

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO DE *Pythium* spp. COM PLÂNTULAS DE
Solanum lycopersicum

Mônica de Medeiros Silva
Bióloga/UFRGS

Dissertação apresentada como um dos
requisitos à obtenção do Grau de
Mestre em Fitotecnia
Área de Concentração Fitossanidade

Porto Alegre (RS), Brasil
Abril de 2008

DEDICO

*Ao meu pai, seu Jadyr,
meu exemplo na vida.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Jadyr e Isabel, às minhas irmãs, Taís e Sabrina, pelo carinho e por sempre me apoiarem, e aos meus cunhados, pelo ótimo convívio;

Ao professor Marcelo Gravina, pelos ensinamentos e pela presença constante;

Aos amigos da antiga família LFM, Adri, Alex, Caren, Marcos, Oneides, Ricardo, pelos ótimos momentos que passamos, e especialmente à Sandra e à Vani, pelo carinho com que me receberam e por me iniciarem na biologia molecular;

Aos amigos da nova família LFM, Adriano, Diego, Elis, Fê, Jefe, Johannes, Leo e Tati, pelas conversas, pelas risadas, pelos cafés e por estarem sempre dispostos a ajudar, e especialmente às gurias, pelas sessões de terapia em grupo;

À Ana, minha companheira nessa jornada de dois anos, pela amizade e por toda a ajuda durante o mestrado;

Às amigas do coração, Adrix, Paola, Dany, Caterine, Luana e Thais;

Aos grandes amigos da Biologia, por todos os momentos felizes que passamos juntos;

Ao Henrique, pelas risadas e pela ajuda na estatística;

Ao Jeferson pela disponibilização dos isolados da coleção, pela ajuda no início dos trabalhos e pela amizade e companheirismo;

À Universal Leaf Tabacos Ltda., pelo apoio na obtenção dos isolados da coleção;

Aos professores, Carla Delatorre e Marcelo Pacheco, pelo auxílio na estatística;

À secretaria da PPG Fitotecnia, Marisa Carvalho Bello;

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Fitossanidade;

À CAPES pela bolsa concedida;

À UFRGS, minha segunda casa nos últimos sete anos, pela oportunidade de realização dos cursos de graduação e pós-graduação.

CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO DE *Pythium* spp. COM PLÂNTULAS DE *Solanum lycopersicum*¹

Autora: Mônica de Medeiros Silva
Orientador: Marcelo Gravina de Moraes

RESUMO

Nos últimos anos, o aumento na produção de plantas em sistemas de cultivo hidropônico ou em substratos comerciais, além da proibição do uso de brometo de metila, resultou em uma maior incidência de doenças radiculares causadas por patógenos de solo como *Pythium* spp.. A caracterização dos mecanismos de patogênese de espécies do gênero *Pythium* que causam danos às culturas poderia promover maiores possibilidades de controle. O objetivo do presente estudo foi caracterizar a resposta de tomate (*Solanum lycopersicum*) à infecção de isolados de diferentes espécies do gênero *Pythium*. A incidência da doença em plântulas, causada pela inoculação com cinco isolados do gênero *Pythium*, foi avaliada quanto à ocorrência de mortalidade, enquanto a severidade foi avaliada quanto a alterações no comprimento da parte aérea e das raízes. O efeito da temperatura e da concentração do inóculo na severidade da doença também foi avaliado. A fim de caracterizar a ação de alguns compostos químicos na ocorrência da doença, foi avaliada a aplicação de ácido abscísico, ácido salicílico (AS), etefon (ET), aminoetoxivinilglicina e um surfactante sintético. Por fim, a técnica de quantificação relativa por PCR em tempo real foi utilizada para avaliar o acúmulo de mRNA de genes de defesa em resposta à inoculação. Na caracterização biológica, verificou-se que todos os isolados foram patogênicos a tomate, apresentando variações na severidade da doença causada. A severidade da doença provocada por *P. inflatum* é baixa, quando comparada com os outros isolados. Já *P. ultimum* causa sintomas inicialmente pouco severos, mas que evoluem rapidamente. A adição de ET, AS e do surfactante reduziu significativamente a severidade da doença. Na caracterização molecular, observou-se que um maior acúmulo de mRNAs dos genes *LOXD*, *PR-1A1* e *PR-5* depende da interação em questão. A diversidade observada nos resultados reflete a complexidade das respostas de *S. lycopersicum* induzidas pelos patógenos. A análise funcional *in vivo* desses e de outros genes poderá contribuir para utilização dos mesmos na obtenção de resistência contra *Pythium* spp..

¹ Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (106p.) Abril, 2008.

CHARACTERIZATION OF THE INTERACTION OF *Pythium* spp. WITH *Solanum lycopersicum* SEEDLINGS ¹

Author: Mônica de Medeiros Silva

Adviser: Marcelo Gravina de Moraes

ABSTRACT

In recent years, the increase in plant production in hydroponic culture systems or in commercial soil media, in addition to the ban on the use of methyl bromide, resulted in a higher incidence of root diseases caused by soil pathogens like *Pythium* spp.. The characterization of the pathogenesis mechanisms of species of the genus *Pythium* that cause damage to crops could promote greater opportunities for control. The objective of this study was to characterize the response of tomato (*Solanum lycopersicum*) to the infection with isolates of different species of the genus *Pythium*. The disease incidence in seedlings caused by inoculation with five isolates from the genus *Pythium* was evaluated according to the occurrence of death, while the severity was assessed by changes in the length of shoots and roots. The effect of temperature and inoculum concentration in disease severity was also assessed. In order to characterize the action of some chemical compounds in the disease occurrence the application of abscisic acid, salicylic acid (SA), ethephon (ET), aminoethoxyvinylglycine and a synthetic surfactant was evaluated. Finally, the technique of relative quantification by real-time PCR was used to assess the accumulation of mRNA from defense genes in response to the inoculation. In the biological characterization, it was found that all isolates were pathogenic to *S. lycopersicum*, although they have induced variable disease severity. The disease severity caused by *P. inflatum* is low when compared with the other isolates. On the other hand, *P. ultimum* initially causes less severe symptoms which progress very rapidly. The addition of ET, AS, and the surfactant, significantly reduced the severity of the disease. In the molecular characterization, it was observed that the accumulation of mRNAs of genes *LOXD*, *PR-1A1*, and *PR-5* depends on the species of *Pythium* in the interaction. The diversity observed in the results reflects the complexity of the responses of *S. lycopersicum* induced by pathogens. *In vivo* functional analysis of these and other genes could contribute to the use of them in obtaining resistance against *Pythium* spp..

¹Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (106p.) April, 2008.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 <i>Pythium</i> sp.	3
2.1.1 Doenças causadas por <i>Pythium</i> spp.	5
2.1.2 Mecanismos de patogênese em <i>Pythium</i> sp.	6
2.1.3 Controle	8
2.1.3.2 Controle químico	9
2.1.3.3 Controle biológico.....	10
2.2 Mecanismos de defesa de plantas contra fitopatógenos	12
2.2.1 Mecanismos de defesa pré-formados.....	12
2.2.2 Mecanismos de defesa induzidos.....	13
2.2.2.1 Defesa contra biotróficos.....	14
2.2.2.2 Defesa contra necrotróficos.....	15
2.2.2.3 Resposta hormonal	17
2.3 Estratégias de análise de expressão gênica na interação planta-patógeno	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Material vegetal e isolados	22
3.2 Avaliação da patogenicidade dos isolados do patógeno em <i>S. lycopersicum</i>	22
3.2.1 Preparo do inóculo	22
3.2.2 Crescimento e inoculação das plântulas	23
3.3 Avaliação da severidade da doença em <i>S. lycopersicum</i> em função da temperatura e da concentração de zoósporos.....	24
3.3.1 Produção de zoósporos.....	24
3.3.2 Crescimento das plantas	25

3.3.3 Inoculação	25
3.4 Avaliação da incidência de doença na presença de hormônios vegetais, indutores de crescimento ou inibidores de hormônios	27
3.4.1 Produção de zoósporos e crescimento das plantas	27
3.4.2 Inoculação e tratamentos	27
3.5 Avaliação da severidade da doença em <i>S. lycopersicum</i> na presença de um surfactante sintético	28
3.5.1 Produção de zoósporos e crescimento das plântulas.....	28
3.5.2 Inoculação	28
3.6 Extração de RNA total e isolamento de mRNA.....	29
3.7 Síntese de cDNA	31
3.9 Análise do acúmulo de mRNA por RT-qPCR	32
4. RESULTADOS	35
4.1 Caracterização biológica.....	35
4.2 Caracterização molecular	48
5. DISCUSSÃO	61
5.1 Caracterização biológica.....	61
5.2 Caracterização molecular	68
6. CONCLUSÕES	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
8. APÊNDICES.....	88

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Escala de severidade de sintomas causados pela inoculação com isolados de diferentes espécies do gênero <i>Pythium</i> em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i>	26
2. Números de acesso no NCBI, seqüências, tamanho dos produtos e temperaturas de dissociação (Tm) dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados.....	33
3. Mortalidade, comprimento da parte aérea e comprimento radicular de plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> inoculadas com quatro isolados de espécies do gênero <i>Pythium</i>	35
4. Mortalidade, comprimento da parte aérea e comprimento radicular de plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> inoculadas com cinco isolados de espécies do gênero <i>Pythium</i>	36
5. Mortalidade de plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> inoculadas com cinco isolados de espécies do gênero <i>Pythium</i>	39
6. Comparação entre médias dos sintomas observados em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> cinco dias após a inoculação com quatro concentrações de zoósporos de diferentes isolados de espécies do gênero <i>Pythium</i>	40
7. Comparação entre médias dos sintomas observados em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> cinco dias após a inoculação com quatro concentrações de zoósporos de diferentes isolados de espécies do gênero <i>Pythium</i>	40
8. Comparação entre médias dos sintomas observados em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> cinco dias após a inoculação com quatro concentrações de zoósporos de diferentes isolados de espécies do gênero <i>Pythium</i>	42
9. Comparação entre médias de sintomas observados em plântulas de <i>S. lycopersicum</i> dois e cinco dias após a inoculação com isolados de espécies do gênero <i>Pythium</i> e do tratamento com um surfactante.....	46

10. Quantificação relativa do acúmulo do mRNA do gene <i>ERF1</i> em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> inoculadas com isolados de espécies do gênero.....	54
11. Quantificação relativa do acúmulo do mRNA do gene <i>LOXD</i> em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> inoculadas com isolados de espécies do gênero.....	55
12. Quantificação relativa do acúmulo do mRNA do gene <i>PR-1A1</i> em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> inoculadas com isolados de espécies do gênero.....	56
13. Quantificação relativa do acúmulo do mRNA do gene <i>PR-5</i> em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> inoculadas com isolados de espécies do gênero.....	57
14. Quantificação relativa do acúmulo do mRNA do gene <i>EXT</i> em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> inoculadas com isolados de espécies do gênero.....	58
15. Quantificação relativa do acúmulo do mRNA dos genes <i>PR-1A1</i> e <i>PR-5</i> em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> inoculadas com isolados de espécies do gênero <i>Pythium</i> e submetidas a tratamentos com diferentes compostos.....	60

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Estruturas observadas em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> inoculadas com isolados de diferentes espécies do gênero <i>Pythium</i>	36
2. Plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> com 14 dias, inoculadas com diferentes isolados do gênero <i>Pythium</i>	38
3. Progressão da doença em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> cinco dias após a inoculação com quatro concentrações de zoósporos de diferentes isolados de espécies do gênero <i>Pythium</i>	41
4. Progressão da doença causada por cinco isolados de espécies do gênero <i>Pythium</i> em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> , analisada dois, três, quatro e cinco dias após a inoculação com zoósporos.....	43
5. Sintomas observados em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> inoculadas com isolados de espécies do gênero <i>Pythium</i> após cinco dias de incubação a 30°C.....	44
6. Plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> cinco dias após a inoculação com zoósporos de <i>P. graminicola</i> e <i>P. deliense</i> e do tratamento com um surfactante.....	46
7. Incidência de necrose em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> inoculadas com isolados de espécies do gênero <i>Pythium</i>	48
8. Curvas de dissociação obtidas a partir dos produtos amplificados dos genes <i>GAPDH</i> (a), <i>ERF1</i> (b) e <i>LOXD</i> (c).....	50
9. Curvas de dissociação obtidas a partir dos produtos amplificados dos genes <i>PR-1A1</i> (a), <i>PR-5</i> (b) e <i>EXT</i> (c).....	51
10. Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados a partir do cDNA de plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> por RT-PCR.....	51
11. Acúmulo de mRNA do gene <i>ERF1</i> em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> inoculadas com isolados de espécies do gênero <i>Pythium</i>	54
12. Acúmulo de mRNA do gene <i>LOXD</i> em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> inoculadas com isolados de espécies do gênero <i>Pythium</i>	55

13. Acúmulo de mRNA do gene <i>PR-1A1</i> em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> inoculadas com isolados de espécies do gênero <i>Pythium</i>	56
14. Acúmulo de mRNA do gene <i>PR-5</i> em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> inoculadas com isolados de espécies do gênero <i>Pythium</i>	57
15. Acúmulo de mRNA do gene <i>EXT</i> em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> inoculadas com isolados de espécies do gênero <i>Pythium</i>	58
16. Acúmulo de mRNA dos genes <i>PR-1A1</i> e <i>PR-5</i> em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> inoculadas com isolado de <i>P. deliense</i>	60

RELAÇÃO DE APÊNDICES

	Página
1. Tabela de análise de variância.....	89
2. Tabela de análise de variância.....	89
3. Tabela de análise de variância.....	89
4. Ciclo limiar, médias, desvio padrão e níveis de acúmulo de mRNA obtidos para <i>ERF1</i> em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> mantidas a 20°C ± 2°C, após a inoculação com isolados de <i>Pythium</i> spp.....	90
5. Ciclo limiar, médias, desvio padrão e níveis de acúmulo de mRNA obtidos para <i>ERF1</i> em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> mantidas a 25°C ± 2°C, após a inoculação (Dai) com isolados de <i>Pythium</i> spp.....	91
6. Ciclo limiar, médias, desvio padrão e níveis de acúmulo de mRNA obtidos para <i>ERF1</i> em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> mantidas a 30°C ± 2°C, após a inoculação com isolados de <i>Pythium</i> spp.....	92
7. Ciclo limiar, médias, desvio padrão e níveis de acúmulo de mRNA obtidos para <i>LOXD</i> em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> mantidas a 20°C ± 2°C, após a inoculação com isolados de <i>Pythium</i> spp.....	93
8. Ciclo limiar, médias, desvio padrão e níveis de acúmulo de mRNA obtidos para <i>LOXD</i> em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> mantidas a 25°C ± 2°C, após a inoculação com isolados de <i>Pythium</i> spp.....	94
9. Ciclo limiar, médias, desvio padrão e níveis de acúmulo de mRNA obtidos para <i>LOXD</i> em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> mantidas a 30°C ± 2°C, após a inoculação com isolados de <i>Pythium</i> spp.....	95
10. Ciclo limiar, médias, desvio padrão e níveis de acúmulo de mRNA obtidos para <i>PR-1A1</i> em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> mantidas a 20°C ± 2°C, após a inoculação com isolados de <i>Pythium</i> spp.....	96
11. Ciclo limiar, médias, desvio padrão e níveis de acúmulo de mRNA obtidos para <i>PR-1A1</i> em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> mantidas a 25°C ± 2°C, após a inoculação com isolados de <i>Pythium</i> spp.....	97

12. Ciclo limiar, médias, desvio padrão e níveis de acúmulo de mRNA obtidos para <i>PR-1A1</i> em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> mantidas a 30°C ± 2°C, após a inoculação com isolados de <i>Pythium</i> spp.....	98
13. Ciclo limiar, médias, desvio padrão e níveis de acúmulo de mRNA obtidos para <i>PR-5</i> em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> mantidas a 30°C ± 2°C, após a inoculação com isolados de <i>Pythium</i> spp.....	99
14. Ciclo limiar, médias, desvio padrão e níveis de acúmulo de mRNA obtidos para <i>PR-5</i> em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> mantidas a 30°C ± 2°C, após a inoculação com isolados de <i>Pythium</i> spp.....	100
15. Ciclo limiar, médias, desvio padrão e níveis de acúmulo de mRNA obtidos para <i>PR-5</i> em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> mantidas a 30°C ± 2°C, após a inoculação com isolados de <i>Pythium</i> spp.....	101
16. Ciclo limiar, médias, desvio padrão e níveis de acúmulo de mRNA obtidos para <i>EXT</i> em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> mantidas a 30°C ± 2°C, após a inoculação com isolados de <i>Pythium</i> spp.....	102
17. Ciclo limiar (Ct), médias, desvio padrão (DP) e níveis de acúmulo de mRNA obtidos para <i>EXT</i> em plântulas de <i>S. lycopersicum</i> mantidas a 30°C ± 2°C, após a inoculação com isolados de <i>Pythium</i> spp.....	103
18. Ciclo limiar, médias, desvio padrão e níveis de acúmulo de mRNA obtidos para <i>EXT</i> em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> mantidas a 30°C ± 2°C, após a inoculação com isolados de <i>Pythium</i> spp.....	104
19. Ciclo limiar, médias, desvio padrão e níveis de acúmulo de mRNA obtidos para <i>PR-1A1</i> em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> inoculadas com isolados de <i>Pythium</i> spp. e submetidas a tratamentos com diferentes compostos.....	105
20. Ciclo limiar, médias, desvio padrão e níveis de acúmulo de mRNA obtidos para <i>PR-5</i> em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> inoculadas com isolados de <i>Pythium</i> spp. e submetidas a tratamentos com diferentes compostos.....	106

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A_{260} ou A_{280} – absorvância em comprimento de onda igual a 260 ou 280 nanômetros

AA – Agar-água

ABA – ácido abscísico

ANOVA – análise de variância

AS – ácido salicílico

AVG – aminoetoxivinilglicina

cDNA - DNA complementar ao mRNA

CM – Corn Meal

Ct – Ciclo limiar

CTAB – brometo de cetiltrimetilamônio

CV – Coeficiente de variação

dNTPs – desoxirribonucleotídeos tri-fosfato

DNA – ácido desoxirribonucléico

DTT – ditioneitol

EDTA – ácido etileno diamino tetracético

ET – etefon

mRNA – RNA mensageiro

MMLV – *Moloney Murine Leukemia Virus*

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

pb – pares de bases

PCR – reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

RNA – ácido ribonucléico

RT – transcritase reversa

RT-PCR - Reação da Transcrição Reversa seguida da PCR

RT-qPCR – RT-PCR quantitativa

SDS - dodecil sulfato de sódio

SOLGENES – *SOL Genomics Network*

TAIR - *Arabidopsis Information Resource*

Taq – DNA polimerase da bactéria *Thermus aquaticus*

Tris – Tris-hidroximetil-aminometano

v:v – volume por volume

x g – força centrífuga relativa à aceleração padrão da gravidade

1. INTRODUÇÃO

A produção de plantas em sistemas protegidos tem crescido nos últimos anos. Esses sistemas de cultivo são vulneráveis a infecções causadas por microrganismos patogênicos, incluindo gêneros que contêm patógenos de solo economicamente importantes, como *Phytophthora* e *Pythium*. Algumas espécies destes gêneros são especialmente bem sucedidas, devido às condições de temperatura e umidade do substrato presentes nesse tipo de sistema, identificados como os dois principais fatores que propiciam infecções causadas por esses patógenos. Além das condições propícias, desde 2004, o Ministério da Agricultura estabeleceu a interrupção do uso de brometo de metila, um biocida aplicado no solo, podendo levar a um aumento na incidência de doenças causadas por patógenos de solo.

O gênero *Pythium* compreende oomicetos cosmopolitas habitantes do solo e que causam doenças em diversas espécies de plantas. Espécies patogênicas deste gênero causam podridões em frutos, raízes e caules e o tombamento pré ou pós-emergência (“damping off”) de sementes e plântulas, sendo responsáveis por grandes reduções na produtividade em uma série de culturas. Métodos culturais, químicos e biológicos são utilizados para o controle de *Pythium* spp. em culturas como tomate, milho, alface, fumo, entre outras. Entretanto, não foi observada a existência de resistência específica contra espécies deste gênero.

Patógenos necrotróficos, no caso *Pythium* spp., secretam uma grande quantidade de enzimas que degradam a parede celular das plantas. Nesse tipo de interação, a existência de plantas resistentes é dificultada, pela ausência de especificidade e a agressividade dessa estratégia de infecção. Ao contrário do que ocorre com a resistência contra patógenos biotróficos, os componentes-chave envolvidos no mecanismo de resistência contra patógenos necrotróficos são ainda pouco conhecidos.

Diferentes espécies do gênero *Pythium* variam quanto à patogenicidade e virulência em diferentes hospedeiros. A compreensão dos mecanismos envolvidos nesta variação de sintomas poderia evidenciar a existência de uma resposta diferenciada das plantas em relação a uma determinada espécie, culminando com a resistência da planta contra o patógeno.

A utilização de técnicas de biologia molecular no estudo da interação entre patógenos necrotróficos e plantas é útil na elucidação das vias de defesa das plantas em resposta à infecção. A técnica de quantificação relativa por PCR em tempo real permite avaliar o acúmulo de RNAs mensageiros (mRNA) específicos, cuja expressão é induzida ou reprimida em resposta à infecção pelo patógeno. Deste modo, esse tipo de análise possibilita a identificação de genes importantes na resposta de plantas contra necrotróficos, essencial para o desenvolvimento de cultivares resistentes.

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a interação entre isolados de diferentes espécies do gênero *Pythium* e plântulas de *Solanum lycopersicum* em relação aos sintomas provocados nas plântulas e ao acúmulo de mRNAs de determinados genes envolvidos em respostas de defesa de plantas contra patógenos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Pythium* sp.

O gênero *Pythium* foi descrito em 1858, por Pringsheim, sendo atualmente composto por mais de 200 espécies de distribuição mundial (CABI Bioscience, 2004). No início do século 20, o isolamento destes microrganismos associados a doenças radiculares evidenciou seu caráter fitopatogênico (Hendrix & Campbell, 1973). O gênero é composto basicamente por microrganismos de habitat terrestre, existindo poucas espécies de ambientes aquáticos.

Esse gênero pertence à família Pythiaceae, ordem Pythiales, classe Oomycetes, filo Oomycota e reino Chromista (CABI Bioscience, 2004). Os membros da classe dos oomicetos eram anteriormente classificados como fungos, devido a características morfológicas similares a esses, como crescimento micelial, formação de apressórios, haustórios e esporos (Birch *et al.*, 2006). No entanto, a presença de celulose na parede celular, de hifas cenocíticas, de micélio vegetativo diplóide e a produção de esporos assexuais flagelados, modificaram a classificação dos oomicetos para o reino Chromista (Hardham, 2007). Recentemente, estudos bioquímicos e moleculares mostraram que o grupo dos oomicetos é mais relacionado a algas pertencentes às classes Phaeophyta e Chrysophyta (Paul *et al.*, 2005).

