

A utilização de elicitinias no combate contra *Phytophthora cinnamomi* na doença da tinta do castanheiro e no declínio do montado

Isabel Maia¹, Clara Medeira¹, Ana Cristina Moreira², Irene Candeias², Elvira Melo², Nelson de Sousa³ e Alfredo Cravador³

Resumo

Phytophthora cinnamomi e *P. cambivora* são considerados os agentes patogénicos da doença da tinta do castanheiro. Estes agentes invadem e destroem o sistema radicular, levando à morte das árvores e a importantes perdas económicas.

O declínio do montado tem sido associado a vários agentes patogénicos, pragas e factores abióticos. *Phytophthora cinnamomi* tem sido referido como um potencial agente patogénico do sobreiro e azinheira. O aparecimento de mais estirpes de microrganismos patogénicos resistentes a pesticidas impõe o desenvolvimento de novas estratégias de biocontrolo, entre as quais a estimulação de reacções de defesa.

As elicitinias são proteínas de baixo peso molecular, secretadas por algumas espécies de oomycetes (*Phytophthora* e *Pythium*) que induzem reacções de hipersensibilidade e aquisição de resistência sistémica nas plantas, contra um grande número de bactérias e fungos patogénicos. Este trabalho é uma síntese dos resultados sobre o efeito da aplicação radicular de várias elicitinias, na infeção do sobreiro, azinheira e castanheiro por *P. cinnamomi*. A avaliação foi efetuada por observação microscópica dos tecidos invadidos, em especial dos tecidos vasculares.

Observou-se a indução de reacções de defesa contra *P. cinnamomi* quando se submeteram as raízes destas três espécies a pré-tratamento

¹ INRB, I.P. / L-INIA, Unidade de Investigação de Recursos Genéticos, Ecofisiologia e Melhoramento de Plantas, Quinta do Marquês, 2784-505 Oeiras, Portugal; e-mail: clara.medeira@inrb.pt; isabel.maia@inrb.pt

² INRB, I.P. / L-INIA, Unidade de Investigação de Proteção de Plantas, Quinta do Marquês, 2784-505 Oeiras, Portugal; e-mail: acmarcellino@yahoo.com.br

³ IBB/CGB, Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro, Portugal; e-mail: acravad@ualg.pt

com as elicinas criptogéina, capsiceína ou cinamomina. A infeção ficou restrita aos tecidos corticais da raiz, onde o agente patogénico se desorganizou e não progrediu para os vasos, estando associado à acumulação de materiais que se presume serem tóxicos, produzidos nas células dos hospedeiros, em contato com as hifas em desorganização.

Os ensaios laboratoriais indicaram que as elicinas testadas se revelaram muito eficientes no biocontrolo de *P. cinnamomi*. Será de grande importância desenvolver tecnologia no sentido de obtenção de elicinas a baixo custo e de criar sistemas eficientes da sua dispersão nas plantas.

Palavras-chave: citologia, colonização vascular da raiz, reações de defesa.

1. Introdução

Os montados de sobre e azinho são ecossistemas de grande importância económica e ecológica na região mediterrânica ocidental, especialmente na Península Ibérica. Protegem o solo da radiação solar e da erosão, constituindo uma primeira barreira à desertificação nas regiões semiáridas do Sul, caracterizadas por solos pobres expostos a condições climáticas adversas (Horta et al., 2010). Apesar da tolerância a condições climáticas extremas, estas espécies sofrem períodos consecutivos de seca (Grant et al., 2010), tornando-as mais vulneráveis a stresses bióticos e abióticos.

O declínio do montado que afeta severamente o sobreiro e azinheira em Portugal e em Espanha tem sido associado à *Phytophthora cinnamomi* (Brasier, 1992; Sánchez et al., 2002; Moreira e Martins, 2005), entre outros agentes patogénicos, pragas e fatores abióticos. Algumas espécies do montado (*Cistus* spp., *Ulex* spp e *Arbutus unedo*) têm também sido referidas como hospedeiros.

Para além do montado, *Phytophthora cinnamomi* e *P. cambivora* são considerados os agentes patogénicos da doença da tinta do castanheiro. Estes agentes invadem e destroem o sistema radicular, levando à morte das árvores.

Phytophthora cinnamomi pode permanecer no solo por muito tempo, esporulando quando as condições são favoráveis e produzindo zoósporos que se deslocam e que são atraídos pelas raízes infetando as plantas suscetíveis. Este agente patogénico que é um oomycete infeta mais de 3 000 espécies selvagens e cultivadas (Hardham, 2005).

