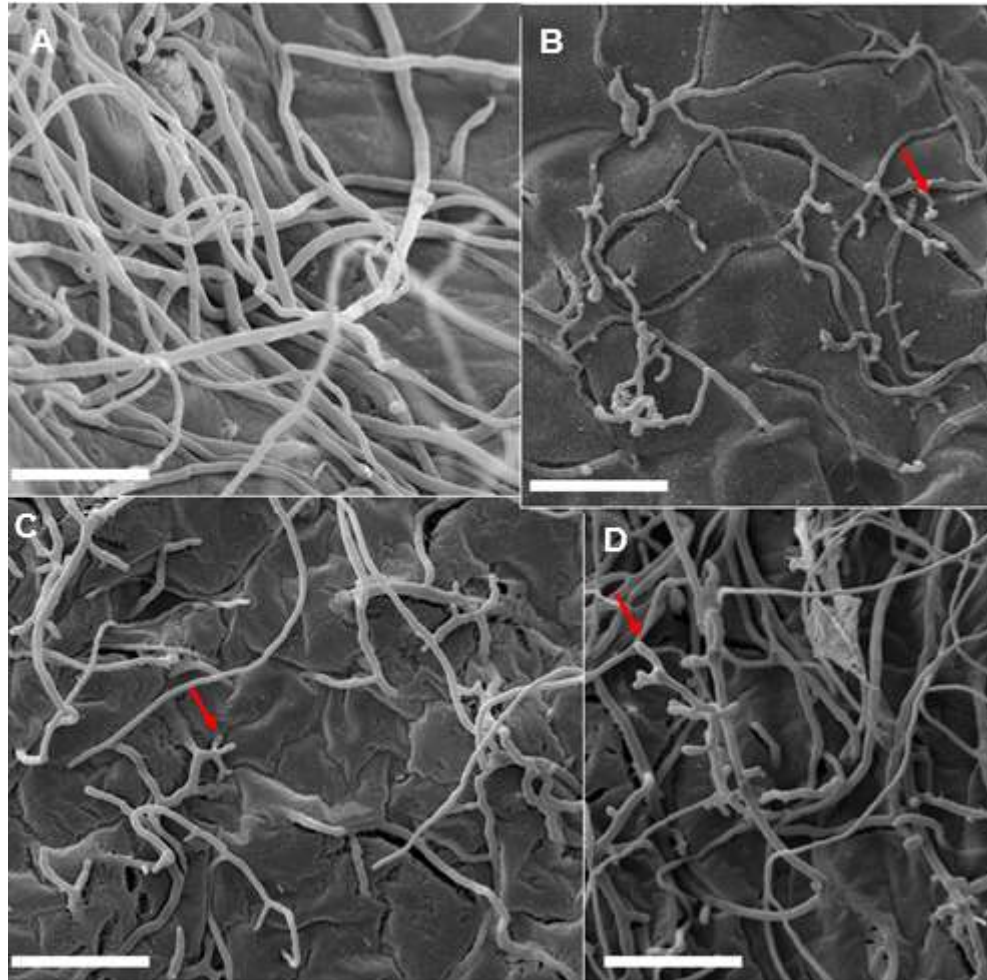
Figura 4. Influência de diferentes concentrações de Phytogard® (fosfito de potássio: P₂O₅ = 28%; K₂O = 26%) sobre a produção de zoósporos de *Phytophthora plurivora*. Colunas seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As barras indicam o erro padrão da média (n=5).



Fonte: Dados originais da pesquisa.

Foi possível verificar modificações na morfologia das hifas de *P. plurivora* da região periférica do micélio quando cultivado em concentrações crescentes de Phytogard® por meio da análise em microscopia eletrônica de varredura. As hifas provenientes do patógeno cultivado na presença do fosfito de potássio, representada nas Figuras 5B, 5C, 5D, apresentaram-se mais finas, com maior número de ramificações, menores e atrofiadas comparadas ao micélio cultivado sem o produto (Figura 5A). Além da inibição do crescimento micelial, King et al. (2010) observaram efeito adverso na morfologia da hifa de oomiceto. Os autores relataram distorções, lise das paredes e a produção de ramificações atrofiadas das hifas crescidas em meio com fosfito, semelhante ao encontrado no presente trabalho. Mudanças morfológicas severas no micélio de *Phytophthora cactorum* e *Phytophthora capsici* também foram observadas em função do tratamento com o fungicida Fosetyl-Al segundo Dercks e Buchenauer (1987). 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 controle.

Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura. Micélio de *Phytophthora plurivora* cultivado em meio V8-ágar nas concentrações de 0 mL L⁻¹ (A), 0,5 mL L⁻¹ (B), 1 mL L⁻¹ (C) e 2 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 = 15 μm (A); 18,75 μm (B, C) e 25 μm (D).

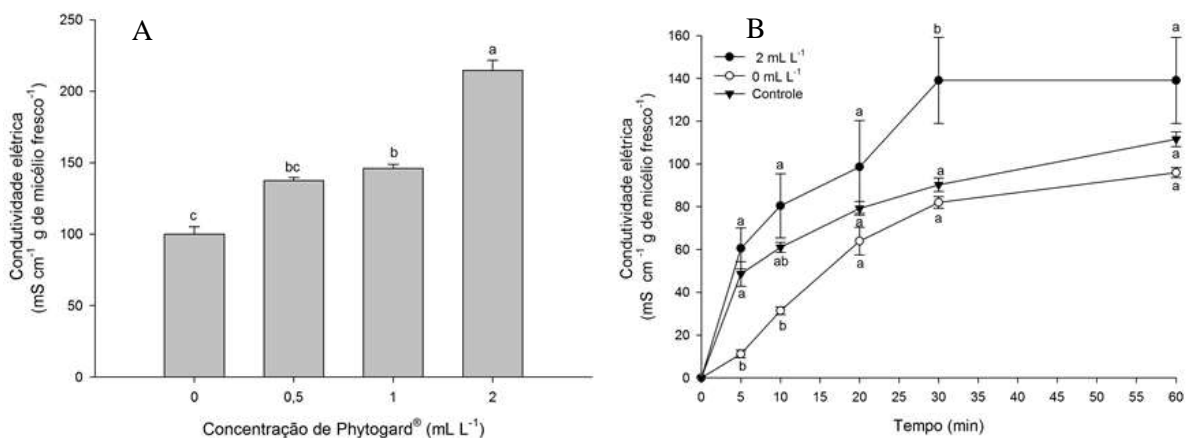


Fonte: Dados originais da pesquisa.

Ao avaliar a perda de eletrólitos por parte do micélio de *P. plurivora* quando exposto ao fosfito de potássio, observou-se elevados valores desse parâmetro quando o patógeno foi cultivado por seis dias em concentrações crescentes de Phytogard®. Observou-se perda de eletrólitos de 99 μS cm⁻¹ g micélio fresco⁻¹ quando cultivado em concentração de 0 mL L⁻¹ do produto, enquanto que para o micélio cultivado em concentração de 2 mL L⁻¹ esse valor foi de 214 μS cm⁻¹ g micélio fresco⁻¹ (Figura 6A). Isso também foi detectado no ensaio de perda de eletrólitos ao longo do tempo (Figura 6B) onde os valores de condutividade foram aumentando à medida que o micélio ficava mais tempo exposto ao produto. Esses valores foram superiores ao do controle que, por sua vez, consistiu de micélio rompido

mecanicamente. Não houve variação na condutividade a partir dos 20 e 30 minutos, indicando o maior efeito direto do produto nos primeiros momentos de exposição ao mesmo. Walters e Bingham (2007) relataram que os fosfatos podem sequestrar o Ca apoplástico e com isso alterar a integridade da membrana celular afetando a atividade de enzimas, como as poligacturonases, sendo que nesse caso, eliciadores poderiam ser liberados a partir da parede celular do patógeno.

Figura 6. Efeito de diferentes concentrações de Phytogard® (fosfito de potássio: $P_2O_5 = 28\%$; $K_2O = 26\%$) sobre a perda de eletrólitos por parte do micélio de *Phytophthora plurivora* cultivado em meio V8 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. plurivora* cultivado em meio V8 líquido após seis dias de incubação (B). Os dados são expressos em micro-Siemens $\text{cm}^{-1} \text{ g micélio fresco}^{-1}$ ($\text{mS cm}^{-1} \text{ g micélio fresco}^{-1}$) 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 ($n=5$).