A reprodução assexuada em *Pythium* sp. ocorre por meio da formação de zoosporângios nas extremidades das hifas. Os zoosporângios, por sua vez, são responsáveis pela formação de vesículas, nas quais ocorre a diferenciação dos zoósporos (Van der Plaats-Niterink, 1981). Os zoósporos são os agentes de dispersão dos oomicetos em meio aquoso, sendo caracterizados pela presença de dois flagelos, um posterior longo e liso, e um anterior curto e com duas fileiras de pêlos (Hardham, 2007). Em condições de alta umidade, os zoósporos são liberados pela desintegração da membrana vesicular e se dispersam no ambiente em busca de um hospedeiro (Van der Plaats-Niterink, 1981). Quando encontram um hospedeiro suscetível, os zoósporos perdem os flagelos, adquirem um formato circular, secretam mucilagem para adesão na superfície do hospedeiro e formam a parede celular, eventos que caracterizam o encistamento (Deacon, 1996). Logo após, o cisto germina, formando hifas em cujas extremidades se encontram os apressórios, os quais serão responsáveis pela penetração no tecido do hospedeiro (Hendrix & Campbell, 1973). No interior do tecido vegetal, as hifas podem crescer inter e intracelularmente e absorver os nutrientes a partir do tecido degradado (Hardham, 2007). Espécies do gênero *Pythium* podem formar também esporos assexuais de sobrevivência, denominados clamidósporos, os quais são formados pelo engrossamento de segmentos de hifas vegetativas (Kucharek & Mitchel, 2000).

A reprodução sexual ocorre por meio da fertilização do oogônio pelo anterídio, resultando na formação do oósporo, o qual é caracterizado pela presença de paredes duplas. Os oósporos são formados no interior do tecido infectado e são as estruturas de sobrevivência do patógeno. Quando as condições ambientais são propícias, e na presença de um hospedeiro suscetível,

o oósporo emite um tubo de germinação ou forma um zoosporângio (Hendrix & Campbell, 1973; van West *et al.*, 2003).

Um dos últimos e mais completos estudos sobre o gênero *Pythium* foi desenvolvido por van der Plaats-Niterink (1981). Neste trabalho, o autor descreve as características morfológicas de 86 isolados de diferentes espécies do gênero *Pythium*, e propõe uma chave para identificação das espécies.

2.1.1 Doenças causadas por *Pythium* spp.

As doenças causadas por *Pythium* spp. vêm se tornando muito comuns no cultivo hidropônico de plantas e na produção de mudas em sistemas protegidos. Espécies fitopatogênicas do gênero *Pythium* podem sobreviver como saprófitas ou parasitas (Hendrix & Campbell, 1973) e possuem um grande número de hospedeiros incluindo grupos de plantas diversos, como poáceas, hortaliças e árvores. Além disso, *P. insidiosum* é o responsável pela pitiose, enfermidade que afeta cavalos, bovinos e cachorros (Cock *et al.*, 1997), podendo também afetar humanos (Bosco *et al.*, 2005). Existem ainda espécies micoparasitas, entre essas estão *P. oligandrum*, *P. acanthicum* e *P. periplocum*, estudadas como agentes de controle biológico (Ali-Shtayeh & Saleh, 1999).

Zoósporos, oósporos e fragmentos de hifa podem atuar como fontes de inóculo, sendo os zoósporos importantes fontes de inóculo e os principais agentes de disseminação do patógeno (Kucharek & Mitchel, 2000). O gênero *Pythium* compreende patógenos primários e secundários, os quais, quando em condições favoráveis, podem se tornar extremamente patogênicos e causar podridões em frutos, raízes e caules e o tombamento pré ou pós-emergência (“damping off”) de sementes e plântulas (Kucharek & Mitchel, 2000). A temperatura e a umidade do

solo constituem os principais fatores que afetam a severidade de doenças causadas por *Pythium* spp. (Hendrix & Campbell, 1973), sendo que cada espécie possui um determinado ótimo de temperatura e umidade (Van der Plaats-Niterink, 1981).

A colonização do tecido do hospedeiro ocorre pela liberação de enzimas pectolíticas e celulolíticas, as quais promovem a desintegração do tecido vegetal. Deste modo, raízes infectadas apresentam podridões moles e encharcadas, normalmente na região do colo. Tecidos jovens e tenros são mais predispostos à infecção pelo patógeno (Van der Plaats-Niterink, 1981). No caso de podridões em plantas adultas, a infecção é restrita a tecidos periféricos ou imaturos (Kamoun *et al.*, 1999), geralmente ocorrendo na extremidade das raízes. À medida que a planta se desenvolve, a lignificação do tecido vegetal dificulta a penetração do patógeno no hospedeiro (Hendrix & Campbell, 1973).

A parte aérea das plantas afetadas apresenta sintomas indiretos, devido ao bloqueio do movimento de água e nutrientes a partir do solo, causados pela podridão radicular. Pode haver amarelecimento das folhas, murchas e diminuição do crescimento. Quanto mais jovem for o hospedeiro no momento da infecção, mais severos serão os sintomas. Plantas que sobrevivem à infecção causada pelo patógeno apresentam diminuição na produção de grãos ou frutos (Hendrix & Campbell, 1973).

2.1.2 Mecanismos de patogênese em *Pythium* sp.

Quando os zoósporos são liberados no ambiente, eles são atraídos por quimiotaxia e eletrotaxia em direção a uma planta hospedeira (Appiah *et al.*, 2005; Hardham, 2007). Os zoósporos são atraídos por moléculas presentes nos

exudatos das raízes, como açúcares, aminoácidos, além de íons cálcio (Donaldson & Deacon, 1993; Deacon, 1996; Islam & Tahara, 2001). Segundo van West *et al.* (2003), esse mecanismo de atração é inespecífico, guiando os zoósporos em direção a plantas hospedeiras ou não.

Por se tratar de um microrganismo necrotrófico, uma vez que a epiderme do hospedeiro foi penetrada, as hifas invadem as células vegetais, adquirindo os nutrientes necessários para a sobrevivência do patógeno a partir das células mortas. Poucas moléculas potencialmente envolvidas na patogenicidade de *Pythium* spp. foram isoladas e caracterizadas até o momento. No entanto, em vista dos efeitos causados pela infecção por *Pythium* spp. em plantas, acredita-se que esses patógenos contenham um arsenal de enzimas que degradam a parede celular vegetal como endocelulases, 1,3- β -glucanases, β -glucosidases, cutinases, galactanases e endopoligalacturonases, as quais atuam na penetração no tecido do hospedeiro e na patogênese (Campion *et al.*, 1997; van West *et al.*, 2003).

A atividade de enzimas hidrolíticas é necessária para ultrapassar a barreira exercida pela parede celular do hospedeiro e permitir a penetração das hifas do patógeno nas células vegetais. Diversos autores já verificaram a presença dessas enzimas em oomicetos causadores de podridão. MacDonald *et al.* (2002) verificaram que a pressão exercida pelas hifas de *P. graminicola* não é suficiente para penetrar nas células da epiderme de gramíneas, sendo essencial a atuação de enzimas que degradam a parede celular. Gotesson *et al.* (2002) encontraram 17 genes que codificam poligalacturonases, enzimas que degradam pectinas, em uma biblioteca genômica de *Phytophthora cinnamomi*, um fitopatógeno também pertencente à família Pythiales. Análises de microscopia conduzidas por Boudjeko *et al.* (2006) sobre a interação entre *P. myriotylum* e *Xanthosoma sagitiifolium*,

indicaram que o patógeno causou desintegração das pectinas da parede celular vegetal, provavelmente através da ação de enzimas hidrolíticas. Além disso, *Campion et al.* (1997) verificaram que três espécies do gênero *Pythium*, *P. sulcatum*, *P. ultimum* e *P. violae*, diferiram em relação as enzimas hidrolíticas produzidas e também na velocidade em que essas enzimas são liberadas. Surpreendentemente, a espécie que apresentou a maior atividade enzimática, *P. sulcatum*, foi a que causou sintomas menos severos em raízes de cenoura (*Campion et al.*, 1997).

Elicitinas são proteínas secretadas em cultura pelas espécies do gênero *Phytophthora* e algumas espécies do gênero *Pythium*. Essas proteínas possuem um papel duplo na interação planta-patógeno, podendo atuar como indutores de respostas de defesa da planta ou como fatores de patogenicidade (Tyler, 2002; Qutob *et al.*, 2006). Veit *et al.* (2001) purificaram uma proteína elicitora de *P. aphanidermatum*, a PaNie₂₃₄. O cDNA correspondente a essa proteína foi isolado e expresso em grandes quantidades em folhas de *A. thaliana*, provocando necrose e formação de calose, sintomas estes também observados em fumo e tomate. Outras elicinas identificadas foram Vex₁ e Vex₂, isoladas de *P. vexans* (Huet *et al.*, 1995), oligandrina, isolada de *P. oligandrum* (Picard *et al.*, 2000), e silvaticina, isolada de *P. sylvaticum* (Lascombe *et al.*, 2007). Recentemente, Kamoun (2006) publicou uma revisão a fim de classificar e catalogar as moléculas efetoras de oomicetos, incluindo as elicinas, com maior ênfase a fitopatógenos pertencentes ao gênero *Phytophthora*.

2.1.3 Controle

2.1.3.1 Controle cultural

O controle de doenças causadas por espécies do gênero *Pythium* envolve, principalmente, medidas para evitar a infecção e o crescimento do patógeno em plantas jovens. Desse modo, recomenda-se a utilização de sementes quimicamente tratadas. Além disso, no caso de cultivo em sistemas protegidos, deve haver boa drenagem do solo e boa circulação de ar entre as plantas (Kucharek & Mitchel, 2000). Chérif *et al.* (1997) demonstraram que a maior aeração da solução nutritiva disponibilizada a plantas de tomate em cultivo hidropônico pode reduzir a colonização das raízes por *Pythium* sp..

Os hospedeiros são mais suscetíveis à infecção por *Pythium* spp. nos estádios iniciais de desenvolvimento (Paulitz & Bélanger, 2001). Deste modo, as sementes devem ser plantadas quando as condições favorecem o rápido crescimento das plantas (Kucharek & Mitchel, 2000).

A rotação de culturas consiste em outro método utilizado para reduzir a população de patógenos de solo. O uso desse procedimento para o controle de *Pythium* spp. nem sempre é eficaz, devido a ampla gama de hospedeiros das espécies patogênicas mais comuns e agressivas desse gênero (Hendrix & Campbell, 1973). Porém, a rotação de culturas pode evitar o aumento do inóculo de determinadas espécies (Kucharek & Mitchel, 2000).

2.1.3.2 Controle químico

Existem poucos fungicidas para controle de *Pythium* sp.. O brometo de metila foi muito utilizado como fumigante de solo para reduzir fontes de inóculo. Entretanto, devido aos efeitos nocivos deste produto à saúde humana e ao ambiente, seu uso foi interrompido em 2004 (Brasil, 2002). Entre os produtos utilizados, pode-se citar o fungicida sistêmico Metalaxil, usado para erradicação

do patógeno no solo, e o fungicida Captan (ingrediente ativo dicarboximida), utilizado no tratamento de sementes e também para pulverização no solo (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2003).

Os zoósporos são a principal fonte de inóculo de *Pythium* sp., portanto medidas que controlem a proliferação dessas estruturas do patógeno são essenciais. Stanghellini & Tomlinson (1987) demonstraram que a adição do surfactante sintético nonil-fenoxi-poli (etilenoxi) etanol (Agral, Syngenta) a uma suspensão de zoósporos de *P. aphanidermatum*, *P. dissotocum*, *P. intermedium*, *P. tracheiphilum* e *Phytophthora nicotianae*, causou a perda da mobilidade e lise da membrana celular dos mesmos. Além disso, foi observado que a adição do surfactante ao meio de cultura não afetou o crescimento micelial dos patógenos (Stanghellini & Tomlinson, 1987), mostrando que o produto atua especificamente sobre os zoósporos. Deste modo, a adição do surfactante na solução nutritiva em cultivos hidropônicos poderia auxiliar na desinfestação da água.

Os surfactantes sintéticos são utilizados em associação com fungicidas, herbicidas e inseticidas para reduzir a tensão superficial da água e facilitar a penetração do produto na planta. Após a observação do efeito de surfactantes nos zoósporos, verificou-se que a habilidade de alguns microorganismos de atuarem como antagonistas pode estar associada à produção de biosurfactantes (Stanghellini & Miller, 1997; Souza *et al.*, 2003).

2.1.3.3 Controle biológico

O controle de *Pythium* spp. com o uso de microrganismos antagonistas ou micoparasitas tem sido amplamente estudado como alternativa ao controle químico. Existem atualmente mais de 80 produtos comerciais utilizados para

controle biológico (Paulitz & Belenger, 2001). Os microrganismos utilizados incluem isolados de *Pseudomonas* spp. (Georgakopoulos *et al.*, 2002; Gravel *et al.*, 2005), *Trichoderma* spp. (Georgakopoulos *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2004), *Lysobacter* sp. (Folman *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2005) e *Burkholderia cepacia* (Heunges & Parke, 2000). Inclusive uma espécie do gênero *Pythium*, *P. oligandrum*, vem sendo estudada no controle de fitopatógenos de solo (Picard *et al.*, 2000).

Os mecanismos utilizados por microrganismos no controle biológico envolvem micoparasitismo (Djonovic *et al.*, 2006), competição por nutrientes (van Dijk & Nelson, 2000) ou produção de antibióticos (O'Sullivan & O'Gara, 1992; Brodhagen *et al.*, 2004), sideróforos (O'Sullivan & O'Gara, 1992), enzimas líticas (Kobayashi *et al.*, 2005) e biosurfactantes (Souza *et al.*, 2003). Além disso, alguns microrganismos são capazes de induzir a resistência em plantas. Picard *et al.* (2000) purificaram uma proteína denominada oligandrina de culturas de *P. oligandrum*. A aplicação da oligandrina a plantas de *S. lycopersicum* impediu a murcha e reduziu o número de lesões no caule das plantas causado por *Phytophthora parasitica*, não tendo efeito sobre o crescimento micelial do patógeno em meio de cultura (Picard *et al.*, 2000).

Contudo, o sucesso de produtos comercializados para controle biológico depende de interações complexas entre a planta, o patógeno, o microrganismo de controle e o ambiente em que eles se encontram (Heunges & Parke, 2000). Em vista desse fato, a transição de resultados do laboratório para o contexto da agricultura nem sempre é bem sucedida (Paulitz & Belanger, 2000).

2.2 Mecanismos de defesa de plantas contra fitopatógenos

2.2.1 Mecanismos de defesa pré-formados

As plantas evoluíram de modo a serem capazes de se defender de diversas situações de estresse, tanto bióticos quanto abióticos. Em geral, as plantas são imunes a maior parte dos microrganismos patogênicos, devido à presença de mecanismos de defesa pré-formados ou passivos, os quais proporcionam proteção não específica contra uma ampla gama de patógenos (Thatcher *et al.*, 2005). Esse tipo de imunidade é baseada nas características estruturais das plantas, na presença de substâncias inibitórias aos patógenos, ou ainda na disponibilidade limitada de nutrientes (Heitefuss, 2001).

Uma série de barreiras estão presentes na superfície do tecido vegetal, sendo um dos seus propósitos impedir a entrada de microrganismos patogênicos. Essas barreiras incluem características físicas da planta como a presença de ceras epicuticulares, a cutina, tricomas e a parede celular. Kobayashi *et al.* (1997), mostraram que os microfilamentos de actina também podem impedir a penetração de patógenos nas plantas. Plantas de cevada (*Hordeum vulgare*), trigo (*Triticum aestivum*), pepino (*Cucumis sativus*) e fumo (*Nicotiana tabacum*) foram submetidas ao tratamento com um inibidor da polimerização da actina, a citocalasina, levando à perda da resistência não-hospedeira contra a entrada de diversos fungos nas plantas (Kobayashi *et al.*, 1997).

Além de barreiras físicas, a infecção por microrganismos patogênicos pode ser impedida pela ação de metabólitos secundários expressos constitutivamente pelas plantas. Esses metabólitos incluem compostos fenólicos, glicosídeos cianogênicos, terpenóides e alcalóides, entre outros (Osbourn, 1996a; Yazaki, 2005). Entre os alcalóides, as saponinas avenacina, presente na aveia (*Avena*

sativa), e α -tomatina, presente no tomate, são exemplos de compostos com atividade antimicrobiana (Osbourn, 1996b).

2.2.2 Mecanismos de defesa induzidos

Caso as barreiras de defesa pré-formadas sejam ultrapassadas pelos patógenos, as plantas induzem diversas respostas adicionais, a fim de suprimir ou limitar o crescimento do patógeno. Uma resposta de defesa bem sucedida depende da rápida ativação de uma série de genes que atuam na produção de compostos antimicrobianos (fitoalexinas) e de espécies de oxigênio reativas, lignificação da parede celular e produção de enzimas que degradam a parede celular do patógeno (van Loon *et al.*, 2006b). A diferença entre suscetibilidade e resistência não necessariamente está ligada às respostas desencadeadas, e sim com a velocidade e a magnitude que são induzidas e por quanto tempo elas são mantidas (Tao *et al.*, 2003).

O tipo de resposta desencadeada pela planta dependerá dos mecanismos e substâncias que o patógeno utiliza durante o ataque. Patógenos biotróficos caracterizam-se por induzirem alterações no metabolismo do hospedeiro para favorecer seu próprio crescimento, sem que haja morte das células vegetais infectadas. Em contraste, patógenos necrotróficos precisam matar as células do hospedeiro para metabolizar seu conteúdo e obter nutrientes (Ferrari *et al.*, 2003). As diferenças nos mecanismos de patogênese entre biotróficos e necrotróficos determinaram a evolução do sistema de defesa, de modo que as plantas desenvolveram mecanismos distintos, porém interligados, de resposta aos diferentes patógenos.

As primeiras respostas induzidas após a percepção do hospedeiro ocorrem no ponto de entrada do patógeno pela deposição de papilas ricas em calose e a lignificação da parede celular, formando uma barreira contra a disseminação do patógeno. Em geral, esses mecanismos são desencadeados tanto contra necrotróficos quanto contra biotróficos (Flors *et al.*, 2005).

2.2.2.1 Defesa contra biotróficos

A defesa contra patógenos biotróficos ocorre através de mecanismos que são componentes da denominada “resistência gene-a-gene”, descrita por Flor (1971). Nesse mecanismo, os produtos dos genes de avirulência (Avr) do patógeno são reconhecidos direta ou indiretamente por respectivos produtos dos genes de resistência (R) do hospedeiro. Esse reconhecimento promove a ativação do produto do gene R, desencadeando uma série de respostas de defesa que incluem a produção de espécies reativas de oxigênio e a resposta de hipersensibilidade (HR). A resistência gene-a-gene associada à HR é o tipo mais estudado de resistência, caracterizando-se pela morte localizada de células vegetais provocando o isolamento do patógeno em um local onde não encontra os nutrientes necessários para sua sobrevivência (Govrin & Levine, 2000; Glazebrook, 2005; Királi *et al.*, 2007). Quando um dos componentes de reconhecimento não está presente ou está inativo, o patógeno não é detectado pelo hospedeiro e este não é capaz de desencadear respostas de defesa (Chisholm *et al.*, 2006).

A resistência gene-a-gene também é chamada de resistência raça-específica, pois só é efetiva contra uma ou poucas raças de patógenos (Király *et al.*, 2007). A resistência baseada em genes R específicos é altamente eficaz no

bloqueio de doenças em muitas espécies. Entretanto, esse tipo de resistência pode ser rapidamente superada pelo surgimento de novas raças do patógeno (Quirino & Bent, 2003).

2.2.2.2 Defesa contra necrotróficos

Patógenos necrotróficos utilizam enzimas hidrolíticas para ultrapassar as barreiras físicas impostas pela planta e colonizar o tecido vegetal. Para desencadear um processo de defesa, a planta deve reconhecer o patógeno por meio da percepção de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por receptores presentes na membrana plasmática do hospedeiro, ou pela detecção de fragmentos da cutícula e da parede celular vegetal (Chisholm *et al.*, 2006; Hüchelhoven, 2007). Os PAMPs são estruturas conservadas da superfície do patógeno, como a flagelina de bactérias e a quitina de fungos, ou proteínas secretadas pelos mesmos, como as elicinas liberadas por espécies do gênero *Phytophthora* (Hüchelhoven, 2007). A detecção do patógeno ativa mecanismos de resistência basal, a qual é também denominada imunidade desencadeada por PAMPs (PTI, Chisholm *et al.*, 2006). Segundo Adie *et al.* (2007b), o reconhecimento de *P. irregulare* e a ativação da defesa em *A. thaliana* pode iniciar por um receptor denominado ERECTA, por sua similaridade estrutural com receptores tipo quinases. Com base em estudos com mutantes de *A. thaliana*, verificou-se que a ação do gene *PEN2*, que codifica uma glicosil hidrolase, é necessária para evitar a penetração de patógenos necrotróficos como *P. irregulare* e *Plectosphaerella cucumerina* (Lipka *et al.*, 2005; Adie *et al.*, 2007b).

Juntamente com a formação de barreiras físicas, ocorre indução da produção de fitoalexinas, compostos de baixo peso molecular sintetizados após o

ataque do patógeno (Hammerschmidt, 1999; Hüchelhoven, 2007). Experimentos *in vitro* revelaram que esses compostos possuem atividade antimicrobiana. Um estudo realizado por Thomma *et al.* (1999), demonstrou que plantas de *A. thaliana* deficientes na produção de camalexina, um tipo de fitoalexina, tornaram-se mais suscetíveis à infecção por *Alternaria brassicicola*, um fungo necrotrófico. Outro fato que confirma o envolvimento de fitoalexinas na defesa contra patógenos consiste na presença em alguns patógenos de moléculas capazes de degradar fitoalexinas do hospedeiro em compostos menos tóxicos. Enkerli *et al.* (1998), transformaram um isolado altamente virulento do fungo *Nectria haematococca* (forma teleomórfica de *Fusarium solani*) com uma construção que interrompeu o gene *MAK1*, o qual codifica uma proteína que degrada a fitoalexina presente no grão-de-bico, levando à diminuição da virulência do isolado.

Em resposta ao ataque de patógenos, as plantas sintetizam proteínas relacionadas à patogênese (PR), cujas funções principais são enfraquecer a parede celular do patógeno e inibir as enzimas hidrolíticas liberadas pelo mesmo (Hüchelhoven, 2007). Existem 17 famílias de proteínas PR, as quais incluem quitinases (PR-3, PR-4, PR-8 e PR-11), glucanases (PR-2), tioninas (PR-13), osmotinas (PR-5) e defensinas (PR-12), entre outras (van Loon *et al.*, 2006b).

Huffaker *et al.* (2006), isolaram um peptídeo elicitor de *A. thaliana*, o qual foi denominado AtPep1. O estudo mostrou que este peptídeo ativa a transcrição de uma defensina responsável pela resistência basal, PDF1.2 (PR-12), a produção de H₂O₂ e a expressão de uma proteína, denominada PROPEP1. Além disso, a superexpressão de PROPEP1 conferiu resistência de *A. thaliana* contra *P. irregulare* (Huffaker *et al.*, 2006). Este estudo apresenta boas perspectivas para a obtenção de resistência genética a patógenos do gênero *Pythium*.