O aparecimento de um número cada vez maior de estirpes de microrganismos patogênicos resistentes a pesticidas impõe o desenvolvimento de novas estratégias de biocontrole na proteção das plantas. No contexto de uma agricultura sustentável, é importante a estimulação de reações de defesa contra a invasão de agentes patogênicos. Dos trabalhos desenvolvidos nesta área destacam-se os tratamentos com elicitorinas que são proteínas de baixo peso molecular, secretadas por algumas espécies de oomicetes-*Phytophthora* (Ricci et al., 1989) e *Pythium* (Panabières et al., 1997) e que induzem nas plantas reações de hipersensibilidade e aquisição de resistência sistêmica contra um grande número de bactérias e fungos patogênicos (Ricci et al., 1989; Ricci, 1997; Piccard et al., 2000).

Criptogéina é uma elicitorina secretada por *Phytophthora cryptogea* que quando aplicada nas plantas do tabaco induziu reações de defesa contra *P. parasitica* (Milat et al., 1991; Lheirminier et al., 2003). Oligandrina é também uma proteína com características das elicitorinas, secretada por *Pythium oligandrum*, que levou à expressão de reações de resistência no tomateiro quando pré-tratado com esta proteína e inoculado com *P. parasitica* (Piccard et al., 2000). A oligandrina quando aplicada às raízes da videira limitou a progressão de *Botrytis cinerea* nas folhas por indução de reações de defesa no hospedeiro e degradação do agente patogênico (Mohamed et al., 2007).

Foi objetivo deste trabalho verificar a resposta do sobreiro, azinheira e castanheiro à infecção por *P. cinnamomi* após pré-tratamento das raízes com as elicitorinas criptogéina, capsiceína (secretada por *P. capsici*), e cinamomina (secretada por *P. cinnamomi*). A avaliação foi efetuada pela observação microscópica dos tecidos radiculares invadidos, em especial do tecido vascular.

2. Material e Métodos

A – As raízes de plantas com quatro meses, obtidas da germinação de sementes, foram imersas em solução aquosa de elicitorinas (500 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) durante 24 h (Fig. 1A). Após terem sido inoculadas com *P. cinnamomi* durante 48 h, as amostras de fragmentos de raízes foram processadas para estudo em microscopia óptica (MO), microscopia de fluorescência (MF) (Pires et al., 2008) e para microscopia eletrônica de transmissão (MET) (Medeira et al., 2006a).

B – As raízes de plântulas obtidas em cultura *in vitro* de meristemas, foram tratadas sobre agar, em placa de Petri (Fig. 1B), com deposição de

gotas de solução de elicetina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) na zona de absorção da raiz durante 24 h e, posteriormente, inoculadas durante 48 h e processadas para estudos microscópicos, seguindo a mesma metodologia referida no ponto 1.

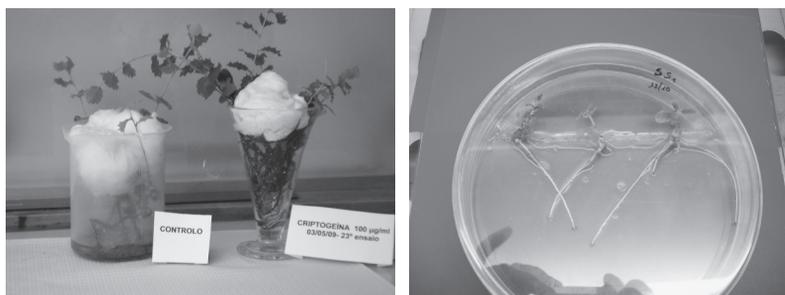


Fig. 1A Imersão das raízes de sobreiro em solução de elicetina.

Fig. 1B Plântulas de sobreiro obtidas *in vitro* imediatamente antes da aplicação de elicetina.

3. Resultados e Discussão

Os efeitos das três elicetinas testadas foram semelhantes no sobreiro, quer em plantas obtidas de semente (*seedlings*), quer em plântulas obtidas em cultura *in vitro* a partir de meristemas.

A elicetina criptogeína impediu totalmente a invasão dos vasos floémicos e xilémicos na concentração de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e reduziu de 50% a invasão na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, nas plantas de 4 meses, obtidas de germinação de sementes (Figs. 2A e 2B). A elicetina capsiceína, quando aplicada na concentração de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ nas raízes de plantas de 4 meses, obtidas da germinação de sementes impediu totalmente a colonização do cilindro vascular (Fig. 2C) (Maia et al., 2009).