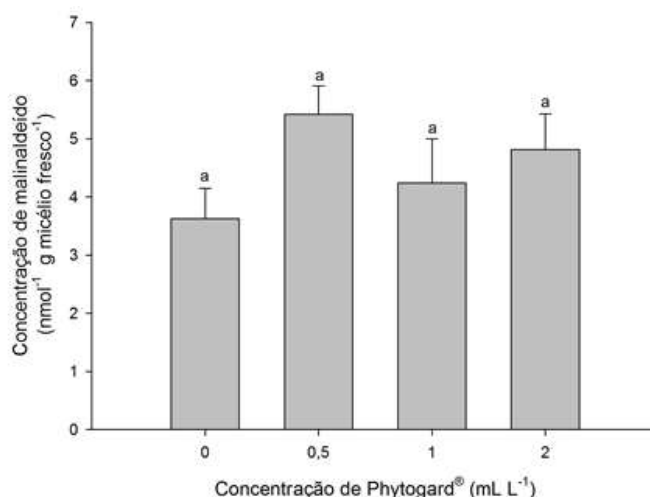


Fonte: Dados originais da pesquisa.

Em função dos resultados do presente trabalho, o qual indicou possível alteração da permeabilidade da membrana plasmática do patógeno cultivado na presença de fosfito de potássio, foi determinado também esse efeito sobre a peroxidação de lipídios da membrana. Esta análise permite inferir sobre a ação de radicais livres decorrentes do estresse causado pelo fosfito ao micro-organismo, o que pode conduzir à alteração na permeabilidade da membrana (Farmer & Mueller, 2013). A avaliação indireta da peroxidação de lipídios por meio da determinação do malonaldeído não evidenciou diferença entre os tratamentos,

demonstrando que a elevada perda de eletrólitos não deve ser incitada pela alteração nos lipídios da membrana (Figura 7). Diferente desses resultados, quando *Phytophthora capsici* e *P. palmivora* foram tratados com concentrações subinibitórias de fosfonatos, mudanças significativas nos lipídios do micélio foram observadas (Dunstan, Smillie & Grant, 1990; Guest & Grant, 1991). Portanto, é possível supor que os diferentes resultados sejam consequência da utilização de diferentes técnicas de detecção de lipídios, e que haja necessidade de uma investigação minuciosa da membrana para concluir se há redução dos lipídios da mesma ou se a alteração da permeabilidade seja consequência de outros eventos.

Figura 7. Efeito de diferentes concentrações de Phytogard® (fosfito de potássio: P₂O₅ = 28%; K₂O = 26%) sobre a peroxidação de lipídios em micélio de *Phytophthora plurivora* cultivado em meio V8 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).

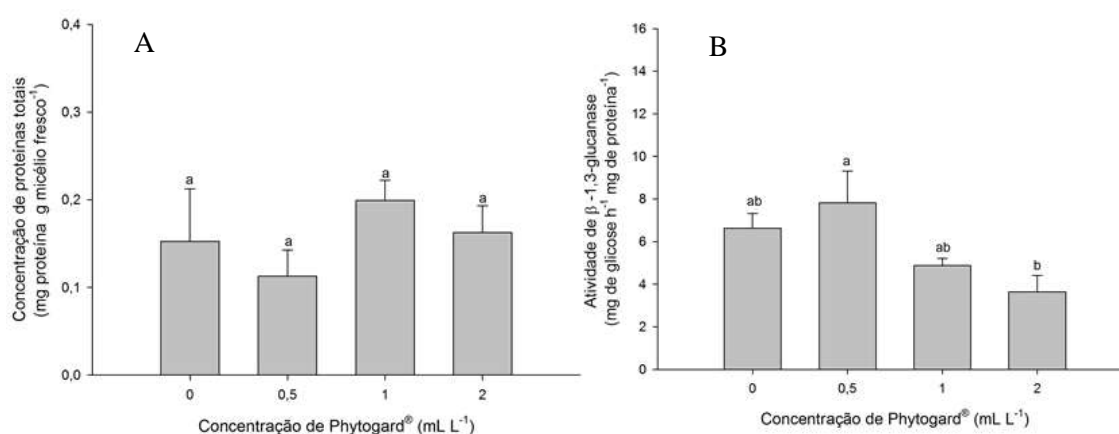


Fonte: Dados originais da pesquisa.