2.2.2.3 Resposta hormonal

Estudos sobre a atuação dos hormônios vegetais como o ácido salicílico, etileno e ácido jasmônico em interações entre plantas e patógenos frequentemente utilizam *A. thaliana* como modelo, devido à existência de diversas coleções de mutantes defectivos em genes específicos. O estudo dessas linhas mutagenizadas auxiliou na compreensão das vias de defesa de plantas tanto a patógenos biotróficos, quanto a necrotróficos, incluindo os genes responsáveis por essas respostas (revisado em Glazebrook, 2005). Em geral, acredita-se que respostas reguladas por etileno e ácido jasmônico são requeridas para indução de respostas de defesa contra patógenos necrotróficos, enquanto que o ácido salicílico atua na defesa contra biotróficos, sendo que essas duas vias são consideradas antagonistas (Glazebrook *et al.*, 2003). Entretanto, quando os estudos foram ampliados para diferentes patossistemas, verificou-se que o papel desempenhado por hormônios vegetais varia de acordo com a interação em questão. Por exemplo, a resistência contra o fungo necrotrófico *Botrytis cinerea* é regulada por ácido salicílico em tomate e por etileno em plantas de fumo (Geraats *et al.*, 2002; Achuo *et al.*, 2004).

O etileno atua em diversos processos fisiológicos e do desenvolvimento em plantas, como a emergência de plântulas, a senescência, o amadurecimento de frutos e abscisão de órgãos (Abeles *et al.*, 1992, citado por van Loon *et al.*, 2006a). Em relação às respostas de defesa, o etileno atua na regulação de processos como a indução de oclusões do xilema e reforço da parede celular, a produção de fitoalexinas e expressão de diferentes classes de genes PR (PR-2, PR-3, PR-4 e PR-12) (Adie *et al.*, 2007a). Geraats *et al.* (2002) demonstraram que plantas de tabaco transgênicas insensíveis ao etileno (Tetr) tornaram-se mais

suscetíveis à infecção causada por *Pythium* spp. do que plantas não transgênicas. Um similar aumento da suscetibilidade foi também observado com outros patógenos necrotróficos, tais como *B. cinerea* e *Cercospora nicotianae*, mas não com os biotróficos *Oidium neolycopersici* e *Peronospora tabacina* (Geraats *et al.*, 2003).

O ácido jasmônico desempenha papel crucial na resposta de plantas a herbivoria (Wasternack *et al.*, 2006), além de atuar em processos como o crescimento radicular, a tuberização, amadurecimento, senescência e desenvolvimento do pólen (Lorenzo & Solano, 2005). A importância do ácido jasmônico em respostas de defesa pode ser verificada pela análise de plantas de *A. thaliana* mutantes insensíveis (*jar1*) ou deficientes (mutante triplo *fad3-2 fad7-2 fad8*) na síntese desse hormônio, as quais se mostraram altamente suscetíveis aos fitopatógenos necrotróficos *P. irregulare* e *P. mastophorum* (Staswick *et al.*, 1998; Vijayan *et al.*, 1998). Plantas mutantes de *A. thaliana* deficientes na síntese de ácido jasmônico foram incapazes de expressar *LOX2*, envolvido na via de síntese desse hormônio, e *PDF1.2*, uma defensina induzida por ácido jasmônico e etileno (Vijayan *et al.*, 1998).

Estudos mostraram que o produto gênico do fator de resposta ao etileno 1 (*ERF1*) atua na resistência contra patógenos necrotróficos, como *B. cinerea*, *Plectosphaerella cucumerina* (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002) e *F. oxysporum* (Berrocal-Lobo e Molina, 2004), em *A. thaliana*. Esse gene expressa um fator de transcrição que conecta as vias de defesa mediadas por etileno e ácido jasmônico, sendo que ambos são necessários para ativação de *ERF1* e para a conseqüente expressão de genes relacionados à defesa contra patógenos (Lorenzo *et al.*, 2003).

O ácido salicílico é tradicionalmente ligado à defesa contra patógenos biotróficos. Entretanto, Adie *et al.* (2007b) verificaram que em *A. thaliana*, apesar do ácido jasmônico ser o principal sinal para a ativação da defesa contra *P. irregulare*, os hormônios vegetais ácido salicílico, etileno e ácido abscísico também contribuem, possivelmente otimizando a resposta contra o patógeno. Análises de expressão gênica demonstraram que o ácido salicílico suprime um grupo de genes regulado por etileno e ácido jasmônico, porém outro grupo de genes necessita das duas vias para sua ativação (Schenk *et al.*, 2000).

O ácido abscísico atua na regulação da abertura dos estômatos e em respostas adaptativas a várias condições ambientais (Mauch-Mani & Mauch, 2005). Asselbergh *et al.* (2007) estudaram a resposta de plantas de tomate mutantes deficientes em ácido abscísico ao patógeno necrotrófico *B. cinerea*. Verificou-se que a deficiência neste hormônio vegetal aumentou a resistência nas plantas mutantes, sendo esse processo associado à produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), mostrando uma regulação negativa da resistência por parte do mesmo. Já, em plantas de *A. thaliana* o ácido abscísico desempenha papéis distintos em resposta a diferentes patógenos necrotróficos. Esse hormônio foi implicado na resistência contra *P. irregulare* e *Alternaria brassicicola*, pois plantas mutantes insensíveis (*abi4-1*) ou deficientes na síntese de ácido abscísico (*aba2-12* e *aao3-2*) mostraram uma maior predisposição à doença causada pelos patógenos. Enquanto que a severidade da doença induzida por *B. cinerea* foi reduzida nas plantas mutantes, quando comparada com plantas tipo selvagem.

Ácido salicílico, etileno, ácido jasmônico e, mais recentemente, ácido abscísico, são os hormônios extensivamente estudados em interações planta-patógeno. O papel de outros hormônios vegetais, como auxinas, giberelinas,

citocininas e brassinosteróides, vem sendo ultimamente estudado mais detalhadamente. Segundo Robert-Seilaniantz *et al.* (2007), possivelmente, auxinas e citocininas atuam na defesa contra necrotróficos, enquanto que giberelinas atuam na defesa contra biotróficos.

2.3 Estratégias de análise de expressão gênica na interação planta-patógeno

Estudos dos mecanismos moleculares envolvidos nas respostas de defesa de plantas contra patógenos tornam-se cada vez mais comuns e são facilitados pela grande quantidade de informações que surgem dos projetos de seqüenciamento de plantas como *A. thaliana*, tomate e arroz. Por muitos anos, os estudos utilizavam métodos de análise não-quantitativos ou semi-quantitativos, como *Northern Blot* e a transcrição reversa acoplada à reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). O avanço das técnicas de biologia molecular permitiu a criação de ferramentas mais sensíveis e robustas. Entre essas ferramentas, a PCR em tempo real vem se mostrando importante no monitoramento do acúmulo de transcritos de genes específicos.

Com a utilização da PCR em tempo real se pode monitorar o incremento no número de moléculas de DNA sintetizadas a cada ciclo da reação. Os produtos amplificados são detectados através do uso de sondas específicas ou de agentes intercalantes fluorescentes, sendo que o agente mais empregado é o fluoróforo “SYBR[®] Green” (Costa, 2004). Na presença de moléculas de fita dupla, como o DNA, esses agentes se intercalam na molécula e passam a emitir fluorescência, de modo que o nível de fluorescência emitida é proporcional a quantidade de produto formado (Klein, 2002). A quantidade de moléculas formadas pode ser descrita de maneira absoluta ou relativa. A quantificação

absoluta é realizada através da comparação com uma curva padrão previamente determinada. Já a quantificação relativa envolve a comparação da amplificação entre duas amostras, uma tratada e outra não tratada (Livak & Schmittgen, 2001).

No contexto de interações planta-patógeno, a PCR em tempo real vem sendo utilizada principalmente para detecção de microrganismos patogênicos, como fungos, vírus, bactérias e oomicetos (Atkins & Clark, 2004; Tomlinson *et al.*, 2007; Weller *et al.*, 2007; Mason *et al.*, 2008). Além disso, essa ferramenta é utilizada para validação de resultados de análises de expressão por microarranjos (Phantee *et al.*, 2007) e para estimar o nível de transcritos de genes de interesse em estudos das respostas de plantas a infecções por patógenos (Yan & Liou, 2005).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e isolados

Todas as análises foram realizadas com a utilização de sementes comerciais de tomate (*Solanum lycopersicum* L., variedade Gaúcho, ISLA). Os cinco isolados do gênero *Pythium* pertencem às seguintes espécies: *P. deliense*, *P. dissotocum*, *P. graminicola*, *P. inflatum* e *P. ultimum*. Os isolados fazem parte da coleção do Laboratório de Fitopatologia Molecular da UFRGS e foram obtidos a partir de plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) com sintomas de amarelecimento foliar e podridão radicular. Os isolados foram mantidos em placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultura CM, composto por 17 g.L⁻¹ de farinha de milho e 15 g.L⁻¹ de agar, acrescido de 100 mg.L⁻¹ do antibiótico ampicilina e 20 mg.L⁻¹ do fungicida Benomyl. As placas foram armazenadas a 4°C.

3.2 Avaliação da patogenicidade dos isolados do patógeno em *S. lycopersicum*

3.2.1 Preparo do inóculo

Para o crescimento dos isolados, um bloco de meio de cultura (5 mm x 5 mm) contendo micélio dos isolados foi removido com auxílio de um bisturi de uma placa de meio CM para uma nova placa de Petri contendo meio de cultura CM, acrescido de ampicilina (100 mg.L⁻¹). As placas foram incubadas durante três dias

no escuro a 28°C. O inóculo foi preparado pela adição de aproximadamente 150 grãos de aveia na superfície da placa. Os grãos foram previamente autoclavados duas vezes a 120°C durante 20 min. As placas foram mantidas no escuro a 28°C por sete dias (informação pessoal, Jeferson M. Dariva).

3.2.2 Crescimento e inoculação das plântulas

Sementes de *S. lycopersicum* foram plantadas em substrato autoclavado duas vezes a 120°C durante 20 min. A semeadura foi realizada em bandejas de isopor com 104 células, colocadas sobre bandejas plásticas. Simultaneamente à semeadura, foi realizada a inoculação com grãos de aveia contendo micélio de um dos isolados das espécies utilizadas. Cada tratamento consistiu de 104 sementes de *S. lycopersicum*, uma por célula, inoculadas com um grão de aveia contendo micélio dos isolados de *P. deliense*, *P. dissotocum*, *P. graminicola*, *P. inflatum* ou *P. ultimum*. Além disso, uma bandeja foi inoculada com grãos de aveia autoclavados e não contendo micélio do patógeno, consistindo no controle do experimento. As bandejas foram mantidas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 14h de luz e temperatura de 30°C ± 2°C e 20°C ± 2°C (EMBRAPA, 2003). O experimento mantido a 30°C foi repetido duas vezes, sendo que o isolado de *P. dissotocum* foi avaliado somente uma vez.

A patogenicidade dos isolados foi avaliada nas plântulas 14 dias após a inoculação, por meio de três critérios: mortalidade (podridão pré-emergência ou tombamento), comprimento da parte aérea e comprimento do sistema radicular. O comprimento da parte aérea foi medido desde a região do colo da raiz até o ápice da primeira folha. O comprimento do sistema radicular foi medido da região do

colo da raiz até a extremidade da raiz principal. Uma amostra de dez plântulas por tratamento foi selecionada aleatoriamente para visualização em microscópio ótico.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com um critério de classificação e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$), com a utilização do programa SAS versão 8.

3.3 Avaliação da severidade da doença em *S. lycopersicum* em função da temperatura e da concentração de zoósporos

3.3.1 Produção de zoósporos

O método de produção de zoósporos foi adaptado de Raftoyannis & Dick (2006). Um bloco (5 mm x 5 mm) de meio de cultura CM contendo micélio dos isolados utilizados foi transferido com auxílio de um bisturi para uma placa de Petri contendo meio de cultura AA, composto por 15 g.L⁻¹ de agar acrescido de ampicilina (100 mg L⁻¹). As placas foram incubadas no escuro a 25°C durante três dias. Após esse período, um bloco deste meio foi transferido para placas de Petri (6 cm de diâmetro) contendo 10 mL de meio de cultura V8, composto por 100 mL.L⁻¹ de suco de vegetais V8 (Campbell), acrescido de 20 g.L⁻¹ de Agar e 100 mg.L⁻¹ de ampicilina. As placas foram incubadas por mais três dias no escuro a 25°C. Em seguida, o meio de cultura contendo micélio do patógeno foi transferido para outra placa de Petri (9 cm de diâmetro) e o meio foi submetido a três lavagens com água destilada estéril. Após a última lavagem, o meio foi submerso em aproximadamente 15 mL de água destilada estéril e mantido sob luz durante 15 min. A placa foi então incubada a 4°C durante sete dias. A quantificação da produção de zoósporos foi realizada com a utilização de câmara de Neubauer em microscópio ótico, com aumento de 400 vezes.

3.3.2 Crescimento das plantas

A assepsia das sementes de *S. lycopersicum* foi realizada em cabine de fluxo laminar horizontal através da imersão das sementes *S. lycopersicum* em etanol 70 % durante 1 min, seguida de 20 min de imersão em hipoclorito de sódio 2,5 % acrescido de Tween-20 0,1 %. Em seguida, as sementes foram lavadas quatro vezes em água destilada estéril (Nogueira *et al.*, 2001)

Após a assepsia, as sementes foram colocadas em placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo aproximadamente 20 ml de meio integral MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 8 g.L⁻¹ de agar e 100 mg.L⁻¹ de ampicilina. O pH da solução foi ajustado previamente à esterilização do meio em 5,8 pela adição de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico, conforme a necessidade. Foram distribuídas 10 sementes por placa, as quais foram mantidas em câmara de crescimento sob temperatura de 26 ± 2°C e fotoperíodo de 14 h de luz (EMBRAPA, 2003).

3.3.3 Inoculação

Para a avaliação da severidade da doença provocada por isolados de diferentes espécies do gênero *Pythium* foram utilizadas plântulas de *S. lycopersicum* com sete dias de crescimento. O experimento foi conduzido em esquema fatorial com 5 espécies do patógeno X 4 concentrações de inóculo X 3 temperaturas, totalizando 60 tratamentos com quatro repetições, em delineamento de parcelas subdivididas. As plântulas foram submetidas a tratamentos com uma das seguintes concentrações de inóculo: 10⁴, 10⁵, 10⁶ ou 10⁷ zoósporos.mL⁻¹. Foram utilizados os cinco isolados de espécies do gênero *Pythium* citados anteriormente e os zoósporos de cada um dos isolados foram

suspensos em água destilada estéril. Cada placa contendo plântulas de *S. lycopersicum* recebeu 2 mL da suspensão de zoósporos ou 2 mL de água destilada estéril, no caso dos controles. Após, as placas foram incubadas nas temperaturas de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ou $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 14h de luz. Cada tratamento foi formado por uma placa de Petri contendo 10 plântulas, de modo que, ao final, foram avaliadas 40 plântulas por tratamento.

A severidade da doença foi avaliada por meio de uma escala de sintomas, como ilustrado na Tabela 1. Os sintomas foram analisados no período compreendido entre dois a cinco dias após a inoculação.

Para posterior análise de expressão gênica, plântulas que receberam o tratamento composto por inóculo na concentração de 10^6 zoósporos.mL⁻¹ e plântulas controle, nas três temperaturas testadas e dois e cinco dias após a inoculação foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer a -70°C até o momento da extração de RNA total.

Tabela 1. Escala de severidade de sintomas causados pela inoculação com isolados de diferentes espécies do gênero *Pythium* em plântulas de *Solanum lycopersicum*. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2007.

Grau de severidade	Sintomas morfológicos
0	Sem sintomas aparentes
1	Raras lesões isoladas
2	Lesões ≤ 1 mm
3	Lesões > 1 mm e ≤ 2 mm
4	Lesões > 2 mm e ≤ 3 mm
5	Lesões > 3 mm e ≤ 4 mm
6	Lesões > 4 mm e ≤ 5 mm
7	Lesões > 5 mm

Os resultados de cada repetição foram agrupados para a realização da análise estatística. Os dados foram submetidos ao teste de ANOVA, seguido do

teste t para comparação das médias ($\alpha = 0,05$), com a utilização do programa SAS versão 8.

3.4 Avaliação da incidência de doença na presença de hormônios vegetais, indutores de crescimento ou inibidores de hormônios

3.4.1 Produção de zoósporos e crescimento das plantas

Os zoósporos foram obtidos conforme item 3.3.1. A assepsia e semeadura das sementes de *S. lycopersicum* foram realizadas como descrito no item 3.3.2.

3.4.2 Inoculação e tratamentos

A incidência da doença foi avaliada em plântulas de *S. lycopersicum* com seis dias de crescimento. As plântulas foram submetidas a tratamentos com dois hormônios vegetais, ácido abscísico (ABA, Gibco BRL) e **ácido salicílico (AS)**, o regulador de crescimento vegetal etefon (24%, princípio ativo do produto Ethrel[®], Bayer) ou com o composto aminoetoxivinilglicina (AVG) (15%, princípio ativo do produto Retain, Sumimoto Chemical). Os tratamentos consistiram na inoculação das plântulas com zoósporos de *P. deliense*, *P. inflatum* e *P. ultimum*, em concentração de 10^6 zoósporos.mL⁻¹, seguido da aplicação de um dos seguintes compostos: ABA (100 μ M, Asselbergh *et al.*, 2007), AS (4 mM, Díaz *et al.*, 2002), etefon (ET, 7mM, Sivasankar *et al.*, 2000), ou AVG (1 mM, Sivasankar *et al.*, 2000). Cada placa recebeu 2 mL da suspensão contendo zoósporos e um dos compostos utilizados para os tratamentos. Os controles consistiram de plântulas inoculadas e não submetidas aos tratamentos, e plântulas submetidas aos tratamentos, mas não inoculadas, além de plântulas não inoculadas e não tratadas, nas quais foram aplicados 2 mL de água destilada e esterilizada. As

placas foram mantidas em câmara de crescimento a $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 14 h de luz durante três dias. Cada tratamento consistiu de uma placa de Petri contendo 10 plântulas, com três repetições, de modo que foram avaliadas 30 plântulas por tratamento.

A avaliação foi realizada por meio de contagem do número de plantas com sintomas de necrose em cada placa. Para posterior análise de expressão, oito plântulas por tratamento foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -70°C até o momento da extração de RNA.

Os resultados das repetições foram agrupados para realização da análise estatística. Os dados foram submetidos ao teste de ANOVA com um critério de classificação e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$), com a utilização do programa SAS versão 8.

3.5 Avaliação da severidade da doença em *S. lycopersicum* na presença de um surfactante sintético

3.5.1 Produção de zoósporos e crescimento das plântulas

Os zoósporos foram obtidos conforme item 3.3.1. A assepsia e semeadura das sementes de *S. lycopersicum* foram realizadas como descrito no item 3.3.2.

3.5.2 Inoculação

Para avaliação do efeito da adição do surfactante nonil-fenoxi-poli(etilenoxi) etanol (Agral[®], Syngenta) nos sintomas causados por diferentes isolados de espécies do gênero *Pythium*, foram utilizadas plântulas de *S. lycopersicum* com sete dias de crescimento. Os tratamentos consistiram na inoculação das plântulas com zoósporos de *P. deliense*, *P. graminicola* e *P.*

dissotocum em concentração de 10^6 zoósporos.mL⁻¹ com a adição do surfactante nas concentrações de 0,03 mL.L⁻¹ ou 0,3 mL.L⁻¹. Foram realizadas três repetições, totalizando 30 plântulas por tratamento. Os zoósporos e o surfactante foram diluídos em água destilada estéril e 2 mL desta suspensão foram aplicados em cada placa contendo plântulas de *S. lycopersicum*. As placas foram mantidas por cinco dias a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 14h de luz.

As plântulas inoculadas foram analisadas por meio de uma escala de sintomas, como ilustrado na Tabela 1. Os sintomas foram avaliados dois e cinco dias após a inoculação.

Os resultados das repetições foram agrupados para realização da análise estatística. Os dados foram submetidos ao teste de ANOVA com um critério de classificação e as médias foram comparadas pelo teste de Fisher ($\alpha = 0,05$), com a utilização do programa SAS versão 8.

3.6 Extração de RNA total e isolamento de mRNA

O RNA total foi extraído conforme Bugos *et al.* (1995). As plântulas (8 a 10) foram trituradas utilizando nitrogênio líquido. Foram acrescentados 400 μL de tampão de extração de RNA [100 mM de Tris-HCl (pH 9,0); 200 mM de NaCl; 15 mM de EDTA; e 0,5 % de SDS], 2,3 μL de 2-mercaptoetanol, 400 μL de fenol e 80 μL de uma mistura de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v:v). Após a homogeneização em um agitador tipo vórtex por 2 min, foram acrescentados 28 μL de acetato de sódio 3 M (pH 5,2). Nova agitação vigorosa foi realizada por 1 min, seguida de uma incubação no gelo por 15 min. Posteriormente, foi realizada centrifugação a $16.000 \times g$ por 10 min a 4°C . Ao líquido sobrenadante foram acrescentados 400 μL de fenol e 80 μL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1,

v:v), seguida de agitação vigorosa por 2 min e centrifugação a 16.000 x *g* por 5 min a 4°C. Esse procedimento foi repetido com o líquido sobrenadante obtido após a centrifugação. Após as extrações, os ácidos nucleicos foram precipitados através da adição de 500 µL de isopropanol e da incubação por aproximadamente 1 h a - 20°C e, em seguida, centrifugados a 10.000 x *g* por 10 min a 4°C. O líquido sobrenadante foi descartado e foram adicionados 500 µL de etanol 70 % ao precipitado, seguido de centrifugação a 10.000 x *g* por 5 min a 4°C. Novamente o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco à temperatura ambiente. Após, o precipitado foi ressuspensionado em 82,5 µL de água ultra pura (Milli-Q) e incubado à temperatura ambiente por 10 min. A precipitação seletiva de RNA foi realizada com a adição de 37,5 µL de cloreto de lítio 8 M e da incubação no gelo durante 3 h, seguida de centrifugação a 10.000 x *g* por 10 min a 4°C. O líquido sobrenadante contendo o DNA foi retirado e a lavagem do precipitado foi realizada com 500 µL de etanol 70 % seguida de centrifugação a 10.000 x *g* por 5 min a 4°C. Esse último procedimento foi repetido mais uma vez. O precipitado permaneceu em temperatura ambiente até secar e foi ressuspensionado em 50 µL de água ultra pura. O RNA foi incubado por 10 min à temperatura ambiente antes de ser armazenado à - 20°C.

A concentração de RNA total foi estimada através da leitura em espectrofotômetro (BioRad) pela absorbância a 260 nm (A_{260}), utilizando como padrão 1 ($A_{260}= 1$ equivale a uma concentração de 40 µg.mL⁻¹ de RNA). A qualidade do RNA extraído foi avaliada por espectrofotometria pela relação OD260/280 nm e por eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) a 1 %, contendo tampão TBE [90 mM de Tris-HCl (pH 8,3); 90 mM de H₃BO₃ e 2 mM de EDTA]. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg.mL⁻¹), fotografado e analisado

através do sistema de fotodocumentação computadorizado de análise de gel (Kodak Digital Science 1D-EDAS 120).