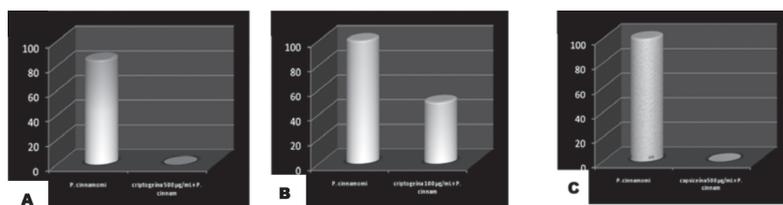


Fig. 2 Efeito das elicetinas: criptogeína- $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (A) e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (B), capsiceína- $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (C) na infeção dos cilindros vasculares de raízes de *seedlings* de sobreiro e respetivos controlos (inoculação sem pré-tratamento de elicetinas). Em ordenadas: cilindros vasculares infetados (%).

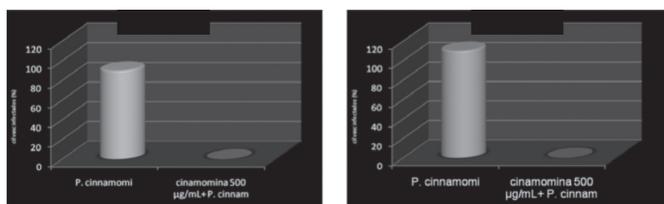


Fig. 3 Efeito da elicítina cinamomina-500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ na infeção dos cilindros vasculares (%) de raízes de *seedlings* de sobreiro e azinheira e respetivos controlos (inoculação sem pré-tratamento de elicítinas).

A elicítina cinamomina aplicada a raízes de *seedlings* de sobreiro, impediu a colonização dos vasos na concentração de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Fig. 3A) (Maia et al., 2005; Medeira et al., 2007). O mesmo foi verificado na azinheira (Fig. 3B) (Medeira et al., 2006b; Medeira et al., 2007).

Nas plântulas de sobreiro obtidas *in vitro* a elicítina cinamomina aplicada nas raízes na concentração de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ bloqueou a colonização vascular (Fig. 4A). Nas plântulas de castanheiro obtidas *in vitro* a elicítina cinamomina na mesma concentração reduziu em 65% a colonização dos cilindros vasculares (Fig. 4B) (Medeira et al., 2010).

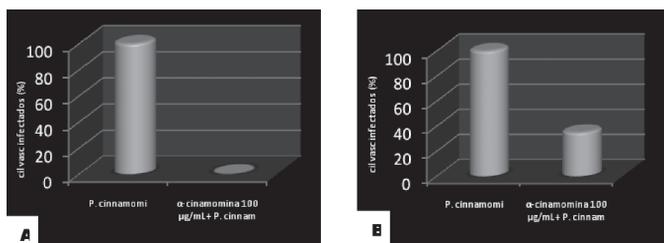
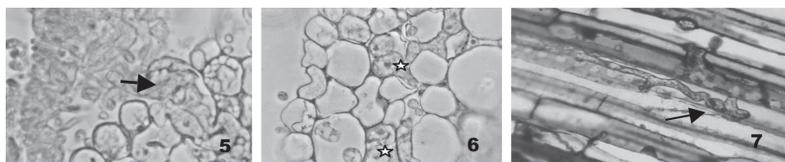


Fig. 4 Efeito da elicítina cinamomina na concentração de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ na infeção dos cilindros vasculares (%) de raízes de plântulas obtidas *in vitro* (A – sobreiro; B – castanheiro) e respetivos controlos (inoculação sem pré-tratamento de elicítina)

Contrariamente nas plantas não tratadas e inoculadas verificámos que *P. cinnamomi* invadiu todo o córtex e o cilindro vascular, 48 h após a inoculação (Figs. 2 a 7).

As observações microscópicas mostraram ainda que as três elicítinas testadas induziram no hospedeiro alterações estruturais, como a acumulação de materiais, que pelas características de coloração e autofluorescência indiciam a presença de compostos fenólicos, nos espaços intercelulares do córtex da raiz onde as hifas de *P. cinnamomi* ficaram frequentemente sequestradas e em desorganização (Figs. 8 a 10).

A impregnação das paredes celulares pelo mesmo tipo de materiais, bem como a sua deposição nos vacúolos das células do hospedeiro



Figs. 5 a 7 (MO) Colonização das raízes de sobreiro por *P. cinnamomi* (setas).