Foi verificado que os tratamentos com diferentes concentrações do fosfito de potássio, utilizados nesse trabalho e nas condições em que estes ensaios foram conduzidos, não foram significativamente diferentes do controle (0 mL.L⁻¹) no que se refere ao conteúdo total de proteínas produzidas pelo micélio do patógeno (Figura 8A). As proteínas são necessárias aos micro-organismos pois possuem papel importante na fisiologia dos mesmos, e suas formas ativas, as enzimas, participam da manutenção da plasticidade da parede celular, além de ser fontes de nitrogênio, fósforo e enxofre que podem estar envolvidas em processos de defesa das plantas (Marzluf, 1997; Schwan-Estrada, Stangarlin & Pascholati, 2008). Algumas enzimas específicas participam da síntese de glucanas (β -1,3 e β -1,6) que constituem a parede

celular de oomicetos juntamente com a celulose (Alexopoulos, Mims & Blackwell, 1996), umas das etapas para se estudar possíveis mecanismos de ação do fosfito de potássio seria descobrir se há interferência desse produto na degradação das β -1,3-glucanas.

Figura 8. 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 plurivora* cultivado em meio V8 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.

Como pode ser observado na Figura 8B, 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. plurivora*. 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. 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).

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 cultivado na presença do produto, podem ser correlacionados a atuação do mesmo em alvos como a membrana e a parede celular. Esse fato ocorre devido a presença de sais de potássio que possuem a capacidade de modificar mais de 43 transcritos genômicos sendo muitos deles envolvidos na síntese da parede celular ou no funcionamento do

citoesqueleto do micro-organismo (King et. al, 2010). Entretanto, outros ensaios devem ser conduzidos para maior compreensão da atuação deste ingrediente ativo (Roma, 2013).

Considerando que os produtos à base de fosfitos são eficientes como ferramenta de manejo de diversos patossistemas, os resultados desse trabalho poderão contribuir para a melhor compreensão de futuros estudos a respeito do modo de ação e aplicações do mesmo, colaborando no seu uso com segurança no manejo de doenças de plantas (Roma, 2013).

4. Conclusão

O produto a base de fosfito de potássio, Phytogard[®], em todas as concentrações utilizadas controla de maneira preventiva a doença causada por *Phytophthora plurivora* em faia. Além disso o produto inibe o crescimento micelial e a produção de zoósporos pelo patógeno e modifica a morfologia das hifas, atua na permeabilidade da membrana e na síntese de parede celular do micélio do *P. plurivora*. Não houve alteração na síntese de proteínas e na peroxidação de lipídios da membrana do patógeno tratados com o fosfito de potássio, indicando que existem outros possíveis mecanismos de ação atuantes nesse processo.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Stoller do Brasil pela disponibilização do produto para os ensaios, à equipe da Seção de Fitopatologia de Plantas Lenhosas do Departamento de Ecologia da Universidade Técnica de Munique e ao Núcleo de Microscopia (NAP/MEPA-Esaq/USP) pelo apoio e utilização da infraestrutura para realização dos ensaios. Agradecem também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

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.

- Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*. (5a ed.) San Diego: Elsevier Academic Press.
- Alexopoulos, C. J., Mims, C. W. & Blackwell, M. (1996). *Introductory mycology*. (4a ed.) New York: John Wiley.
- Bedendo, I. P. (2011). Podridões de raiz e colo. In: Amorim, L.; Rezende, J.A.M. & Bergamin Filho (Ed.). *Manual de Fitopatologia* (pp. 443-451). São Paulo: Editora Agronômica Ceres.
- 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.
- Brasier, C. M. (2009). *Phytophthora* biodiversity: how many *Phytophthora* species are there? In: Goheen, E. M. & Frankel, S. J. (Ed.). *Phytophthoras in Forests and Natural Ecosystems* (pp. 101-115). General Technical Report, 221. Albany: USDA Forest Service.
- 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.
- Carswell, S. C., Grant, B. R., Theodorou, M. E., Harris, J., Niere, J. O. & Plaxton, W. C. (1996). The fungicide phosphonate disrupts the phosphate starvation response in *Brassica nigra* seedlings. *Plant Physiology*, 110, 105-110.
- Cohen, M. D. & Coffey, M. D. (1986). Systemic fungicides and the control of oomycetes. *Annual Review Phytopathology*, 24, 311-338.
- 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.