Os mRNAs das amostras foram obtidos utilizando o RNA total extraído e o sistema “PolyAtract® mRNA Isolation System III” (Promega), seguindo as instruções do fabricante.

3.7 Síntese de cDNA

Para a síntese do cDNA, os mRNAs foram submetidos à reação da transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), conforme descrito por Murphy & Taiz (1995). O mRNA das plantas (1 µg) foi transcrito reversamente (RT) adicionando primeiro 0,4 µM do oligonucleotídeo iniciador Oligo1 (5' – AAGCTTTTTTTTTTTT – 3') e água ultra pura até completar o volume de 25 µL. A reação foi incubada por 2 min a 70 °C. Posteriormente, a reação foi constituída de 0,5 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP e dGTP, Invitrogen); 50 mM de Tris HCl (pH 8,3); 75 mM de KCl; 3 mM MgCl₂; 1 mM de DTT (ditiotreitól); 200 U da enzima de transcrição reversa (MMLV-RT) (Amersham Biosciences) e água ultra pura até completar o volume de 50 µL. A reação foi incubada por 2 h a 37 °C.

3.8 Seleção *in silico* de genes envolvidos em respostas de defesa

Foram realizadas buscas em bases de dados como NCBI (National Center for Biotechnology Information), TAIR (Arabidopsis Information Resource) e Solgenes (SOL Genomics Network). Após a seleção dos genes, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores com o auxílio do software Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000). Foram sintetizados oligonucleotídeos iniciadores,

cujas seqüências encontram-se descritas na Tabela 2. Os oligonucleotídeos Gapdh – 2R, Ext – F e Ext – R, Cel1 – F e Cel1 – R e ERF1 – F e ERF1 – R foram baseados nas seqüências NM113576, Z46674, U13054 e AY077626, respectivamente, depositadas no banco de genes do NCBI. Já, os oligonucleotídeos Gapdh – F (Shih *et al.*, 1992), PR1 – F e R, PR5 – F e R (Asselberg *et al.*, 2007) e LoxD – F e R (Flors *et al.*, 2007) foram baseados nos respectivos artigos científicos.

3.9 Análise do acúmulo de mRNA por RT-qPCR

O método escolhido para avaliar a expressão gênica em *S. lycopersicum* foi de quantificação relativa por RT-PCR em tempo real (RT-qPCR). Foi utilizado o sistema “*Platinum® qPCR SuperMixes*” (Invitrogen) e as amplificações foram realizadas em um termociclador “*Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System*”. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram citados na Tabela 2, sendo que o gene constitutivo que codifica para gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (Gapdh, Shih *et al.*, 1992) foi utilizado como controle endógeno.

As reações foram realizadas em triplicatas. O volume final de reação foi de 12 µL: 6 µL de “*Platinum® qPCR SuperMixes*”, o qual contém o fluoróforo SYBR[®] Green, a enzima DNA Polimerase *AmpliTaq Gold*[®], dNTPs, fluoróforo para referência passiva ROX e outros componentes do tampão formulados pelo fabricante (Invitrogen); 5 µL de cDNA diluído 100 X; e 0,12 µL (concentração final de 200 nM) de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores (direto e reverso). As amplificações foram realizadas em uma placa ótica de polipropileno com capacidade para 96 amostras (Applied Biosystems). As condições de amplificação compreenderam uma desnaturação inicial e ativação da DNA polimerase de 95 °C

por 10 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s e pareamento a 60 °C por 1 min. Ao final da reação, foi adicionada uma etapa de dissociação, na qual os produtos de amplificação de cada par oligonucleotídeos iniciadores foram submetidos a temperaturas de 60 a 95°C.

Tabela 2. Números de acesso no NCBI, seqüências, tamanho dos produtos e temperaturas de dissociação (T_m) dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2007.

Nome	N° de acesso	Seqüência (5' – 3')	Produto (pb)	T _m (°C)
Gapdh – F	M64114	GAAATGCATCTTGCCTACCAACTGTCTTGC	273	84,2
Gapdh – 2R		CCCGTTGAGTTTTCTTTGA		
PR1 – F	X71592.1	GGACGATGGTCTAGCAGCCTATG	134	83,3
PR1 – R		CAGCACCAGCAGCGTTTAGC		
PR5 – F	AJ277064	TTGTGGTGGAGTCCTGGATTGC	188	80,4
PR5 – R		TGGCTGTGCATTGAATTGGATGAC		
ERF1 – F	AY077626	GGGGTGA CTTGCCGTTAAAA	172	81,6
ERF1 – R		GTCGGCGGAGAAACAGAAGT		
Ext – F	Z46674	CCCTCACCAACACCATACCA	188	82,3
Ext – R		TGGAAAATGCCTTTCTTTTCAGC		
Cel1 – F	U13054	GTTTGCTGGAGCCCAA ACTT	237	78,0
Cel1 – R		CCAGCTGCCTCAAGGACTTT		
LoxD – F	U37840	GGCTTGCTTTACTCCTGGTC	72	81,6
LoxD – R		AAATCAAAGCGCCAGTTCTT		

O ciclo limiar (C_t) de cada amostra foi verificado por meio da média das triplicatas técnicas das amostras (repetições de um mesmo cDNA sintetizado). A quantidade de transcritos foi normalizada em relação ao gene endógeno de acordo com a função: $\Delta C_t = C_t$ (gene de interesse) - C_t (controle endógeno). Para comparar os níveis de expressão entre plântulas tratadas e não tratadas foi utilizada a seguinte função: $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ (gene de interesse) - ΔC_t (calibrador). O

calibrador utilizado foi o cDNA de plântulas controle, que receberam somente água destilada estéril. Finalmente, a abundância de transcritos de cada gene de interesse foi determinada por meio da fórmula: $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

Os resultados foram analisados por meio do teste ANOVA a um critério de classificação. As médias das amostras foram comparadas utilizando-se o programa SAS versão 8, por meio do teste de separação de médias de Fisher ($\alpha = 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização biológica

Inicialmente, cinco espécies do gênero *Pythium* isoladas de plantas de fumo foram testadas quanto à patogenicidade em plântulas de tomate, na temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Após 14 dias, três parâmetros foram avaliados: mortalidade (incidência de podridão pré-emergência e tombamento), comprimento da parte aérea e comprimento do sistema radicular. Os resultados da primeira e da segunda repetições do experimento podem ser observados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. Em análises de microscopia ótica foi possível verificar que os isolados das cinco espécies causaram infecção nas plântulas de *S. lycopersicum*, pela presença de estruturas do patógeno como micélio, oósporos e apressórios (Figura 1).

Tabela 3. Mortalidade, comprimento da parte aérea e comprimento radicular de plântulas de *S. lycopersicum* inoculadas com quatro isolados de espécies do gênero *Pythium*. As plântulas foram mantidas a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 14 dias. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.

	Mortalidade (%)	Comprimento da parte aérea (cm)	Comprimento radicular (cm)
		Média ^a ± DP	Média ^a ± DP
Controle	1 d	12,02 ± 1,88 a	14,40 ± 4,70 ab
<i>P. deliense</i>	35 b	9,93 ± 2,52 b	12,68 ± 5,35 b
<i>P. graminicola</i>	18 c	8,68 ± 2,14 c	14,57 ± 6,07 ab
<i>P. inflatum</i>	8 d	9,65 ± 2,65 b	13,64 ± 4,91 b
<i>P. ultimum</i>	60 a	10,36 ± 2,18 b	15,67 ± 5,51 a
p	0,0001	0,0001	0,0408
CV		22%	38%

^a Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si de acordo com teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 4. Mortalidade, comprimento da parte aérea e comprimento radicular de plântulas de *Solanum lycopersicum* inoculadas com cinco isolados de espécies do gênero *Pythium*. As plântulas foram mantidas a 30°C ± 2°C por 14 dias. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.

	Mortalidade (%)	Comprimento da parte aérea (cm)	Comprimento radicular (cm)
		Média ^a ± DP	Média ^a ± DP
Controle	3 c	8,58 ± 1,58 a	7,98 ± 3,03 a
<i>P. deliense</i>	7 bc	7,71 ± 1,27 b	8,06 ± 3,05 a
<i>P. dissotocum</i>	62 a	7,15 ± 3,79 bc	5,91 ± 4,17 b
<i>P. graminicola</i>	18 b	6,89 ± 1,45 c	6,57 ± 2,51 b
<i>P. inflatum</i>	10 bc	5,90 ± 1,76 d	7,15 ± 3,07 ab
<i>P. ultimum</i>	67 a	8,32 ± 2,28 ab	7,35 ± 3,76 ab
p	0,0001	0,0001	0,0001
CV		25%	42%

^a Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si de acordo com teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

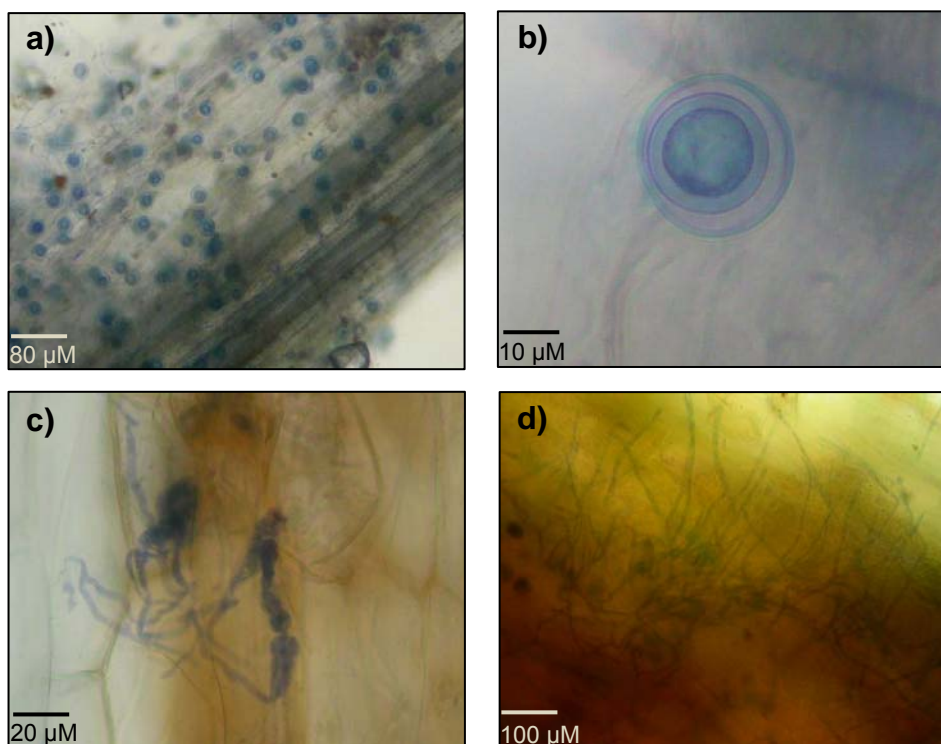


Figura 1. Estruturas observadas em plântulas de *Solanum lycopersicum* inoculadas com isolados de diferentes espécies do gênero *Pythium*. Os tecidos foram corados com azul de trypan e visualizados em microscópio ótico. a) Oósporos de *P. deliense* visualizados no tecido radicular; b) Detalhe de oósporo de *P. deliense*; c) Apressório de *P. deliense*; d) Micélio de *P. ultimum* em tecido radicular necrosado. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.

A inoculação com os isolados de *P. ultimum* (67%) e *P. dissotocum* (62%) provocou o maior percentual de mortalidade (segunda repetição), visualizada na forma de podridão pré-emergência e tombamento (Figura 2), diferindo significativamente do controle não inoculado e da inoculação com os outros isolados ($p < 0,0001$). Uma variação foi observada nos resultados de mortalidade provocada por *P. deliense* nas duas repetições, com 35% de tombamento na primeira repetição e 7% na segunda repetição. A incidência da doença em plântulas inoculadas com *P. inflatum* foi de 8%, na primeira repetição, e 10% na segunda repetição, não diferindo do controle não inoculado em ambos os casos ($p > 0,05$). O isolado de *P. graminicola* provocou um nível intermediário de mortalidade, de aproximadamente 18%, nas duas repetições (Tabelas 3 e 4).

Quando foi verificado o comprimento da parte aérea das plântulas emergidas, observou-se que todos os isolados provocaram uma redução significativa no crescimento ($p \leq 0,0001$, Tabelas 3 e 4). É importante destacar que os isolados que provocaram um nível baixo ou intermediário de tombamento foram aqueles que promoveram as maiores reduções no crescimento da parte aérea das plântulas. A inoculação com *P. inflatum* resultou em plântulas com 9,65 cm (primeira repetição) e 5,90 cm (segunda repetição) e *P. graminicola* com 8,98 cm (primeira repetição) e 6,89 cm (segunda repetição). Em relação ao comprimento do sistema radicular, nenhum isolado diferiu significativamente do controle na primeira repetição, e *P. dissotocum* (5,91 cm, $p = 0,0004$) e *P. graminicola* (6,57 cm, $p = 0,0023$) diferiram do controle (7,98 cm) na segunda repetição, mostrando que este parâmetro não foi conclusivo para verificar diferenças entre os isolados.

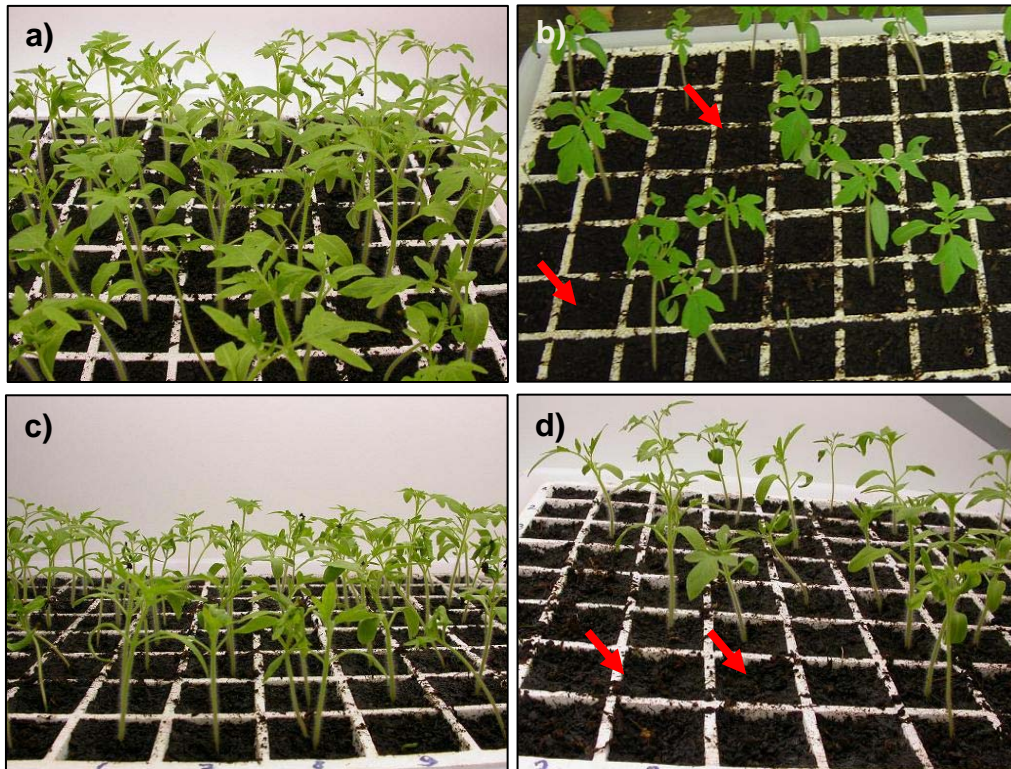


Figura 2. Plântulas de *Solanum lycopersicum* com 14 dias, inoculadas com diferentes isolados do gênero *Pythium*. a) Controle não inoculado; b) inoculação com *P. dissotocum*; c) inoculação com *P. inflatum*; d) inoculação com *P. ultimum*. As setas vermelhas indicam alguns locais de podridão pré-emergência. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.

O teste de patogenicidade foi também realizado na temperatura de 20°C desde o momento da semeadura, a qual foi realizada simultaneamente com a inoculação. Neste caso, foi avaliada somente a incidência de doença (mortalidade). A incidência na inoculação com o isolado de *P. ultimum* foi extremamente alta nesta temperatura, ocorrendo 93% de mortalidade. Do mesmo modo, a doença causada pelos isolados de *P. graminicola* e *P. inflatum* foi favorecida pela baixa temperatura, com 50% e 40% de mortalidade, respectivamente. Entretanto, verificou-se que a baixa temperatura desfavoreceu o isolado de *P. dissotocum*, pois a mortalidade (19%, Tabela 5) causada pelo mesmo foi menor do que na temperatura de 30°C (62%).

Tabela 5. Mortalidade de plântulas de *Solanum lycopersicum* inoculadas com cinco isolados de espécies do gênero *Pythium*. As plântulas foram mantidas a 20°C ± 2° C por 14 dias. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.

Espécie	Mortalidade ^a (%)
Controle	6 d
<i>P. deliense</i>	26 c
<i>P. dissotocum</i>	19 cd
<i>P. graminicola</i>	50 b
<i>P. inflatum</i>	40 bc
<i>P. ultimum</i>	93 a

p<0,0001

^a Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05).

A fim de detalhar a caracterização das diferenças existentes na severidade da doença provocada pelos isolados avaliados, experimentos foram realizados para verificar o efeito da temperatura, concentração de inóculo e do tempo de incubação, nos sintomas provocados em *S. lycopersicum*. Foram utilizados zoósporos dos isolados de *Pythium* spp., possibilitando o tratamento das plântulas com uma concentração conhecida de inóculo. Além disso, o experimento foi realizado em um sistema axênico, placas contendo meio de cultura, evitando a interferência de outros microrganismos.

Verificou-se que houve interação da concentração de inóculo com os isolados utilizados nas três temperaturas avaliadas (p<0,05, Figura 3). A severidade da doença em plântulas inoculadas com *P. ultimum* foi diretamente proporcional ao aumento da concentração de zoósporos nas três temperaturas avaliadas. Por exemplo, a 25°C, plântulas que receberam 10⁴ zoósporos.mL⁻¹ apresentaram um índice de sintomas de 0,93. Esse valor aumentou para 2,48 em plântulas que receberam 10⁵ zoósporos.mL⁻¹, 4,85 em plântulas que receberam 10⁶ zoósporos.mL⁻¹, chegando a 6,65 quando as plântulas foram inoculadas com 10⁷ zoósporos.mL⁻¹ (Figura 3b e Tabela 7). Nas interações envolvendo outros

isolados do gênero *Pythium* foram observadas variações em relação à concentração ótima para cada isolado, aparentemente havendo menor dependência da concentração de inóculo na severidade da doença (Tabelas 6, 7 e 8 e Figura 3).

Tabela 6. Comparação entre médias dos sintomas observados em plântulas de *Solanum lycopersicum* cinco dias após a inoculação com quatro concentrações de zoósporos de diferentes isolados de espécies do gênero *Pythium*. As plântulas foram mantidas nas temperaturas de 20°C ± 2°C. Cada valor é a média^a ± desvio padrão do índice na escala de sintomas de 40 plântulas. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2007.

Espécie	Concentração (zoósporos.mL ⁻¹)			
	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
Controle	0,00 ± 0,00 bA	0,00 ± 0,00 bA	0,00 ± 0,00 bA	0,00 ± 0,00 dA
<i>P. deliense</i>	3,43 ± 0,91 aA	5,00 ± 0,59 aA	4,98 ± 1,21 aA	4,20 ± 0,63 bA
<i>P. dissotocum</i>	3,13 ± 0,15 aA	3,96 ± 1,00 aA	4,10 ± 0,59 aA	3,38 ± 0,56 bcA
<i>P. graminicola</i>	4,35 ± 2,19 aA	4,65 ± 2,74 aA	4,38 ± 0,78 aA	4,90 ± 2,05 abA
<i>P. inflatum</i>	0,68 ± 0,17 bA	0,68 ± 0,39 bA	1,53 ± 1,16 bA	1,73 ± 1,40 cdA
<i>P. ultimum</i>	1,40 ± 1,01 bC	3,33 ± 3,27 aB	5,68 ± 2,21 aA	6,33 ± 0,57 aA

^a Médias seguidas da mesma letra minúscula (coluna) ou maiúscula (linha) não diferem entre si pelo teste t (p≤0,05).

Tabela 7. Comparação entre médias dos sintomas observados em plântulas de *Solanum lycopersicum* cinco dias após a inoculação com quatro concentrações de zoósporos de diferentes isolados de espécies do gênero *Pythium*. As plântulas foram mantidas nas temperaturas de 25°C ± 2°C. Cada valor é a média^a ± desvio padrão do índice na escala de sintomas de 40 plântulas. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2007.

Espécie	Concentração (zoósporos.mL ⁻¹)			
	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
Controle	0,00 ± 0,00 cA	0,00 ± 0,00 dA	0,00 ± 0,00 cA	0,00 ± 0,00 cA
<i>P. deliense</i>	3,18 ± 0,90 bB	5,18 ± 0,62 aA	4,58 ± 0,48 aAB	3,90 ± 0,56 bAB
<i>P. dissotocum</i>	2,65 ± 1,25 bA	4,00 ± 1,20 abA	3,88 ± 0,17 aA	3,65 ± 0,26 bA
<i>P. graminicola</i>	4,95 ± 0,99 aA	4,05 ± 1,16 abA	4,38 ± 1,62 aA	5,20 ± 0,91 abA
<i>P. inflatum</i>	0,90 ± 0,08 cB	0,93 ± 0,69 cdB	2,15 ± 2,70 bA	2,85 ± 2,01 bA
<i>P. ultimum</i>	0,93 ± 0,99 cC	2,48 ± 2,57 bcC	4,85 ± 2,54 aB	6,65 ± 0,40 aA

^a Médias seguidas da mesma letra minúscula (coluna) ou maiúscula (linha) não diferem entre si pelo teste t (p≤0,05).