Fig. 6 Invasão do córtex (*).

Fig. 7 Colonização do cilindro vascular (seta).

parecem constituir uma barreira física e também produzir um efeito tóxico que inviabiliza o agente patogénico e impede a progressão deste para o cilindro vascular (Medeira et al., 2010). A acumulação massiva de compostos fenólicos nos locais de tentativa de penetração das hifas pode ser considerada como uma resposta rápida e eficiente do hospedeiro, induzida pelas elicinas (Benhamou et al., 2001).

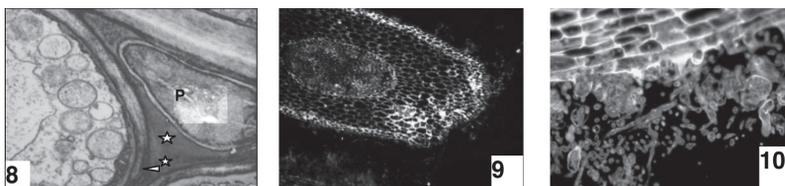


Fig. 8 (MET) Hifa de *P. cinnamomi* (P) em desorganização, num espaço intercelular rodeado por material osmiofílico (*).

Figs. 9 e 10 (Microscopia de fluorescência) Acumulação de materiais que autofluorescem como fenóis nas paredes celulares e espaços intercelulares na área de entrada das hifas.

As alterações celulares que levaram à retenção de *P. cinnamomi* nos tecidos periféricos da raiz no sobreiro, azinheira e castanheiro são a expressão de reações de defesa induzidas pelas três elicinas testadas, em presença do agente patogénico.

4. Conclusões

Observou-se a indução de reações de defesa contra *P. cinnamomi* no sobreiro, azinheira e castanheiro quando se submeteram as raízes destas espécies a pré-tratamento com as elicinas criptogéina, capsiceína e cinamomina. A restrição da infeção aos tecidos corticais da raiz, onde o agente patogénico se desorganizou e não progrediu para os vasos, esteve associada

a acumulação de materiais que se presume serem tóxicos, produzidos nas células dos hospedeiros em contacto com as hifas em desorganização.

Os ensaios laboratoriais indicaram as elicinas testadas como proteínas muito eficientes no biocontrolo de *P. cinnamomi*. Será de grande importância desenvolver tecnologia no sentido de obtenção de elicinas a baixo custo e de criar sistemas eficientes da sua dispersão nas plantas.

Agradecimentos

Projeto AGRO 416 – Impacto de *Phytophthora cinnamomi* associado ao stress hídrico no decline do sobreiro e azinheira. Novos métodos de deteção e controlo.

Projeto PTDC/AGR-AAM/67628/2006 – Identificação, caracterização e papel de factores moleculares associados ao mecanismo de infeção de espécies de Fagaceae por *Phytophthora cinnamomi*.

Bibliografia

- Benhamou, N.; Bélanger, R.R.; Rey, P.; Tirilly, Y. 2001. Oligandrin, the elicitin-like protein produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum*, induces systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 39: 681-698.
- Brasier, C.M. 1992. Oak tree mortality in Iberia. *Nature* 360: 539.
- Grant, O.M.; Tronina, L.; Ramalho, J.C.; Besson, C.K.; Lobo-do-Vale, R.; Pereira, J.S.; Jones, H.G.; Chaves, M.M. 2010. Thermal imaging and chlorophyll fluorescence indicate substantial summer stress in *Quercus suber* L. under current conditions, but a relatively minor impact of further reducing rainfall. *Journal of Experimental Botany* 61, 15: 4361-4371.
- Hardham, A.R. 2005. *Phytophthora cinnamomi*. Pathogen profile. *Molecular Plant Pathology* 6: 589-604.
- Horta, M.; Caetano, P.; Coelho, A.C.; Medeira, C.; Maia, I.; Neves, D.; Cravador, A. 2010. Virulence behaviour and gene expression patterns of a *Phytophthora cinnamomi* β -cinnamomin silenced transformant. *European Journal of Plant Pathology* 127, 3: 427-436.
- Lheirminier, J.; Benhamou, N.; Larrue, J.; Milat, M.-L.; Boudon-Padieu, E.; Nicole, M.; Blein, J.-P. 2003. Cytological characterization of elicitin-induced protection in tobacco plants infected by *Phytophthora parasitica* or phytoplasma. *Phytopathology* 93: 1308-1319.
- Maia, I.; Medeira, C.; Dias, J.; Sousa, N.; Melo, E.; Moreira, A.; Cravador, A. 2005. The effect of the elicitin α -cinnamomin on the roots of cork-oak tree infected