Dunstan, R. H., Smillie, R. H. & Grant, B. R. (1990). The effects of sub-toxic levels of phosphonate on the metabolism and potential virulence factors of *Phytophthora palmivora*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 36, 205-220.

Farmer, E. E. & Mueller, M. J. (2013). ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 429-450.

Frac, Fungicide resistance action committee (2019). Fungal control agents sorted by cross resistance pattern and mode of action. Recuperado de https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2019.pdf?sfvrsn=98ff4b9a_2.

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

Hardy, G. E. S., Barret, S. & Shearer, B. L. (2001). The future of phosphate as a fungicide to control the soilborne plant pathogen *Phytophthora cinnamomi* in natural ecosystems. *Australasian Plant Pathology*, 30, 133-139.

Heath, R. L. & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry Biophysics*, 125, 189-198.

Jung, T., Hudler, G., Jensen-Tracy, S., Griffiths, H., Fleischmann, F. & Osswald, W. (2005). Involvement of *Phytophthora* species in the decline of European beech in Europe and the USA. *Mycologist*, 19, 159-166.

Karnovsky, M. J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron-microscopy. *Journal of Cell Biology*, 27, 137-138A.

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.

Leite, N. de O. G., Chagas, A. B., Costa, M. L. A. da, Farias, L. R. A., Cunha, A. L., Rocha, M. A. do N., Nascimento, C. M. A. do, Rocha Júnior, E. F. da, Maranhão, T. L. G. Q., Santos, A. F., dos & Silva, J. V. (2020). Influências das interações Patógeno- Hospedeiro- Meio Ambiente nas funções Biológicas das plantas. *Research, Society and Development*, 9 (10), e469108126. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i10.8126>.

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

Lüttringer, M., & De Cormis, L. (1985). Absorption, dégradation et transport du phosétyl-Al et de son metabolite chez la tomate. *Agronomie*, 5, 423-430.

Marzluf, G. A. (1997). Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61 (1), 17-32.

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.

Orbovic, V., Syverstsen, J. P., Bright, D., Van Clief, D. L. & Graham, J. H. (2008). Citrus seedling growth and susceptibility to root rot as affected by phosphite and phosphate. *Journal Plant Nutrition*, 31, 774-787.

Packham, J. R., Thomas P. A., Atkinson, M. D. & Degen, T. (2012). Biological flora of the british isles: *Fagus sylvatica*. *Journal of Ecology*, 100, 1557-1608.

Roma, R. C. C. (2013). *Fosfito 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.

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

Schroetter, S., Angeles-Wedler, D., Kreuzig, R. & Schnug, E. (2006). Effects of phosphite on phosphorus supply and growth and growth of corn (*Zea mays*). *Landbauforschung Volkenrodxe*, 56, 87-99.

Schwan-Estrada, K. R. F., Stangarlin, J. R. & Pascholati, S. F. (2008). Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: Pascholati, S. F., Leite, B., Stangarlin, J. R. & Cia, P. *Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular* (pp. 227-248). Piracicaba: FEALQ.

Shearer, B. L. & Fairman, R. G. (2007). A stem injection of phosphite protects *Banksia* species and *Eucalyptus marginata* from *Phytophthora cinnamomi* for at least four years. *Australasian Plant Pathology*, 36, 78-86.

Stangarlin, J. R. & Leite, B. (2008). Alterações fisiológicas na suscetibilidade. In: Pascholati, S.F.; Leite, B.; Stangarlin, J.R.; Cia, P. *Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular* (pp. 117-226). Piracicaba: FEALQ.

Walters, D. R. & Bingham, I (2007). Influence of nutrition on disease development caused by fungal pathogens: Implications for plant disease control. *Annual Applied Biology*, 151, 307-324.

Weiland, J. E., Nelson, A. H. & Hudler G. W. (2010). Agressiveness of *Phytophthora cactorum*, *P. citricola* I, and *P. plurivora* from European beech. *Plant Disease*, 94, 1009-1014.

Wilkinson, C. J., Holmes, J. M., Dell, B., Tynan, K. M., McComb, J. A., Shearer, B. L., Colquhoun, I. J. & Hardy, G. E. S. (2001). Effect of phosphite on in planta zoospore production of *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology*, 5, 587-593.

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%