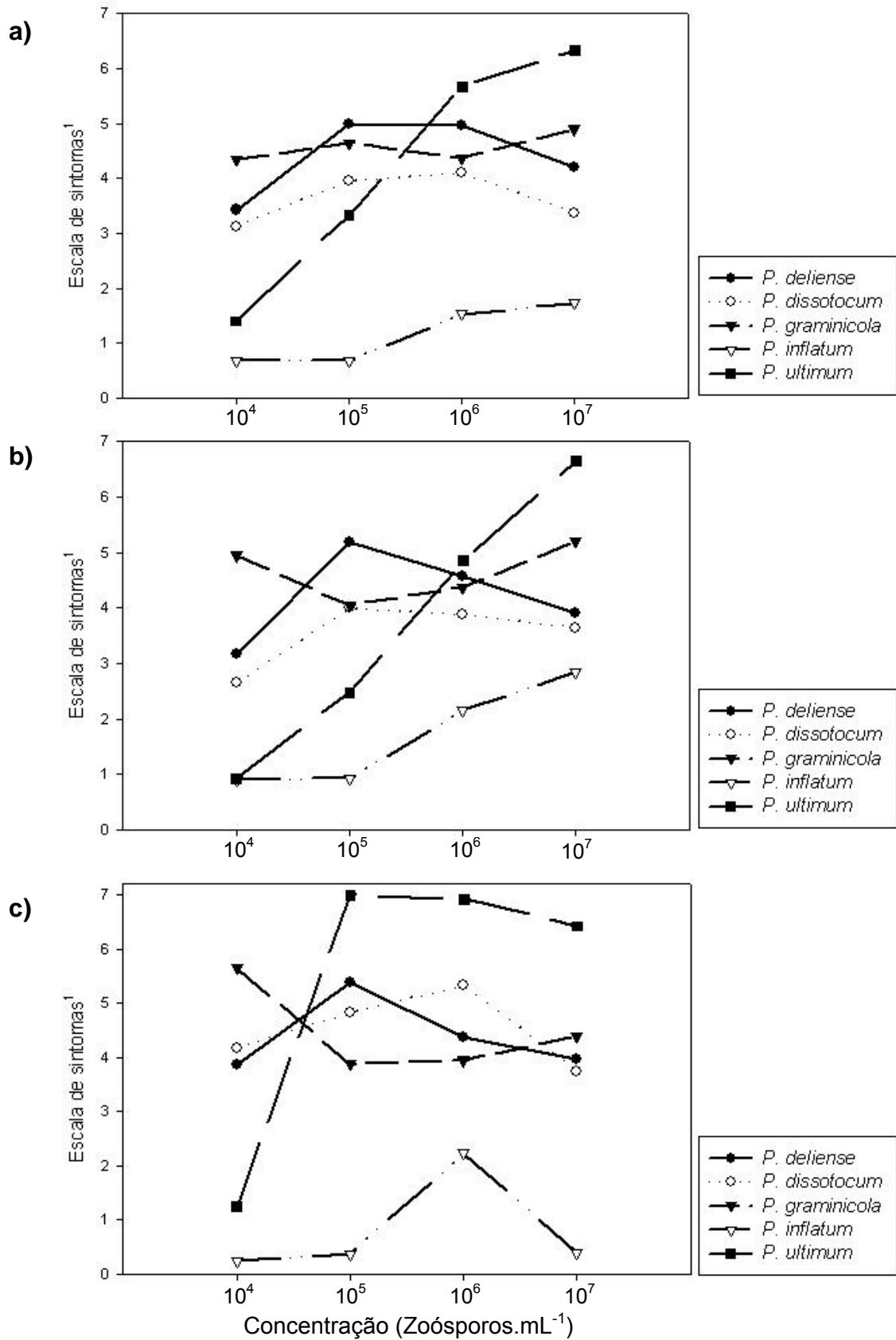


Figura 3. Progressão da doença em plântulas de *Solanum lycopersicum* cinco dias após a inoculação com quatro concentrações de zoósporos de diferentes isolados de espécies do gênero *Pythium*. As plântulas foram mantidas nas temperaturas de 20°C ± 2°C (a), 25°C ± 2°C (b) e 30°C ± 2°C (c). ¹ 0 = sem sintomas aparentes; 7 = lesões > 5 mm. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2007.

Tabela 8. Comparação entre médias dos sintomas observados em plântulas de *Solanum lycopersicum* cinco dias após a inoculação com quatro concentrações de zoósporos de diferentes isolados de espécies do gênero *Pythium*. As plântulas foram mantidas nas temperaturas de 30°C ± 2°C. Cada valor é a média^a ± desvio padrão do índice na escala de sintomas de 40 plântulas. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2007.

Espécie	Concentração (zoósporos.mL ⁻¹)			
	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
Controle	0,00 ± 0,00 cA	0,00 ± 0,00 dA	0,00 ± 0,00 dA	0,00 ± 0,00 cA
<i>P. deliense</i>	3,88 ± 0,98 bC	5,38 ± 1,03 bA	4,38 ± 0,85 bB	3,98 ± 0,46 bBC
<i>P. dissotocum</i>	4,18 ± 0,88 bAB	4,83 ± 0,85 bcAB	5,33 ± 0,83 abA	3,75 ± 0,86 bB
<i>P. graminicola</i>	5,65 ± 1,90 aA	3,88 ± 1,41 cB	3,95 ± 1,22 bB	4,40 ± 1,66 bAB
<i>P. inflatum</i>	0,25 ± 0,31 cB	0,38 ± 0,05 dB	2,23 ± 2,81 cA	0,40 ± 0,29 cB
<i>P. ultimum</i>	1,25 ± 0,24 cB	7,00 ± 0,00 aA	6,93 ± 0,15 aA	6,43 ± 0,39 aA

^a Médias seguidas da mesma letra minúscula (coluna) ou maiúscula (linha) não diferem entre si pelo teste t (p≤0,05).

Sob baixa concentração de inóculo (10⁴ zoósporos.mL⁻¹), foi possível observar a formação de três grupos distintos de isolados quanto aos sintomas causados nas três temperaturas (Figura 3). O primeiro grupo foi formado pelos isolados que provocaram a baixa severidade, *P. inflatum* e *P. ultimum*. O grupo intermediário foi formado por *P. deliense* e *P. dissotocum*. Por fim, o isolado de *P. graminicola* causou a maior severidade da doença, em geral diferindo significativamente dos outros isolados, independente da temperatura e do tempo de incubação (Tabelas 6 a 8). Entretanto, com o aumento da concentração de inóculo, a diferença na severidade da doença provocada por *P. graminicola* em relação aos outros isolados deixa de ser observada. Isso pode ser verificado quando as plântulas foram inoculadas com 10⁷ zoósporos.mL⁻¹ e mantidas a 30°C (Tabela 8). Cinco dias após a inoculação, o índice médio das lesões provocadas pelo isolado de *P. graminicola* (4,40) foi estatisticamente igual ao causado por *P. deliense* (3,98) e *P. dissotocum* (3,75), sendo ultrapassado pelo isolado de *P. ultimum* (6,43).

Em todas as condições analisadas a severidade da doença causada pelo isolado de *P. inflatum* foi baixa, assim como foi observado nos experimentos

anteriores (Tabelas 3 e 4). Mesmo sob altas concentrações de inóculo o índice médio de severidade da doença foi baixo quando comparado com as outras espécies, em geral, não diferindo estatisticamente do controle não inoculado (Tabelas 6 a 8).

Todos os isolados mostraram um padrão de aumento na severidade dos sintomas induzidos nas plântulas de tomate em função do tempo de incubação independente da temperatura e da concentração de inóculo utilizada (Figura 4). Assim como observado com o aumento da concentração de inóculo, a severidade da doença provocada pelo isolado de *P. ultimum* evoluiu rapidamente. Verificou-se um índice médio de 0,73, dois dias após a inoculação, chegando a 4,44, cinco dias após a inoculação, um aumento de aproximadamente quatro valores na escala, enquanto que os outros isolados, em geral, provocaram um aumento de dois valores na escala de sintomas.

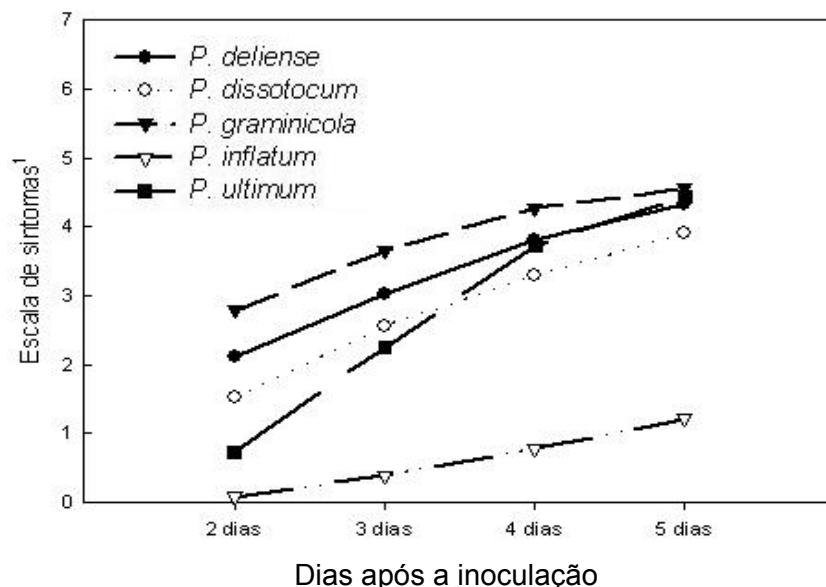


Figura 4. Progressão da doença causada por cinco isolados de espécies do gênero *Pythium* em plântulas de *Solanum lycopersicum*, analisada dois, três, quatro e cinco dias após a inoculação com zoósporos. Cada valor é a média do índice na escala de sintomas de 480 plântulas. ¹ 0 = sem sintomas aparentes; 7 = lesões > 5 mm. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2007.

A agressividade com que *P. ultimum* provoca doença pode também ser observada nos sintomas induzidos. Esse isolado induz a maceração do tecido vegetal, causando manchas translúcidas (Figura 5a) e seu rápido crescimento pode ser verificado pela presença de micélio esbranquiçado sobre a plântula (Figura 5b). Os outros isolados induzem lesões necróticas escurecidas e com severidade variada (Figura 5c e d).

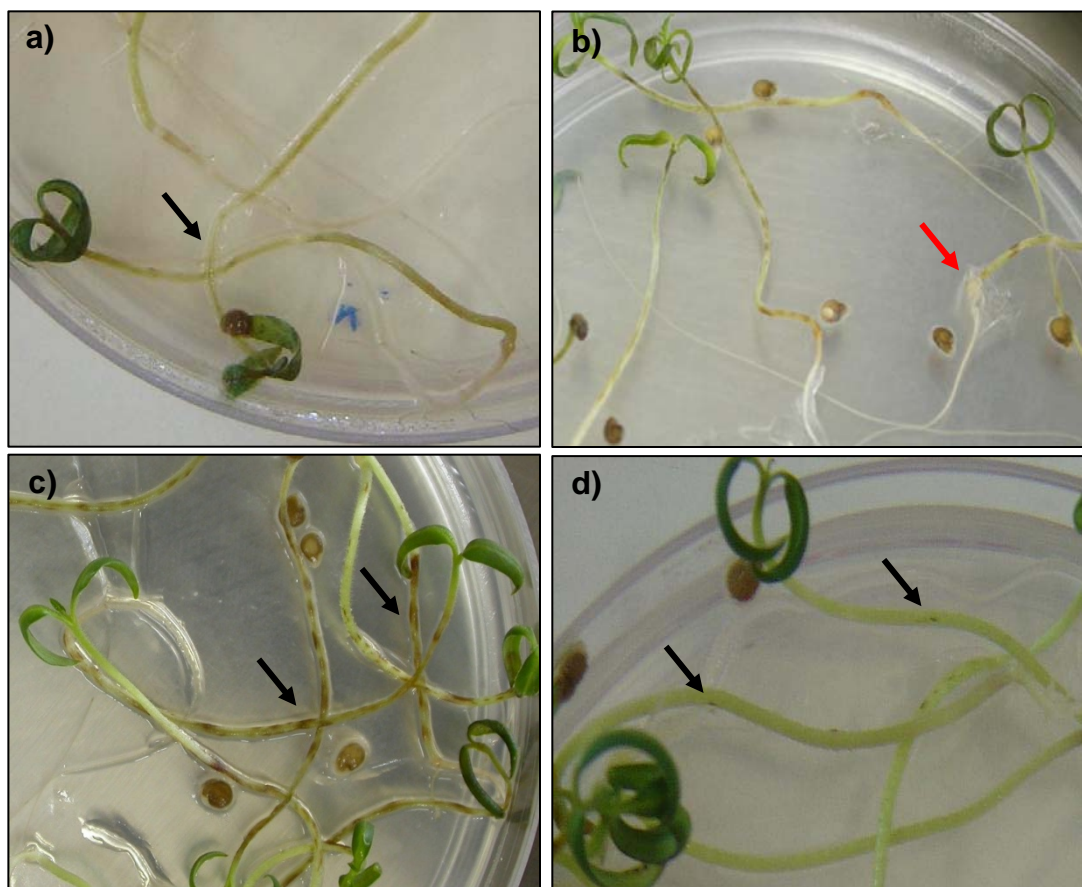


Figura 5. Sintomas observados em plântulas de *Solanum lycopersicum* inoculadas com isolados de espécies do gênero *Pythium* após cinco dias de incubação a 30°C. a e b) Plântulas inoculadas com zoósporos de *P. ultimum*; c) Plântulas inoculadas com zoósporos de *P. deliense*; d) Plântulas inoculadas com zoósporos de *P. inflatum*. As setas pretas indicam os sintomas provocados pelos patógenos e a seta vermelha indica o crescimento de micélio sobre a plântula. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2007.

Os zoósporos são as principais fontes de inóculo de espécies patogênicas do gênero *Pythium*. Assim, experimentos foram realizados a fim de se verificar o potencial de uso do surfactante sintético (Agral) no controle dessas estruturas de disseminação do patógeno. O efeito do surfactante foi verificado nos sintomas induzidos por *P. deliense*, *P. dissotocum* e *P. graminicola*.

Foi possível observar que a adição do surfactante provocou respostas diferentes na severidade da doença causada por cada isolado. No caso de plântulas inoculadas com *P. graminicola*, as duas concentrações utilizadas promoveram uma redução significativa no índice médio dos sintomas, tanto dois quanto cinco dias após a inoculação. Na Figura 6 podem ser observadas fotos representativas dos sintomas visualizados sem surfactante (Figura 6a) ou com a adição do surfactante em plântulas inoculadas com *P. graminicola* (Figura 6b e c) e *P. deliense* (Figura 6d). Dois dias após a inoculação, o índice médio dos sintomas induzidos por *P. graminicola* foi de 2,67 em plântulas inoculadas com zoósporos, mas não submetidas ao tratamento com o surfactante. A aplicação do surfactante reduziu significativamente esse valor para 1,73, quando aplicado a 0,03 mL.L⁻¹, e para 0,07, quando aplicado a 0,3 mL.L⁻¹ ($p < 0,0001$, Tabela 9). A mesma tendência foi observada cinco dias após a inoculação. Em plântulas inoculadas com *P. dissotocum*, uma redução significativa na severidade da doença foi verificada somente dois dias após a inoculação quando foi aplicada a concentração mais alta (0,3 mL.L⁻¹) do surfactante ($p = 0,037$, Tabela 13). A severidade da doença provocada por *P. deliense* foi significativamente reduzida ($p < 0,0001$, Tabela 13) cinco dias após a inoculação e com a aplicação de ambas as concentrações do surfactante.

Tabela 9. Comparação entre médias de sintomas observados em plântulas de *S. lycopersicum* dois e cinco dias após a inoculação com isolados de espécies do gênero *Pythium* e do tratamento com um surfactante. Cada valor é a média^a ± desvio padrão (DP) do índice na escala de sintomas de 30 plântulas.
¹ 0 = sem sintomas aparentes; 7 = lesões > 5 mm. Dai = dias após a inoculação. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2007.

Espécie	Dai	Concentração de surfactante (mL.L ⁻¹)			CV (%)	p
		0	0,03	0,3		
<i>P. deliense</i>	2	0,87 ± 1,07 a	0,43 ± 0,68 a	0,63 ± 0,72 a	130	0,143
	5	3,70 ± 2,04 a	2,00 ± 1,20 b	2,03 ± 1,60 b	64	<0,0001
<i>P. dissotocum</i>	2	1,23 ± 1,01 a	1,33 ± 1,27 a	0,63 ± 0,99 b	102	0,033
	5	2,50 ± 1,39 a	2,33 ± 1,65 a	2,83 ± 1,76 a	63	0,474
<i>P. graminicola</i>	2	2,67 ± 1,21 a	1,73 ± 0,87 b	0,07 ± 0,37 c	104	<0,0001
	5	4,40 ± 1,92 a	2,83 ± 1,37 b	1,17 ± 1,12 c	54	<0,0001

^a Médias seguidas pela mesma letra (linha) não diferem pelo teste de Fisher (p>0,05).



Figura 6. Plântulas de *Solanum lycopersicum* cinco dias após a inoculação com zoósporos de *P. graminicola* e *P. deliense* e do tratamento com um surfactante. a) Sintomas em plântulas inoculadas com *P. graminicola*; b) Sintomas em plântulas inoculadas com *P. graminicola* e submetidas ao tratamento com surfactante a 0,03 mL.L⁻¹; c) Sintomas em plântulas inoculadas com *P. graminicola* e submetidas ao tratamento com surfactante a 0,3 mL.L⁻¹; d) Sintomas em plântulas inoculadas com *P. deliense* e submetidas ao tratamento com surfactante a 0,3 mL.L⁻¹. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.

A fim de aprofundar a caracterização da resposta das plântulas de tomate aos isolados de *Pythium* spp., foram realizados experimentos para verificar o efeito da adição de ABA, AS, ET ou AVG no patossistema *S. lycopersicum* X *Pythium* spp.. A incidência de doença em plântulas inoculadas com zoósporos dos isolado de *P. deliense* e *P. ultimum* e submetidas ao tratamento com ABA não diferiu significativamente ($p=0,292$ e $p=372$, respectivamente) do controle inoculado com zoósporos, mas não tratado. O mesmo foi observado em plantas inoculadas com esses isolados e tratadas com AVG ($p=0,611$ e $p=0,471$). Enquanto que a incidência da doença em plântulas inoculadas com *P. inflatum* aumentou significativamente ($p=0,023$) de 6% para 30% com o tratamento com AVG (Figura 7).

Em contraste, a adição de AS e ET reduziu significativamente a incidência da doença, no caso de inoculações com *P. deliense* e *P. ultimum* (Figura 7). A inoculação com *P. deliense* e *P. ultimum* provocou necrose em 96% e 85% das plântulas, respectivamente. Nas plântulas submetidas ao tratamento com AS a incidência foi reduzida para 32%, no caso de inoculações com *P. deliense* ($p<0,0001$), e para 6%, no caso de plântulas inoculadas com *P. ultimum* ($p<0,0001$). Já o tratamento com ET protegeu completamente as plântulas contra a doença causada por ambos os isolados ($p<0,0001$). Nas plântulas inoculadas com *P. inflatum* e submetidas ao tratamento com AS e ET, também foi observada uma diminuição no número de plântulas com necrose, porém não houve diferença significativa em relação ao controle inoculado com zoósporos, provavelmente devido ao baixo nível de necrose provocado por esse patógeno.

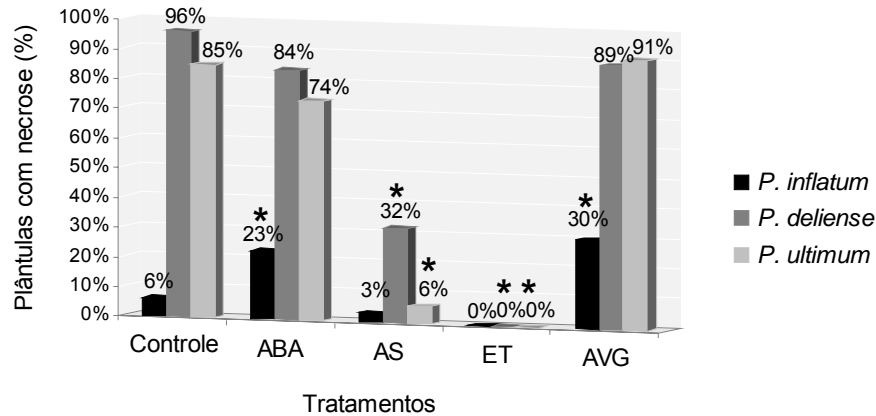


Figura 7. Incidência de necrose em plântulas de *Solanum lycopersicum* inoculadas com isolados de espécies do gênero *Pythium*. Simultaneamente à inoculação as plântulas foram submetidas a tratamentos com um dos seguintes compostos: ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (AS), etefon (ET) ou aminoetoxivinilglicina (AVG). O controle compreende plântulas inoculadas com zoósporos e não submetidas aos tratamentos. *Colunas marcadas com asterisco diferem significativamente do respectivo controle pelo teste de Fisher ($p \leq 0,05$). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2007.

4.2 Caracterização molecular

A fim de caracterizar a expressão de genes que possuem um possível papel na defesa contra espécies do gênero *Pythium*, foram realizadas buscas em bases de dados como NCBI, TAIR e Solgenes. O critério de seleção foi o de identificar genes cujos produtos se expressam durante o ataque de patógenos e sejam potencialmente envolvidos com a resistência aos mesmos, com ênfase nas interações envolvendo patógenos com características semelhantes à *Pythium* spp.. Desta forma, foram selecionados seis genes: fator de resposta ao etileno 1 (*ERF1*), lipoxigenase D (*LOXD*), proteína relacionada à patogênese 1a1 (*PR-1A1*), proteína semelhante à osmotina (*PR-5*), extensina (*EXT*) e precursor de endo-1,4-beta-glucanase (*CEL1*). Além destes, o gene que codifica a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) foi selecionado como controle endógeno para as análises, pois o mesmo apresenta expressão constitutiva nos tecidos vegetais.

A verificação do padrão de expressão dos genes selecionados foi realizada pelo método de quantificação relativa usando PCR em tempo real. Inicialmente, os oligonucleotídeos iniciadores utilizados no presente estudo, foram submetidos a validações de eficiência de amplificação. Amostras contendo cDNAs com diluições seriadas de $2,5 \times 10^{-1}$, $6,25 \times 10^{-2}$, $1,56 \times 10^{-2}$ e $3,9 \times 10^{-3}$ foram submetidas à amplificação. A eficiência foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1 \times 100\%$ (Pfaffl, 2001). Foram obtidos os seguintes valores de eficiência para os oligonucleotídeos iniciadores utilizados: 101% para *GAPDH*, 96% para *ERF1*, 102% para *LOXD*, 104% para *PR-1A1*, 101% para *PR-5*, 99% para *EXT* e 127% para *CEL1*. Como o valor da eficiência de amplificação apresentado por *CEL1* diferiu em mais de 10% do controle endógeno (*GAPDH*) não foi possível realizar a quantificação relativa para esse gene.

Após a reação de amplificação, os produtos foram submetidos à dissociação, a fim de verificar a ocorrência de amplificações não específicas ou de dímeros de oligonucleotídeos iniciadores. A partir das curvas de dissociação geradas (Figuras 8 e 9), foi possível a visualização de picos de amplificação inespecíficos em três casos: *GAPDH* (Figura 8a), *ERF1* (Figura 8b) e *EXT* (Figura 9c). Após a reação, os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose (Figura 10), não sendo observada a presença de produtos inespecíficos. Por essa razão e, uma vez que a presença de um produto inespecífico não afetou a eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos iniciadores, os mesmos foram utilizados nas análises posteriores.

O acúmulo de mRNA de cada um dos genes foi avaliado em plântulas de *S. lycopersicum* inoculadas com 10^6 zoósporos.mL⁻¹ de cada um dos isolados de espécies do gênero *Pythium*. Amostras foram coletadas aos dois e cinco dias

após a inoculação e submetidas à extração de RNA total. Foi utilizado o método de quantificação relativa, no qual se obtêm um valor de expressão por meio da comparação entre os Cts do cDNA de plântulas inoculadas em relação ao controle não inoculado, denominado calibrador (Livak & Schmittgen, 2001). O gene constitutivo *GAPDH* foi utilizado como controle endógeno a fim de normalizar as quantidades iniciais de cDNA.