- by *Phytophthora cinnamomi*. *XL Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Microscopia Electrónica*, Lisboa, Livro resumos, PB 02.
- Maia, I.; Diniz, I.; Melo, E.; Cravador, A.; Medeira, C. 2009. The elicitin capsicein induced defense responses in *Quercus suber* roots infected by *Phytophthora cinnamomi*. *Joint Meeting of the Spanish and Portuguese Microscopy Societies*, 16-19 July, Segovia, Abstracts book, pp. 141-142.
- Medeira, M.C.; Maia, M.I.; Carvalho, M.T. 2006a. Flower bud failure in olive and the involvement of amoeboid protists. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 81, 2: 251-258.
- Medeira, C.; Maia, I.; Piassab, P.; Sousa, N.; Melo, E.; Moreira, A.; Cravador, A. 2006b. *Phytophthora cinnamomi* – *Q. rotundifolia* interaction and the effect of the elicitin α -cinnamomin. *XLI Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Microscopia Electrónica*, 14-15 Dezembro, Braga, Livro resumos, pp. 68.
- Medeira, C.; Maia, I.; Sousa, N.; Cravador, A. 2007. Cinnamomin reduces the capacity of infection of cork oak and holm oak roots by *P. cinnamomi*. *IUFRO Tree Biotechnology Congress 2007*, 3-8 June, Ponta Delgada, Açores, Abstract SII. 9.
- Medeira, C.; Maia, I.; Ribeiro, C.; Candeias, I.; Melo, E.; Sousa, N.; Cravador, A. 2010. Alpha cinnamomin elicit a defence response against *Phytophthora cinnamomi* in *Castanea sativa*. *28th International Horticultural Congress*, 22-27 Agosto, Lisboa, Portugal, Livro resumos, Painel S06 275, pp. 321.
- Milat, M.-L.; Ducruet, J.M.; Ricci, P.; Marty, F.; Blein, J.P. 1991. Physiological and structural changes in tobacco leaves treated with cryptogein, a proteinaceous elicitor from *Phytophthora cryptogea*. *Phytopathology* 81: 1364-1368.
- Mohamed, N.; Lheirminier, J.; Farmer, M.-J.; Fromentin, J.; Béno, N.; Houot, V.; Milat, M.-L.; Blein, J.-P. 2007. Defense responses in grape vine leaves against *Botrytis cinerea* induced by application of a *Pythium oligandrum* strain or its elicitin, oligandrin, to roots. *Phytopatology* 97: 611-620.
- Moreira, A.C.; Martins, J.M. 2005. Influence of site factors on the impact of *Phytophthora cinnamomi* in cork oak stands in Portugal. *Forest Pathology* 35: 145-162.
- Panabières, P.; Ponchet, M.; Allasia, V.; Cardin, L.; Ricci, P. 1997. Characterization of border species among *Pythiaceae*: several *Pythium* isolates produces elicitors, typical proteins from *Phytophthora* spp. *Mycological Research* 101: 1450-1468.
- Piccard, K.; Ponchet, M.; Blein, J.-P.; Rey, P.; Tirilly, Y.; Benhamou, N. 2000. Oligandrin. A proteinaceous molecule produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum* induces resistance to *Phytophthora parasitica* infection in tomato plants. *Plant Physiology* 124: 379-395.
- Pires, N.; Maia, I.; Moreira, A.; Medeira, C. 2008. Early stages of infection of cork and holm oak trees by *Phytophthora cinnamomi*. In: Vázquez, J.; Pereira, H. (Eds.), *Suberwood – New challenges*. Universidad de Huelva, pp. 275-282.
- Ricci, P.; Bonnet, P.; Huet, J.C.; Sallatin, M.; Beauvais-Caute, F.; Bruneteau, M.; Billard, V.; Michel, G.; Pernollet, J.C. 1989. Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *European Journal of Biochemistry* 183: 555-563.
- Ricci, P. 1997. Induction of the hypersensitive response and systemic acquired resistance by fungal proteins: The case of elicitors. In: Stacey, G.; Keen, T. (Eds.), *Plant-microbe interactions*. Chapman & Hall, New York, USA, pp. 53-75.
- Sánchez, M.E.; Caetano, P.; Ferraz, J.; Trapero, A. 2002. *Phytophthora* disease of *Quercus ilex* in south-western Spain. *Forest Pathology* 32: 5-18.