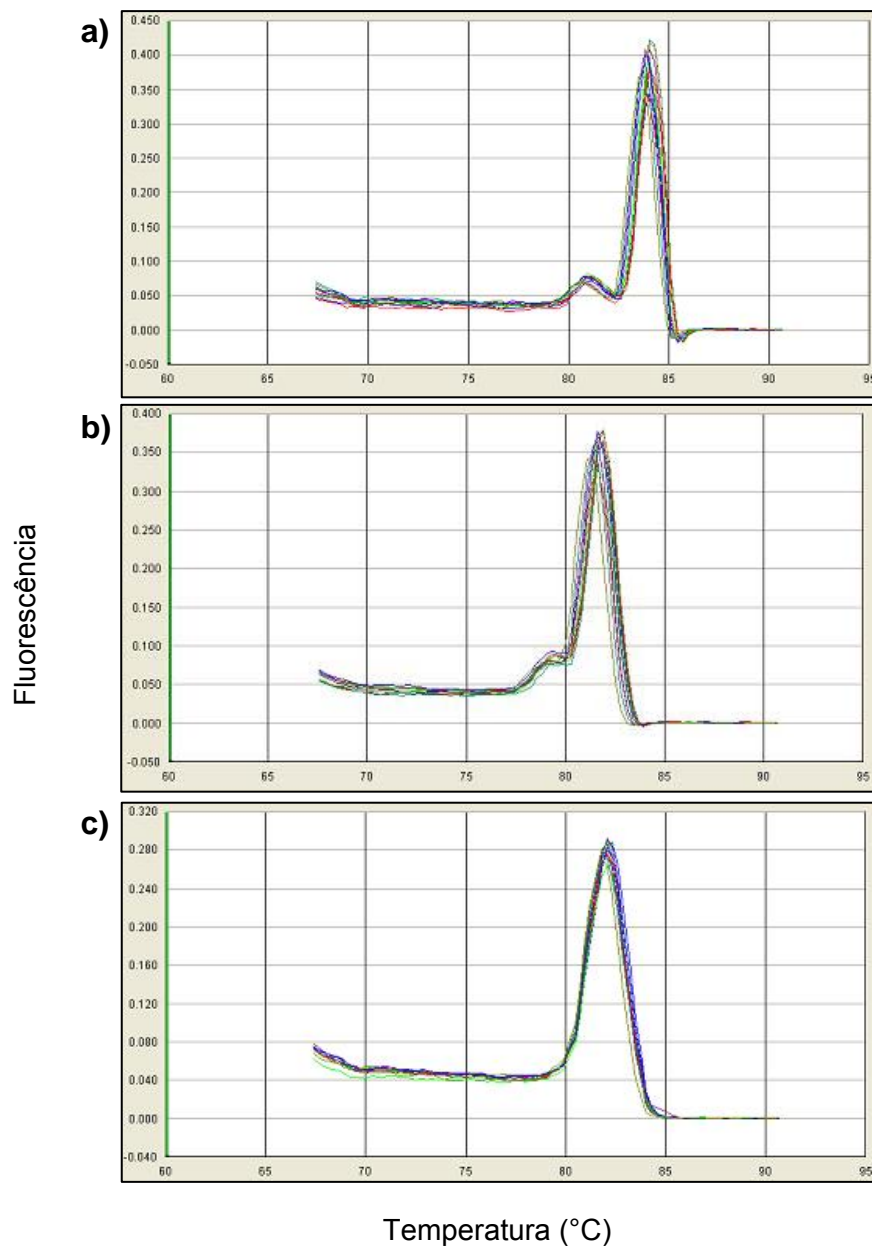


Figura 8. Curvas de dissociação obtidas a partir dos produtos amplificados dos genes *GAPDH* (a), *ERF1* (b) e *LOXD* (c). Cada figura é formada pelas curvas de 12 amostras. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.

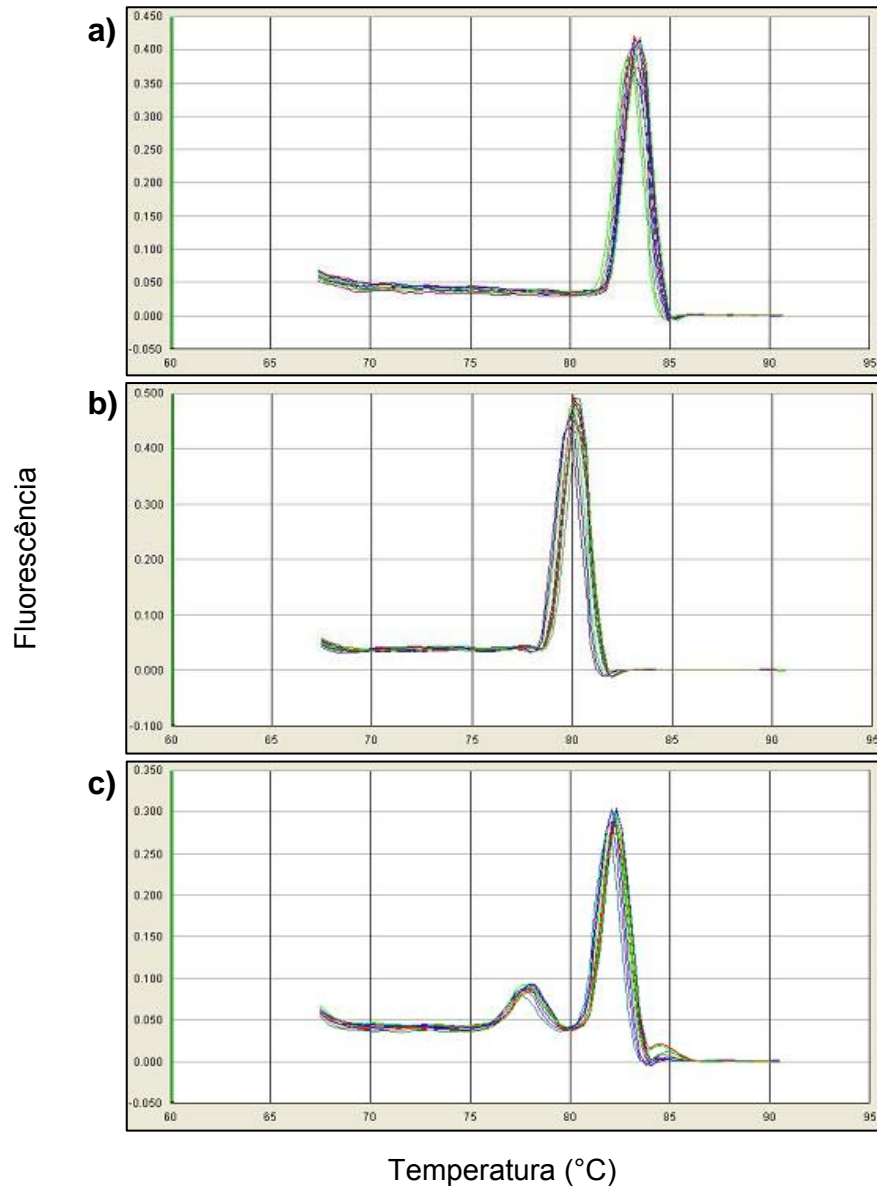


Figura 9. Curvas de dissociação obtidas a partir dos produtos amplificados dos genes *PR-1A1* (a), *PR-5* (b) e *EXT* (c). Cada figura é formada pelas curvas de 12 amostras. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.

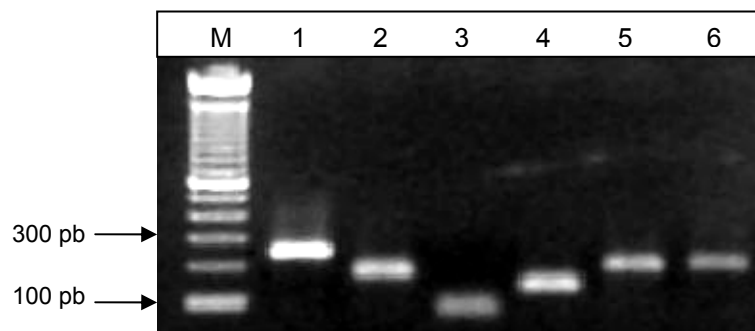


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados a partir do cDNA de plântulas de *Solanum lycopersicum* por RT-PCR. M – marcador de massa molecular 100 pb; 1 – *GAPDH*; 2 – *ERF1*; 3 – *LOXD*; 4 – *PR-1A1*; 5 – *PR-5*; 6 – *EXT*. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.

Observou-se um padrão semelhante de acúmulo de mRNA dos genes *ERF1* (Figura 11) e *LOXD* (Figura 12), envolvidos na sinalização via etileno e ácido jasmônico, respectivamente. Além disso, o nível de acúmulo de mRNA de todos os genes analisados foi aparentemente dependente da interação em questão. Isso pode ser observado pelo acúmulo do mRNA do gene *LOXD* dois dias após a inoculação (Tabela 11). Neste caso, plântulas inoculadas com *P. dissotocum* apresentaram um baixo acúmulo de mRNA nas três temperaturas avaliadas, variando de 0,27 a 2,69, em relação ao calibrador. Em plântulas inoculadas com *P. graminicola*, o acúmulo de mRNA se mostrou baixo somente a 20°C (1,78), enquanto que a 25°C e 30°C foi observado um acúmulo de 59,01 e 20,16 vezes, respectivamente. Deste modo, observou-se que o acúmulo de mRNA do gene *LOXD* em plântulas inoculadas com *P. deliense*, *P. dissotocum* e *P. graminicola* possui padrões marcadamente diferentes nos períodos iniciais da infecção, sendo que as diferenças se tornam menores cinco dias após a inoculação (Figura 12).

Foi possível observar que o acúmulo de mRNA dos genes *PR-1A1* e *PR-5* apresentou um padrão semelhante quando todas as amostras são comparadas (Figuras 13 e 14). Por exemplo, observou-se um aumento no acúmulo de mRNA do gene *PR-1A1* em plântulas inoculadas com *P. graminicola* em relação ao calibrador de 20,63 vezes, a 20°C, 10,32 vezes, a 25°C, e de 45,00 vezes, a 30°C, cinco dias após a inoculação (Tabela 12). De mesmo modo, no caso do gene *PR-5*, observou-se um maior acúmulo de mRNA a 30°C, 37,65, o qual foi menor a 20 e a 25°C, com um acúmulo de 27,03 vezes e 9,32 vezes mais em relação ao calibrador, respectivamente (Tabela 13).

Em geral, o acúmulo de mRNA induzido pela infecção por *P. inflatum* e *P. ultimum* foi menor quando comparado com as outras interações, com algumas exceções a 30°C. No caso do gene *ERF1*, enquanto o acúmulo de mRNA variou de 0,63 a 7,80 nas interações com *P. inflatum* e *P. ultimum*, o acúmulo em plântulas inoculadas com outros isolados variou de 0,60 a 31,42 (Tabela 10).

Verificou-se o acúmulo do mRNA dos cinco genes foi baixo a 20°C, dois dias após a inoculação, chegando a no máximo 5,91 vezes mais que o calibrador no caso do gene *LOXD* na interação com *P. ultimum*. Uma exceção foi observada na interação com *P. deliense*, na qual o acúmulo de mRNA chegou a aumentar 19,17 vezes em relação ao calibrador (Tabela 11).

O padrão de acúmulo de mRNA em plântulas inoculadas com *P. graminicola* foi semelhante nos cinco casos. Plântulas inoculadas com este isolado apresentam um grande acúmulo inicial, a 25 e 30°C, seguido por uma redução nos níveis de mRNA cinco dias após a inoculação. Verificou-se que a 25°C, a inoculação com *P. graminicola* resultou em um aumento de 232,70 vezes dos níveis de *PR1A1* em relação ao calibrador e, cinco dias após a inoculação, esse acúmulo foi de apenas 10,32 vezes.

Em relação ao mRNA do gene *EXT*, verificaram-se altos níveis de acúmulo de mRNA na maior parte das interações avaliadas, chegando a um incremento de 439,40 vezes. Além disso, determinados isolados provocaram uma redução nos níveis de mRNA em plântulas de tomate de dois para cinco dias, enquanto que outros isolados causaram um aumento dos níveis com o tempo (Figura 15 e Tabela 14). Plântulas inoculadas com *P. deliense* tiveram uma redução nos níveis de mRNA de *EXT* em função do tempo, ao contrário do observado em plântulas inoculadas com *P. dissotocum*.

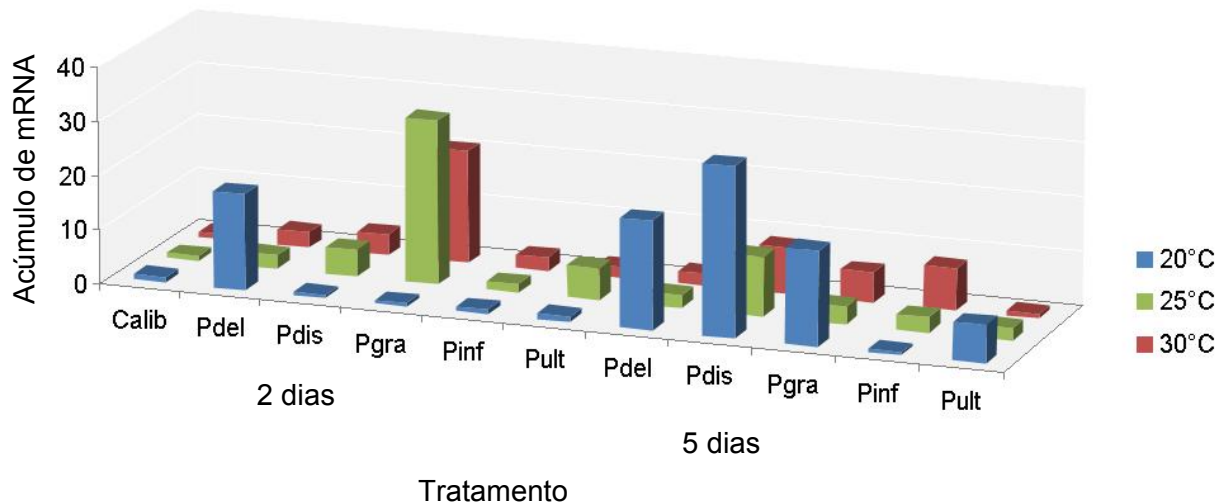


Figura 11. Acúmulo de mRNA do gene *ERF1* em plântulas de *Solanum lycopersicum* inoculadas com isolados de espécies do gênero *Pythium*. Calib = Calibrador (mRNA de plântulas não inoculadas), Pdel = *P. deliense*, Pdis = *P. dissotocum*, Pgra = *P. graminicola*, Pinf = *P. inflatum* e Pult = *P. ultimum*. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.

Tabela 10. Quantificação relativa do acúmulo do mRNA do gene *ERF1* em plântulas de *Solanum lycopersicum* inoculadas com isolados de espécies do gênero. A expressão foi calculada a partir da fórmula: $ER = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.

Temperatura (°C)	Espécie	Dai			
		2 dias		5 dias	
20	Calibrador ^b	1,00 ± 1,28	cA	1,00 ± 1,28	A
	<i>P. deliense</i>	17,88 ± 5,65	bA	20,07 ± 7,65	bA
	<i>P. dissotocum</i>	0,65 ± 0,05	cB	31,42 ± 16,58	aA
	<i>P. graminicola</i>	0,60 ± 0,18	cB	17,59 ± 2,50	bcA
	<i>P. inflatum</i>	0,93 ± 0,34	cA	0,63 ± 0,26	dA
	<i>P. ultimum</i>	1,05 ± 0,24	cA	7,06 ± 2,34	cdA
25	<i>P. deliense</i>	2,55 ± 0,30	cA	2,49 ± 1,04	dA
	<i>P. dissotocum</i>	5,00 ± 2,30	cA	10,96 ± 3,55	bcdA
	<i>P. graminicola</i>	30,41 ± 75,96	aA	3,34 ± 1,55	dB
	<i>P. inflatum</i>	1,50 ± 0,04	cA	2,80 ± 0,97	dA
	<i>P. ultimum</i>	5,94 ± 3,51	cA	2,36 ± 0,75	dA
30	<i>P. deliense</i>	2,82 ± 0,78	cA	2,27 ± 0,55	dA
	<i>P. dissotocum</i>	3,86 ± 0,54	cA	8,62 ± 2,89	bcdA
	<i>P. graminicola</i>	20,89 ± 8,76	bA	5,56 ± 0,73	dB
	<i>P. inflatum</i>	2,51 ± 0,42	cA	7,80 ± 5,23	cdA
	<i>P. ultimum</i>	2,01 ± 0,44	cA	0,85 ± 0,54	dA

p<0,0001

CV = 95%

^a Valores seguidos da mesma letra minúscula (coluna) ou maiúscula (linha) não diferem pelo teste de Fisher ($p \leq 0,05$).

^b mRNA de plântulas não inoculadas.

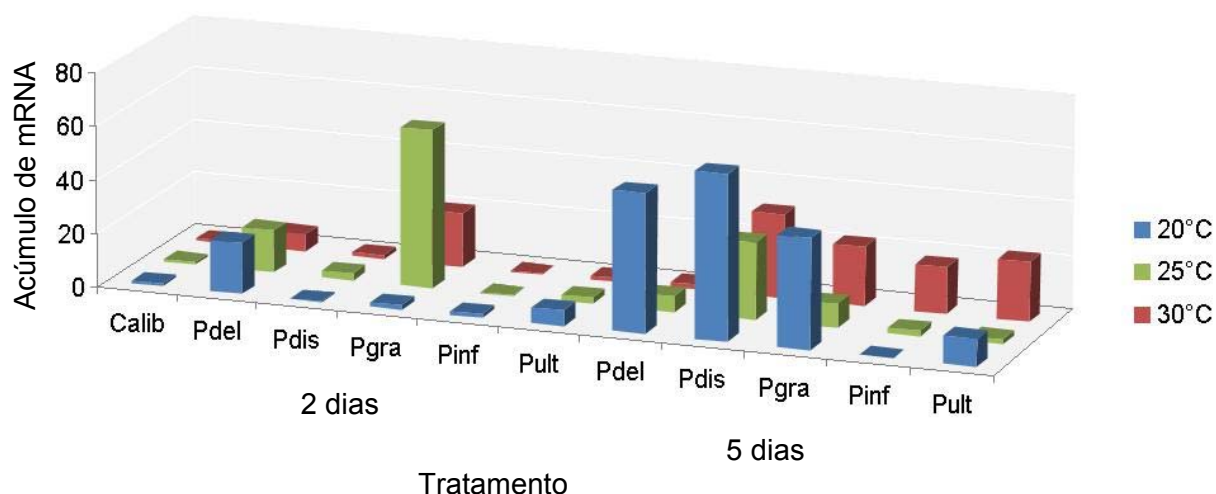


Figura 12. Acúmulo de mRNA do gene *LOXD* em plântulas de *Solanum lycopersicum* inoculadas com isolados de espécies do gênero *Pythium*. Calib = Calibrador (mRNA de plântulas não inoculadas), Pde = *P. deliense*, Pdi = *P. dissotocum*, Pgr = *P. graminicola*, Pin = *P. inflatum* e Pul = *P. ultimum*. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.

Tabela 11. Quantificação relativa do acúmulo do mRNA do gene *LOXD* em plântulas de *Solanum lycopersicum* inoculadas com isolados de espécies do gênero *Pythium*. A expressão foi calculada a partir da fórmula: $ER = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.

Temperatura (°C)	Espécie	Dai			
		2 dias		5 dias	
20	Calibrador ^b	1,00 ± 1,25	cA	1,00 ± 1,25	hA
	<i>P. deliense</i>	19,17 ± 4,71	bB	51,87 ± 18,92	bA
	<i>P. dissotocum</i>	0,27 ± 0,04	cB	61,68 ± 31,10	aA
	<i>P. graminicola</i>	1,78 ± 0,43	cB	41,06 ± 3,56	cA
	<i>P. inflatum</i>	1,42 ± 0,49	cA	0,35 ± 0,16	hA
	<i>P. ultimum</i>	5,91 ± 1,85	cA	10,32 ± 3,17	gA
25	<i>P. deliense</i>	15,95 ± 1,49	bA	5,85 ± 2,38	ghB
	<i>P. dissotocum</i>	2,69 ± 1,25	cB	28,73 ± 8,58	deA
	<i>P. graminicola</i>	59,01 ± 17,50	aA	8,82 ± 4,08	gB
	<i>P. inflatum</i>	0,31 ± 0,03	cA	1,95 ± 0,68	hA
	<i>P. ultimum</i>	2,43 ± 1,22	cA	1,84 ± 0,57	hA
30	<i>P. deliense</i>	6,49 ± 1,92	cA	1,99 ± 0,43	hA
	<i>P. dissotocum</i>	1,47 ± 0,15	cB	31,25 ± 12,53	dA
	<i>P. graminicola</i>	20,16 ± 6,56	bA	22,05 ± 3,64	efA
	<i>P. inflatum</i>	0,33 ± 0,14	cB	17,47 ± 10,92	fA
	<i>P. ultimum</i>	1,45 ± 0,33	cB	22,25 ± 8,63	efA

p<0,0001

CV = 29%

^a Valores seguidos da mesma letra minúscula (coluna) ou maiúscula (linha) não diferem pelo teste de Fisher ($p \leq 0,05$).

^b mRNA de plântulas não inoculadas.

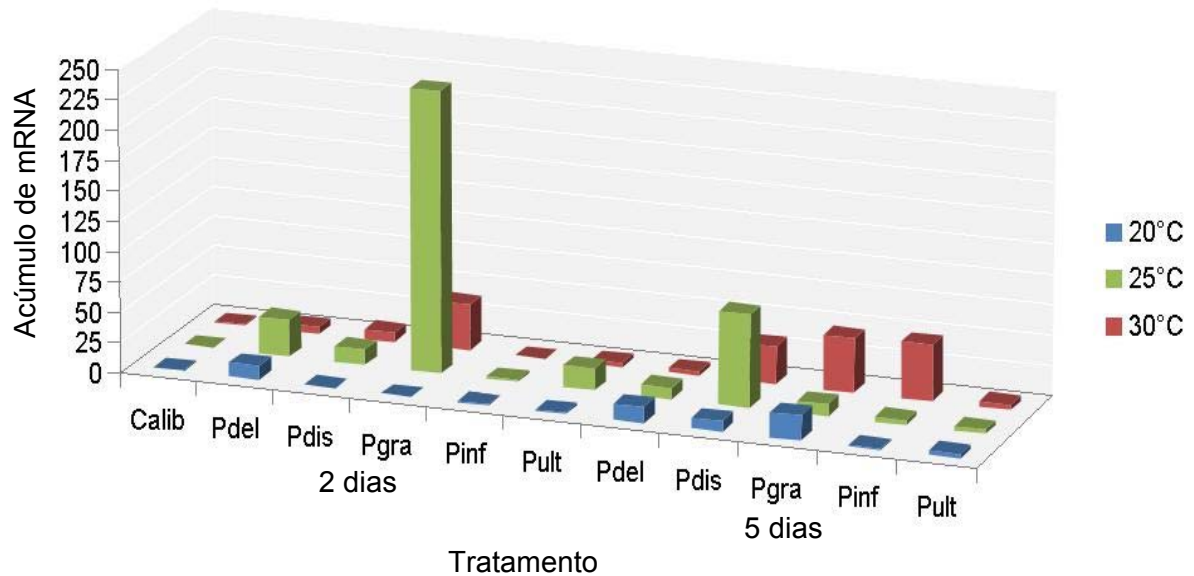


Figura 13. Acúmulo de mRNA do gene *PR-1A1* em plântulas de *Solanum lycopersicum* inoculadas com isolados de espécies do gênero *Pythium*. Calib = Calibrador (mRNA de plântulas não inoculadas), Pde = *P. deliense*, Pdi = *P. dissotocum*, Pgr = *P. graminicola*, Pin = *P. inflatum* e Pul = *P. ultimum*. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.

Tabela 12. Quantificação relativa do acúmulo do mRNA do gene *PR-1A1* em plântulas de *Solanum lycopersicum* inoculadas com isolados de espécies do gênero. A expressão foi calculada a partir da fórmula: $ER = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.

Temperatura (°C)	Espécie	Dai			
		2 dias		5 dias	
20	Calibrador ^b	1,00 ± 1,24	eA	1,00 ± 1,20	gA
	<i>P. deliense</i>	11,81 ± 2,96	cdeA	13,34 ± 4,78	efA
	<i>P. dissotocum</i>	0,40 ± 0,05	eA	8,72 ± 4,65	efgA
	<i>P. graminicola</i>	0,31 ± 0,08	eB	20,63 ± 4,10	deA
	<i>P. inflatum</i>	1,02 ± 0,36	eA	0,68 ± 0,26	gA
	<i>P. ultimum</i>	1,55 ± 0,43	deA	3,78 ± 1,17	fgA
25	<i>P. deliense</i>	30,65 ± 5,33	bA	9,35 ± 3,85	efgB
	<i>P. dissotocum</i>	12,82 ± 5,93	cdB	76,69 ± 20,89	aA
	<i>P. graminicola</i>	232,70 ± 69,90	aA	10,32 ± 6,71	efgB
	<i>P. inflatum</i>	1,88 ± 0,21	deA	3,95 ± 1,58	fgA
	<i>P. ultimum</i>	18,28 ± 9,31	cA	3,49 ± 1,06	fgB
30	<i>P. deliense</i>	5,66 ± 1,44	deA	3,85 ± 0,76	fgA
	<i>P. dissotocum</i>	7,92 ± 0,90	cdeB	31,23 ± 9,77	cdA
	<i>P. graminicola</i>	38,70 ± 12,84	bA	45,00 ± 7,99	bcA
	<i>P. inflatum</i>	0,35 ± 0,07	eB	46,75 ± 25,75	bA
	<i>P. ultimum</i>	3,68 ± 0,78	deA	4,17 ± 1,04	fgA

p<0,0001
CV = 34%

^a Valores seguidos da mesma letra minúscula (coluna) ou maiúscula (linha) não diferem pelo teste de Fisher ($p \leq 0,05$).

^b mRNA de plântulas não inoculadas.

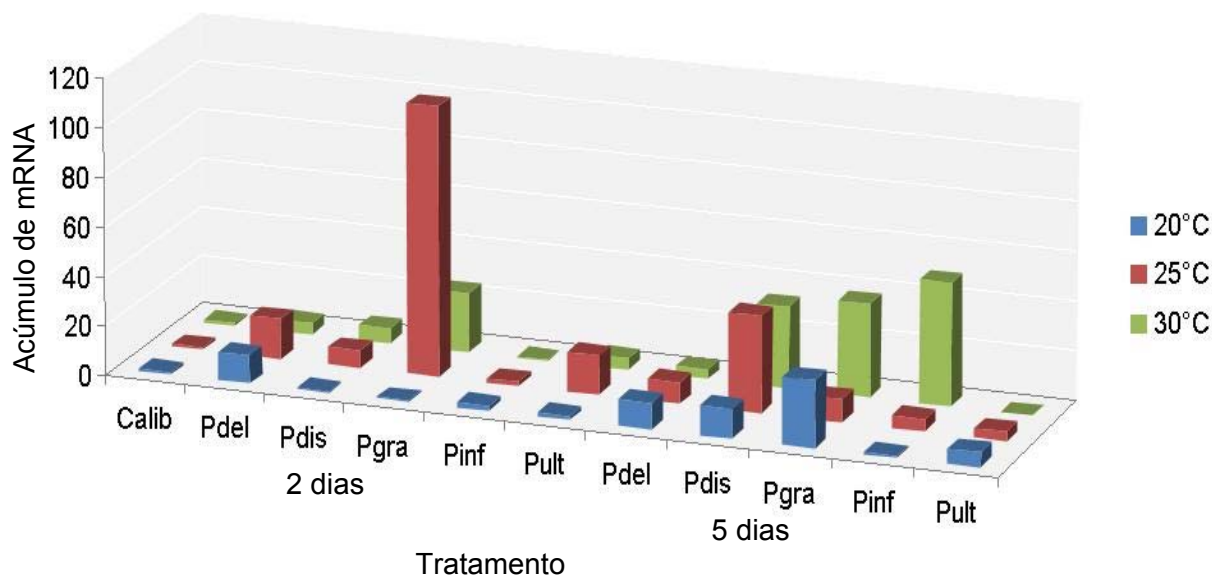


Figura 14. Acúmulo de mRNA do gene *PR-5* em plântulas de *Solanum lycopersicum* inoculadas com isolados de espécies do gênero *Pythium*. Calib = Calibrador (mRNA de plântulas não inoculadas), Pde = *P. deliense*, Pdi = *P. dissotocum*, Pgr = *P. graminicola*, Pin = *P. inflatum* e Pul = *P. ultimum*. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.

Tabela 13. Quantificação relativa do acúmulo do mRNA do gene *PR-5* em plântulas de *Solanum lycopersicum* inoculadas com isolados de espécies do gênero. A expressão foi calculada a partir da fórmula: $ER = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.

Temperatura (°C)	Espécie	Dai			
		2 dias		5 dias	
20	Calibrador ^b	1,00 ± 1,22	fA	1,00 ± 1,22	gA
	<i>P. deliense</i>	11,32 ± 2,92	cdA	10,56 ± 3,52	deA
	<i>P. dissotocum</i>	0,58 ± 0,07	efB	11,94 ± 5,99	dA
	<i>P. graminicola</i>	0,59 ± 0,15	efB	27,03 ± 3,41	cA
	<i>P. inflatum</i>	1,94 ± 0,71	efA	0,69 ± 0,26	gA
	<i>P. ultimum</i>	1,75 ± 0,44	efA	6,03 ± 2,14	defgA
	25	<i>P. deliense</i>	16,18 ± 1,36	cA	8,80 ± 3,60
<i>P. dissotocum</i>		7,01 ± 3,22	deB	38,97 ± 10,68	bA
<i>P. graminicola</i>		109,02 ± 28,01	aA	9,32 ± 4,34	defB
<i>P. inflatum</i>		1,74 ± 0,63	efA	5,11 ± 1,79	efgA
<i>P. ultimum</i>		15,87 ± 7,81	cA	3,86 ± 1,13	fgB
30	<i>P. deliense</i>	4,64 ± 1,18	efA	3,84 ± 1,25	fgA
	<i>P. dissotocum</i>	6,26 ± 0,77	defB	32,86 ± 10,20	bcA
	<i>P. graminicola</i>	24,16 ± 8,08	bB	37,65 ± 3,36	bA
	<i>P. inflatum</i>	0,40 ± 0,08	fB	49,49 ± 27,00	aA
	<i>P. ultimum</i>	4,75 ± 0,97	efA	0,01 ± 0,01	gA

p<0,0001

CV = 27%

^a Valores seguidos da mesma letra minúscula (coluna) ou maiúscula (linha) não diferem pelo teste de Fisher ($p \leq 0,05$).

^b mRNA de plântulas não inoculadas.

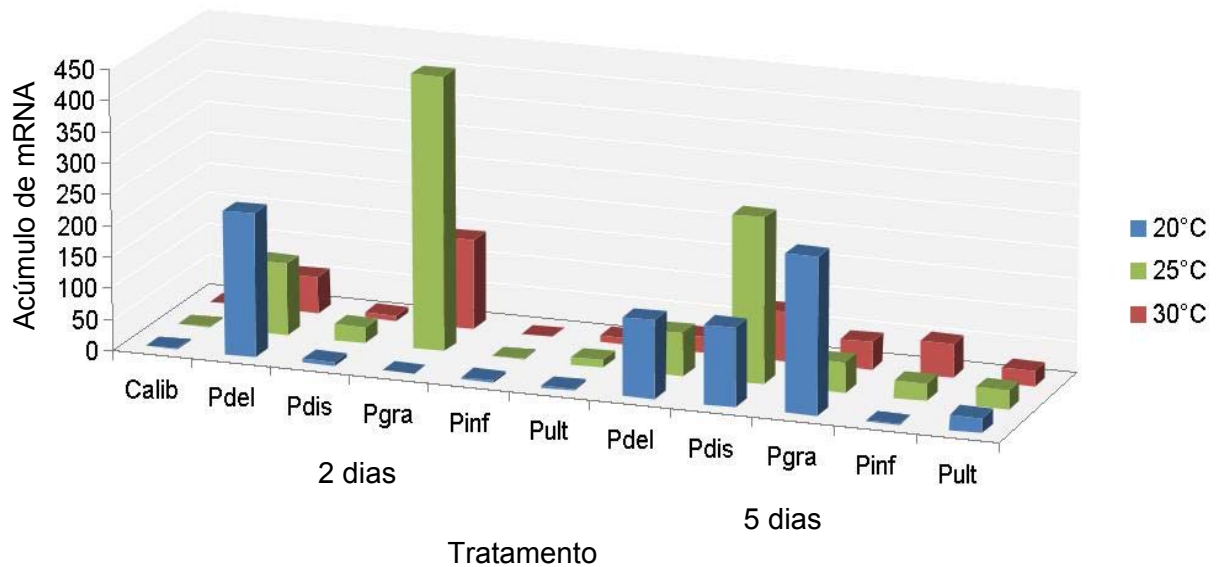


Figura 15. Acúmulo de mRNA do gene *EXT* em plântulas de *Solanum lycopersicum* inoculadas com isolados de espécies do gênero *Pythium*. Calib = Calibrador (mRNA de plântulas não inoculadas), Pde = *P. deliense*, Pdi = *P. dissotocum*, Pgr = *P. graminicola*, Pin = *P. inflatum* e Pul = *P. ultimum*. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.

Tabela 14. Quantificação relativa do acúmulo do mRNA do gene *EXT* em plântulas de *Solanum lycopersicum* inoculadas com isolados de espécies do gênero. A expressão foi calculada a partir da fórmula: $ER = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.

Temperatura (°C)	Espécie	Dai			
		2 dias		5 dias	
20	Calibrador ^b	1,00 ± 1,22	cA	1,00 ± 1,22	A
	<i>P. deliense</i>	230,94 ± 56,89	bA	125,34 ± 42,19	abA
	<i>P. dissotocum</i>	6,03 ± 0,49	cA	126,21 ± 66,09	abA
	<i>P. graminicola</i>	0,50 ± 0,17	cB	250,66 ± 26,99	aA
	<i>P. inflatum</i>	3,00 ± 1,20	cA	1,25 ± 1,46	bA
	<i>P. ultimum</i>	3,42 ± 0,92	cA	24,03 ± 7,47	bA
25	<i>P. deliense</i>	115,25 ± 10,31	bcA	68,87 ± 30,75	bA
	<i>P. dissotocum</i>	25,55 ± 12,35	cB	264,97 ± 71,35	aA
	<i>P. graminicola</i>	439,40 ± 1089,08	aA	48,06 ± 22,41	bB
	<i>P. inflatum</i>	1,07 ± 0,28	cA	28,32 ± 15,70	bA
	<i>P. ultimum</i>	12,27 ± 6,25	cA	30,68 ± 8,44	bA
30	<i>P. deliense</i>	58,20 ± 16,35	cA	25,31 ± 6,18	bA
	<i>P. dissotocum</i>	8,98 ± 1,11	cA	78,90 ± 25,55	bA
	<i>P. graminicola</i>	143,95 ± 43,74	bcA	44,69 ± 6,95	bA
	<i>P. inflatum</i>	0,68 ± 0,20	cA	54,88 ± 29,88	bA
	<i>P. ultimum</i>	10,52 ± 2,22	cA	24,22 ± 7,11	bA

p<0,0001
CV = 129%

^a Valores seguidos da mesma letra minúscula (coluna) ou maiúscula (linha) não diferem pelo teste de Fisher (p≤0,05).

^b mRNA de plântulas não inoculadas.

Foi avaliado ainda o acúmulo de mRNA dos genes *PR-1A1* e *PR-5* em plântulas inoculadas com o isolado de *P. deliense* e submetidas a um dos seguintes tratamentos: com os hormônios vegetais ABA ou AS, com o composto Etefon (ET), que libera etileno quando em contato com água, ou com AVG, um inibidor da síntese de etileno. O cDNA de plântulas controle, não inoculadas e não tratadas, foi utilizado como calibrador. O patossistema tomate X *P. deliense* foi selecionado para a análise de quantificação relativa por se tratar de uma interação com um nível intermediário de severidade.

Verificou-se que o tratamento das plântulas com AS e ET provocou um aumento no acúmulo de mRNA tanto de *PR-1A1* (3,77 e 4,35 vezes, respectivamente) quanto de *PR-5* (2,98 e 2,83 vezes, respectivamente). Já o tratamento com ABA e AVG reprimiu a expressão dos mesmos chegando a uma redução de até 1,58 vezes em relação ao calibrador. Ambos os genes foram induzidos pela infecção causada por *P. deliense*, com um aumento de 16,69 vezes, para *PR-1A1*, e de 10,18 vezes, para *PR-5*, no acúmulo de mRNA. A indução dos genes pela infecção causada pelo patógeno pode também ser observado pelo aumento no acúmulo de mRNA de *PR-1A1* e *PR-5* em plântulas inoculadas e submetidas aos tratamentos com ABA e com AVG (Figura 16 e Tabela 15). Por exemplo, o acúmulo de mRNA do gene *PR-5* aumentou de zero, em plântulas não inoculadas e tratadas com AVG, para 5,20 vezes, em plântulas inoculadas e tratadas com AVG (Tabela 15).

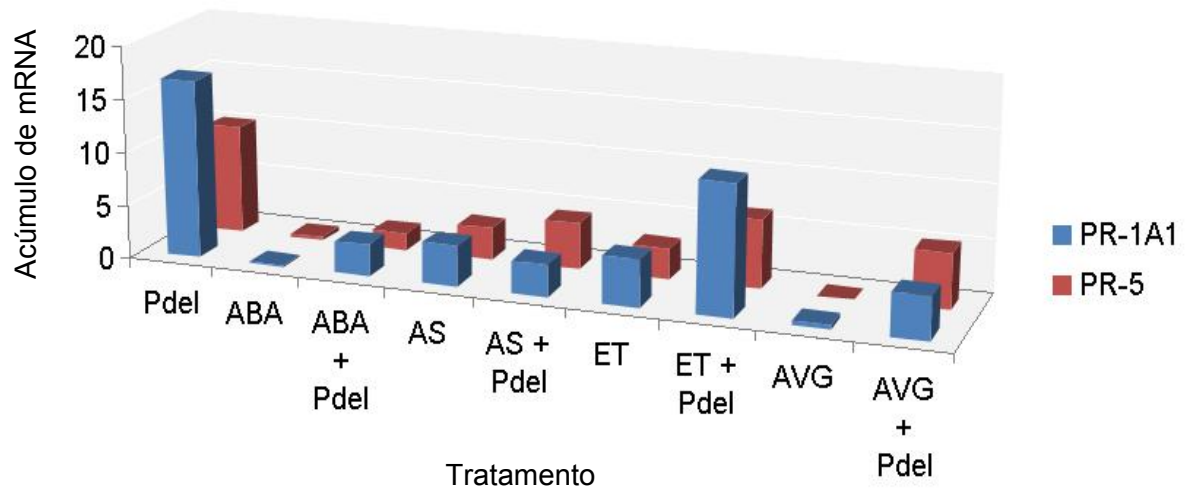


Figura 16. Acúmulo de mRNA dos genes *PR-1A1* e *PR-5* em plântulas de *Solanum lycopersicum* inoculadas com isolado de *P. deliense*. Pdel = *P. deliense*, ABA = ácido abscísico, AS = ácido salicílico, ET = etefon e AVG = aminoetoxivinilglicina. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2007.

Tabela 15. Quantificação relativa do acúmulo do mRNA dos genes *PR-1A1* e *PR-5* em plântulas de *Solanum lycopersicum* inoculadas com isolados de espécies do gênero *Pythium* e submetidas a tratamentos com diferentes compostos. A expressão foi calculada a partir da fórmula: $ER = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. Pdel = *P. deliense*, ABA = ácido abscísico, AS = ácido salicílico, ET = etefon e AVG = aminoetoxivinilglicina. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.

Treatmento	<i>PR-1A1</i>		<i>PR-5</i>	
Calibrador ^b	1,00 ± 0,65	ab	1,00 ± 0,74	ab
<i>P. deliense</i>	16,69 ± 7,32	d	10,18 ± 4,64	d
ABA	0,10 ± 0,09	a	0,37 ± 0,38	a
ABA + Pdel	3,00 ± 0,51	ab	1,61 ± 3,40	b
AS	3,77 ± 0,57	b	2,98 ± 0,53	bc
AS + Pdel	2,98 ± 0,48	ab	4,35 ± 0,96	bc
ET	4,35 ± 1,95	b	2,83 ± 0,12	b
ET + Pdel	12,08 ± 11,50	c	6,40 ± 6,00	c
AVG	0,39 ± 0,15	a	0,00 ± 0,00	ab
AVG + Pdel	4,02 ± 1,65	b	5,20 ± 6,44	c

p<0,0001

p<0,0001

^a Valores seguidos da mesma letra (coluna) não diferem pelo teste de Fisher (p≤0,05).

^b mRNA de plântulas não inoculadas.

5. DISCUSSÃO

5.1 Caracterização biológica

Podridões radiculares causadas por espécies do gênero *Pythium* são freqüentemente destrutivas em plantas cultivadas em sistemas protegidos. Isso ocorre pela criação de um ambiente com alta umidade, ideal para a disseminação destes patógenos. Além disso, nos estágios iniciais de desenvolvimento, as plantas são mais predispostas aos ataques por *Pythium* spp. (Hendrix & Campbell, 1973; Van der Plaats-Niterink, 1981). Deste modo, torna-se essencial a caracterização dos mecanismos de patogênese das espécies que causam danos às culturas, a fim de proporcionar maiores possibilidades de controle desses patógenos.

Por meio de experimentos realizados em substratos, foi possível verificar que os cinco isolados de espécies do gênero *Pythium* são capazes de infectar plântulas de *S. lycopersicum*, porém diferem quanto à severidade da doença causada. Tanto em temperatura alta (30°C), quanto em temperatura baixa (20°C), o isolado de *P. ultimum* causou uma alta taxa de podridão pré-emergência e tombamento em plântulas de tomate (Tabelas 3 e 4). Esta é umas das espécies mais comumente encontradas em todo o mundo e em diversos tipos de culturas, estando adaptada a diferentes condições de substratos e temperaturas (Hsiang *et al.*, 1995; Campion *et al.*, 1997; Herrero *et al.*, 2003; Higginbotham *et al.*, 2004).

No outro extremo está o isolado de *P. inflatum*, cuja baixa virulência a tomate foi anteriormente observada por Robertson (1973, citado por Van der Plaats-Niterink, 1981). Observações realizadas por Plaats-Niterink (1981) demonstraram que *P. inflatum* apresenta uma lenta taxa de crescimento em meio de cultura ($10 \text{ mm} \cdot \text{dia}^{-1}$), o que pode contribuir para a baixa severidade dos sintomas provocados pelo mesmo. Ou ainda, pode permitir que a planta reaja contra a invasão do patógeno e limite o tamanho da lesão.

Quando as plântulas foram submetidas ao crescimento e inoculação na temperatura mais baixa (20°C) quase todas as espécies do patógeno provocaram uma maior taxa de mortalidade (Tabela 5). A faixa de temperatura ótima para a germinação de plântulas de tomate se situa entre 16°C e 29°C (EMBRAPA, 2003). No entanto, foi possível observar que sob baixa temperatura o crescimento das plântulas ocorre mais lentamente. Isso possivelmente faz com que a planta permaneça mais tempo acessível à infecção pelo patógeno, uma vez que espécies fitopatogênicas do gênero *Pythium* infectam preferencialmente tecidos jovens e não lignificados (Hendrix & Campbell, 1973). Entretanto, o isolado de *P. dissotocum* não apresentou o mesmo comportamento, causando maior mortalidade na temperatura de 30°C (Tabela 4), contrariando a observação de Van der Plaats-Niterink (1981), na qual a temperatura ótima para crescimento desta espécie estava situada entre 20°C e 25°C . No entanto, essa temperatura foi determinada para o crescimento do patógeno em meio de cultura, podendo haver variações em função das diferentes condições observadas no crescimento *in planta* (Van der Plaats-Niterink, 1981).

Uma diferença observada em relação ao experimento realizado com plântulas crescidas em substrato foi a maior virulência de *P. graminicola* em

plântulas crescidas em meio de cultura. Esse isolado mostrou uma alta eficiência na indução de sintomas nas plântulas sob baixa concentração de inóculo (10^4 zoósporos.mL⁻¹), ultrapassando todos os outros isolados. Possivelmente, esse isolado possui uma baixa capacidade de causar infecção no hospedeiro quando o inóculo inicial é formado por micélio, como foi utilizado nos experimentos em substrato. Como a velocidade de crescimento micelial para essa espécie em meio de cultura não é muito alta, 20 mm/dia (Van der Plaats-Niterink, 1981), a utilização de micélio como inóculo pode fazer com que, quando o micélio alcançar o hospedeiro, a plântula já esteja em um estágio de desenvolvimento em que a infecção já não é tão eficiente. Anteriormente, em estudo com um isolado de *P. graminicola* proveniente de raízes de pimentão, o mesmo se mostrou pouco virulento a tomate, provocando pouca necrose e uma pequena redução no crescimento radicular e da parte aérea (Chellemi *et al.* 2000). Entretanto, os autores utilizaram plântulas com três semanas de crescimento, que possivelmente já estão menos predispostas a infecção pelo patógeno.

Como já foi observado por diversos autores, *P. ultimum* é capaz de infectar diversos tipos de culturas em todo o mundo, em geral apresentando um comportamento bastante agressivo (Hsiang *et al.*, 1995; Campion *et al.*, 1997; Herrero *et al.*, 2003; Higginbotham *et al.*, 2004). Porém, verificou-se que um ponto importante na severidade dos sintomas induzidos por esse isolado é a concentração de inóculo. Batthi & Kraft (1992) estudaram o efeito da densidade de oósporos na severidade da doença causada por *P. ultimum* em plântulas de grão-de-bico e observaram que o aumento na quantidade de inóculo foi acompanhado por uma maior severidade da doença. De mesmo modo, sob baixa concentração de inóculo (10^4 zoósporos.mL⁻¹), os sintomas provocados por *P.*

ultimum foram comparáveis aos causados por *P. inflatum*, o isolado que causa os sintomas menos severos (Figura 3). Com o aumento da concentração de inóculo a severidade dos sintomas evoluiu rapidamente. *P. ultimum* apresenta uma alta velocidade de crescimento em placa, 30 mm.dia⁻¹ (Van der Plaats-Niterink, 1981), o que pode explicar o rápido aumento nos níveis de sintomas também em função do tempo de incubação. O rápido crescimento do patógeno é observado pelo crescimento de micélio branco na superfície do tecido do hospedeiro, acompanhado por uma extensiva degradação do tecido vegetal (Figura 5). Esse mesmo padrão de crescimento e sintomas foi observado por *Campion et al.* (1997) em raízes de cenouras inoculadas com *P. ultimum*, diferindo dos sintomas provocados por *P. violae* e *P. sulcatum*. Estudando a contribuição de *P. ultimum* e *P. violae* na ocorrência de manchas com depressões em cenouras, *Campion et al.* (1997) verificaram que *P. ultimum* induziu sintomas mais severos do que os causados por *P. violae*. Segundo os autores, isso se deve a capacidade de *P. ultimum* de produzir enzimas mais rapidamente e em maior quantidade do que *P. violae*.

Com base nesses resultados foi evidenciada a importância da utilização de zoósporos como inóculo. A inoculação das plantas com concentrações conhecidas desses agentes permitiu grandes avanços na caracterização dos diferentes isolados avaliados neste trabalho. Sendo os zoósporos a principal fonte de inóculo de espécies do gênero *Pythium*, especialmente em sistemas de cultivo hidropônico (Francis & St. Clair, 1997), a realização de estudos detalhados sobre essas estruturas de disseminação dos oomicetos é essencial para o desenvolvimento de métodos eficazes de controle.

Surfactantes sintéticos são utilizados em associação com fungicidas, herbicidas e inseticidas para reduzir a tensão superficial da água e facilitar a penetração dos produtos na planta. Stanghellini & Tomlinson (1987), demonstraram que a adição de um surfactante sintético a uma suspensão de zoósporos provoca a perda da mobilidade e lise da membrana celular dos mesmos. Além disso, alguns microorganismos antagonistas são capazes de produzir biosurfactantes (Stanghellini & Miller, 1997; Souza *et al.*, 2003). No presente trabalho, a adição de um surfactante juntamente com uma suspensão de zoósporos de *P. deliense* e *P. graminicola* claramente afetou a habilidade dos zoósporos de causarem doença em plântulas de tomate. Entretanto, a severidade da doença induzida por *P. dissotocum* foi afetada pela adição do surfactante apenas nos períodos iniciais da infecção (Tabela 9). Desta forma, tornam-se necessários estudos mais detalhados para verificar se os zoósporos de determinadas espécies são mais tolerantes à ação do produto.

A ocorrência de maior ou menor severidade na doença provocada pelos diferentes isolados do gênero *Pythium* depende tanto da virulência de cada patógeno, quanto da resposta da planta aos mesmos. Uma das respostas induzidas pelas plantas ao ataque de patógenos é a ativação de vias de defesa mediadas por hormônios vegetais. Entre esses, o etileno e o ácido jasmônico são comumente associados à defesa contra patógenos necrotróficos (Glazebrook *et al.*, 2003). No presente estudo, o hormônio vegetal etileno foi usado na forma de etefon, o qual se decompõe em etileno, fosfato e íons cloreto em soluções aquosas (Yang, 1969; citado por Goudey *et al.*, 1987). A adição de etefon levou a completa ausência de necrose em todas as interações analisadas (Figura 7). Porém, observou-se que nessas condições não houve crescimento micelial dos

três isolados do patógeno no meio de cultura. Diversos autores demonstraram a eficácia da utilização de compostos contendo ácidos fosfônicos, neste caso o etefon, para controle de oomicetos, principalmente como indutores de resistência em plantas, mas também com uma direta atividade contra os patógenos (Cohen & Coffey, 1986; Paniker & Gangadharan, 1999; Johnson *et al.*, 2004). Portanto, foi difícil concluir se a redução dos sintomas ocorreu devido à ação dos hormônios sobre os zoósporos ou se foi devido à indução de resistência na planta. Entretanto, o tratamento com o inibidor da síntese de etileno, AVG, em plântulas inoculadas com *P. inflatum* provocou um aumento no número de plantas com necrose (Figura 7), mostrando que o etileno provavelmente desempenha um papel na resposta de tomate a espécies do gênero *Pythium*. A atuação do etileno na defesa contra *Pythium* spp. foi demonstrada em plantas transgênicas de fumo (Tetr) e mutantes de *A. thaliana* (*ein2-1*, *ein2-5*) insensíveis a etileno, as quais apresentaram maior suscetibilidade a infecções causadas por *Pythium* spp. (Geraats *et al.*, 2002; Adie *et al.*, 2007b).

O ácido salicílico é freqüentemente associado à defesa contra patógenos biotróficos (Glazebrook *et al.*, 2003). Entretanto, Achuo *et al.* (2004) mostraram que plantas transgênicas de fumo e tomate que degradam ácido salicílico (*NahG*) apresentaram respostas contrastantes contra o patógeno necrotrófico *B. cinerea*. As plantas transgênicas de tomate foram mais suscetíveis ao patógeno do que plantas tipo selvagem, enquanto que plantas transgênicas e tipo selvagem de tabaco apresentaram um nível semelhante de suscetibilidade, mostrando que esse hormônio tem papel na defesa contra *B. cinerea* em tomate, mas não em fumo (Achuo *et al.*, 2004). A adição desse hormônio em plântulas inoculadas com isolados de *Pythium* spp. resultou em reduções significativas na incidência da

doença causada por *P. deliense* e *P. ultimum* (Figura 7). Entretanto, verificou-se que a adição de ácido salicílico retardou, mas não inibiu completamente, o crescimento do patógeno, sendo que alguns pontos de crescimento micelial foram visualizados no meio de cultura. A toxicidade do ácido salicílico, ou de compostos derivados do mesmo, foi observada no crescimento *in vitro* de *Colletotrichum orbiculare* e *Phytophthora capsici* (Park *et al.*, 2007), mas não teve efeito contra *Penicillium expansum* e *Alternaria alternata* (Qin *et al.*, 2003). Portanto, não se pode descartar a atuação do ácido salicílico na resposta de defesa de tomate contra patógenos do gênero *Pythium*.

Mais recentemente, o papel do ácido abscísico vem sendo estudado em interações planta-patógeno. De acordo com Robert-Seilaniantz *et al.* (2007), o ácido abscísico desencadeia respostas contra estresses abióticos, atuando como antagonista das respostas mediadas por ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno. Os resultados obtidos no presente estudo concordam com esse papel antagonista do ácido abscísico. A incidência da doença em plântulas inoculadas com zoósporos de *P. deliense* e *P. ultimum* e submetidas ao tratamento com esse hormônio vegetal não diferiu do controle inoculado, mas não tratado (Figura 7). Foi verificado ainda que o ácido abscísico não possui um papel essencial na defesa contra patógenos necrotróficos *B. cinerea* e *F. oxysporum* (Audernet *et al.*, 2002; Adie *et al.*, 2007b; Asselbergh *et al.*, 2007). Entretanto, Adie *et al.* (2007b) observaram um aumento na predisposição de mutantes de *A. thaliana* deficientes na biossíntese ou insensíveis ao ácido abscísico à infecção causada por uma espécie do gênero *Pythium*, *P. irregulare*, mostrando que esse hormônio desempenha um papel na defesa contra esse patógeno. Esses resultados

demonstram que as respostas de defesa em plantas envolvendo hormônios não apresentam um padrão comum e são dependentes de interações específicas.

5.2 Caracterização molecular

O reconhecimento de um patógeno pelas plantas resulta na expressão de uma série de genes envolvidos nos mais diversos processos de defesa. Entre esses podem ser citados a síntese de hormônios vegetais, de moléculas tóxicas e de proteínas PR, o reforço da parede celular, entre outros. A baixa severidade da doença observada em plântulas inoculadas com o isolado de *P. inflatum*, levou a hipótese de que as plântulas poderiam apresentar um mecanismo molecular distinto de resposta a esse patógeno, resultando em uma menor predisposição à infecção causada pelo mesmo. Assim, seis genes potencialmente envolvidos na defesa contra *Pythium* spp. foram selecionados e o nível de acúmulo de seus respectivos mRNAs foi analisado em plântulas de tomate após a inoculação com isolados de diferentes espécies do gênero *Pythium*.

Por meio do estudo de mutantes deficientes ou insensíveis aos hormônios vegetais ácido abscísico, ácido jasmônico, ácido salicílico e etileno, foi demonstrado que a sinalização por ácido jasmônico consiste na principal via de defesa contra *P. irregulare* em *A. thaliana*. Porém, vias de defesa mediadas pelos demais hormônios também contribuem para a defesa, sendo que a expressão de muitos genes de defesa dependia do sinergismo entre as vias (Adie *et al.*, 2007b). Deste modo, tornou-se importante a seleção de genes envolvidos nas vias de sinalização mediadas por hormônios vegetais. O gene *ERF1* é um fator de transcrição que pertence à família de proteínas que se ligam a elementos que respondem ao etileno (EREBP), e cujos membros atuam como reguladores de

genes envolvidos nas vias de sinalização mediadas por etileno e ácido jasmônico (Lorenzo *et al.*, 2003; Hongxing *et al.*, 2005). Além disso, a infecção de *Arabidopsis thaliana* por *B. cinerea* induz a expressão deste fator de transcrição. Já, a escolha do gene *LOXD*, foi baseada na atuação das lipoxigenases (Lox) na biossíntese de oxilipinas como o ácido jasmônico (Porta & Rocha-Sosa, 2002). A expressão de genes *LOX* pode ser regulada por fatores como ferimentos, infecção por patógenos (Porta *et al.*, 2008) e ácido jasmônico (Heitz *et al.*, 1997), entre outros. Por fim, a atuação do ácido salicílico na resposta aos diferentes isolados do gênero *Pythium* foi investigada pela análise do acúmulo de mRNA dos genes *PR-1* e *PR-5*, os quais são ligadas a respostas de defesa mediadas por esse hormônio vegetal (Thatcher *et al.*, 2005).

A infecção do tecido vegetal por espécies do gênero *Pythium* envolve a liberação de uma série de enzimas hidrolíticas que degradam a parede celular de plantas (Campion *et al.*, 1997; Boudjeko *et al.*, 2006). Assim, o reforço da parede celular consiste em um mecanismo potencialmente envolvido na defesa contra esses patógenos. Um dos principais componentes da parede celular vegetal são as glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (HPRG), grupo ao qual pertencem as extensinas (Sommer-Knudsen *et al.*, 1998). Ribeiro *et al.* (2006) demonstraram que um tipo de extensina de *Vitis vinifera*, denominada GvP1, forma uma rede juntamente com outras proteína da parede celular, aumentando a resistência da mesma contra enzimas hidrolíticas. Por fim, o gene *CEL1* codifica uma endo- β -1,4-glucanase responsável pelo amolecimento do tecido vegetal durante o amadurecimento (Real *et al.*, 2004). Sua escolha se baseia na hipótese de que esse gene pode ser reprimido como uma resposta de defesa contra a infecção pelos isolados de *Pythium* spp., pois Flors *et al.* (2007) demonstraram que o

silenciamento deste gene reduziu a predisposição de tomate à infecção por *B. cinerea*.

A fim de se estudar o papel dos genes selecionado na resposta de tomate à *Pythium* spp., foi escolhido o método de quantificação relativa por PCR em tempo-real, a qual é uma ferramenta sensível e robusta para a quantificação da abundância de mRNAs específicos. Inicialmente, é essencial verificar a eficiência de amplificação de cada oligonucleotídeo iniciador utilizado. Teoricamente, a cada ciclo da PCR a quantidade de produto amplificado dobra, caso a eficiência de amplificação seja de 100% (Schefe *et al.*, 2006). Isso dificilmente ocorre, portanto, segundo Dorak (2006), os valores de eficiência devem estar compreendidos entre 90% e 110%. Além disso, a eficiência de amplificação dos genes de interesse deve ser similar a eficiência do controle endógeno (Livak & Schmittgen, 2001). No presente estudo, apenas o valor da eficiência da amplificação com o oligonucleotídeo iniciador Cel1 não ficou compreendido nesta faixa, motivo pelo qual o mesmo não foi utilizado nas análises de quantificação relativa.

Outro teste de verificação da qualidade dos dados obtidos consiste na adição de uma etapa de dissociação ao final da reação de amplificação. Nesta etapa, a temperatura é elevada até 95°C, provocando a desnaturação dos produtos amplificados. Desta forma, o corante intercalante *SYBR Green* se dissocia das fitas duplas de DNA e, conseqüentemente, a fluorescência emitida pelo mesmo diminui. Após, observa-se um pico de fluorescência correspondente à temperatura de dissociação (T_m) do produto amplificado, a qual é dependente do tamanho e da composição de bases do produto (Ponchel *et al.*, 2003). Deste modo, em uma amplificação específica, somente um pico deve ser observado na curva de dissociação. A presença de picos não específicos pode comprometer a

análise, pois o agente intercalante *SYBR Green* se liga a qualquer molécula de fita dupla, de modo que a fluorescência de ambos os produtos é captada pelo aparelho, superestimando a quantidade de produto amplificado e afetando a eficiência de amplificação (Bustin & Nolan, 2004). Como a presença de um produto inespecífico não prejudicou a eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos iniciadores *Gapdh* (101%), *ERF1* (96%) e *Ext* (99%), os mesmos foram utilizados no presente estudo.

A inoculação de plântulas de tomate com isolados de *Pythium* spp. levou a diferentes níveis de acúmulo ou redução dos transcritos dos genes estudados, os quais foram relacionados com a interação estudada. A resposta desencadeada pelas plantas à infecção por patógenos é altamente específica, dependendo do genótipo da planta e dos mecanismos utilizados pelo patógeno para causar doença (Desender *et al.*, 2007). Como foi observado na caracterização biológica, cada isolado possui um mecanismo distinto para causar infecção, de modo que a plântula deve responder de maneira diferente. Além disso, verificou-se que tanto a via de sinalização mediada por etileno e ácido jasmônico, representada pelos genes *ERF1* e *LOXD*, quanto a via de sinalização do ácido salicílico, representada pelos genes *PR-1A1* e *PR-5*, estão envolvidas na resposta de plântulas de tomate à infecção causada pelos isolados de *Pythium* spp., como foi observado em *A. thaliana* (Adie *et al.*, 2007b).

Em geral, dois dias após a inoculação o acúmulo de mRNAs de cada um dos genes foi mais baixo e as diferenças entre as interações com cada isolado foram mais evidentes. Entretanto, o acúmulo de mRNAs cinco dias após a inoculação não foi acompanhado por uma diminuição na severidade da doença. De mesmo modo, Flors *et al.* (2007) verificaram que o aumento no acúmulo de

transcritos dos genes *PR-1* e *LOXD* em plantas de tomate após a infecção pelo patógeno necrotrófico *B. cinerea* foi acompanhado por uma maior severidade da doença.

Um dos mais importantes mecanismos para a defesa de plantas contra patógenos consiste no reforço da parede celular a fim de evitar ou dificultar a entrada de microrganismos. Devido aos altos níveis de mRNA do gene *EXT*, verificou-se que este mecanismo também é utilizado pelas plântulas de tomate na defesa contra *Pythium* spp.. Porém, o maior acúmulo destes transcritos não foi suficiente para impedir a infecção e colonização do tecido do hospedeiro pelos isolados de *Pythium* spp..

De acordo com as análises de expressão gênica realizadas, verificou-se que a baixa severidade da doença observada em plântulas inoculadas com *P. inflatum* é devida à baixa agressividade do patógeno, como foi observado por Robertson (1973, citado por van der Plaats-Niterink, 1981). Com algumas exceções, os níveis de expressão dos genes analisados foram baixos na interação de plântulas de tomate com esse isolado. *P. inflatum* apresenta uma lenta taxa de crescimento em meio de cultura, de 10 mm.dia⁻¹ (Plaats-Niterink, 1981), o que provavelmente contribuiu para a reduzida severidade da doença e acúmulo de genes de defesa. De mesmo modo, plântulas inoculadas com *P. ultimum* também apresentaram uma menor abundância de mRNA dos genes avaliados, em comparação com os outros isolados. A caracterização biológica da doença provocada por *P. inflatum* e *P. ultimum* mostrou que, inicialmente, a severidade dos sintomas provocados por esses isolados é semelhante. No entanto, a severidade da doença causada por *P. ultimum* evoluiu rapidamente, enquanto que em plântulas inoculadas com *P. inflatum* a severidade se mantém

baixa. Segundo Campion *et al.* (1997), *P. ultimum* produz uma grande quantidade de enzimas hidrolíticas que maceram o tecido do hospedeiro, contribuindo para a rapidez com que os sintomas provocados por esse isolado evoluem e impedindo a indução de uma resposta de defesa bem sucedida pela planta.

Plântulas inoculadas com *P. graminicola* apresentaram uma forte indução de todos os genes analisados dois dias após a inoculação. Além disso, os experimentos biológicos mostraram que esse isolado induz sintomas mais rapidamente nas plântulas quando comparado com os outros isolados. MacDonald *et al.* (2002) demonstraram que a força exercida pela hifa deste patógeno não é suficiente para penetrar no tecido vegetal. Deste modo, a ação de enzimas hidrolíticas é necessária para a ocorrência de infecção. Isso pode fazer com que a plântula detecte este isolado no início do processo de infecção. Entretanto, essa forte indução inicial foi seguida pela redução nos níveis de expressão cinco dias após a inoculação. Fagoaga *et al.* (2001) demonstraram que a superexpressão de *PR-5* em *Citrus sinensis* reduziu a severidade dos sintomas após a inoculação com um oomiceto causador de podridão, *Phytophthora citrophthora*. Deste modo, a superexpressão de algum desses genes em plântulas de tomate faria com que os níveis de expressão dos mesmos se mantivessem altos por mais tempo, o que poderia levar a uma redução na severidade da doença.

Apesar da implicação da indução da atividade de proteínas PR-1 e PR-5 pelo hormônio vegetal ácido salicílico (Thomma *et al.*, 1998), verificou-se um aumento no acúmulo de mRNAs de ambas também em plântulas tratadas com etefon, um composto que libera etileno. O papel do etileno na indução de ambos os genes foi ainda confirmado pela redução na abundância de transcritos após o

tratamento das plântulas com AVG. Esse composto químico atua inibindo a enzima ACC sintase, uma enzima chave na via de síntese de etileno (Kim & Hwang, 2000). No experimento biológico foi observado que o tratamento com etefon e ácido salicílico promoveu uma redução na incidência da doença em plântulas inoculadas com o isolado de *P. deliense*. Porém, esse fenótipo não é explicado pela indução de *PR1A1* e *PR-5*, pois o acúmulo de mRNA de ambos os genes foi também alto em plântulas inoculadas e não tratadas com esses compostos. Ambos os genes são associados à resposta de hipersensibilidade, que consiste na morte celular localizada, observada na resistência de plantas contra patógenos biotróficos (Glazebrook, 2005; Guinetti-Gonzalez *et al.*, 2007; Királi *et al.*, 2007). Portanto, uma maior abundância nos transcritos dos genes *PR-1A1* e *PR-5* pode estar associada à morte celular induzida pelo patógeno.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que os genes selecionados não estão relacionados a uma redução na severidade da doença em plântulas infectadas com os isolados de *Pythium* spp.. Porém, a expressão dos mesmos foi induzida diferencialmente de acordo com o isolado do patógeno envolvido na interação. Deste modo, outros estudos devem ser conduzidos a fim de aprofundar a caracterização da resposta de plântulas de tomate aos diferentes isolados. Além disso, outros cultivares de tomate devem ser testados na busca de resistência contra *Pythium* spp..

6. CONCLUSÕES

Os cinco isolados de diferentes espécies do gênero *Pythium* avaliados no presente trabalho são patogênicos a plântulas de *S. lycopersicum*, porém diferem na severidade da doença induzida.

O isolado de *P. ultimum* se mostrou altamente dependente da concentração de inóculo na indução de sintomas em *S. lycopersicum*, sendo a concentração ótima variável para os outros isolados.

A severidade da doença aumenta em função do tempo nas plântulas inoculadas com quaisquer dos isolados, sendo que os sintomas provocados pelo isolado de *P. ultimum* evoluíram rapidamente.

Os genes *ERF1*, *LOXD*, *PR-1A1*, *PR-5* e *EXT* são induzidos de modo diferencial em plântulas de tomate, de acordo com o isolado envolvido na interação.

O acúmulo de mRNAs dos genes *ERF1*, *LOXD*, *PR-1A1*, *PR-5* e *EXT* não está relacionado com uma maior resistência de plântulas de tomate à infecção causada por isolados de diferentes espécies do gênero *Pythium*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHUO, E.A.; AUDERNET, K.; MEZIANE, H. *et al.* The salicylic acid-dependent defence pathway is effective against different pathogens in tomato and tobacco. **Plant Pathology**, Oxford, v. 53, p. 65-72, 2004.

ADIE, B.; CHICO, J.M.; RUBIO-SOMOZA, I. *et al.* Modulation of plant defenses by ethylene. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 26, p. 160-177, 2007a.

ADIE, B.A.T.; PÉREZ-PÉREZ, J.; PÉREZ-PÉRES, M.M. *et al.* ABA is an essential signal for plant resistance affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 19, p. 1665-1681, 2007b.

ALI-SHTAYEH, M.S.; SALEH, A.S.F. Isolation of *Pythium acanthicum*, *P. oligandrum*, and *P. periplocum* from soil and evaluation of their mycoparasitic activity and biocontrol efficacy against selected phytopathogenic *Pythium* species. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 145, p. 143-153, 1999.

APPIAH, A.A.; VAN WEST, P.; OSBORNE, M.C. *et al.* Potassium homeostasis influences the locomotion and encystment of zoospores of plant pathogenic oomycetes. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 42, p. 213-223, 2005.

ASSELBERGH, B.; CURVERS, K.; FRANÇA, S.C. *et al.* Resistance to *Botrytis cinerea* in *sitiens*, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis. **Plant Physiology**, Washington, v. 144, p. 1863-1877, 2007.

ATKINS, S.D.; CLARK, I.M. Fungal molecular diagnostics: a mini review. **Journal of Applied Genetics**, Poland, v. 45, p. 3-15, 2004.

AUDENAERT, K.; MEYER, G.B.; HOFTE, M.M. Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. **Plant Physiology**, Washington, v. 128, p. 491-501, 2002.

BERROCAL-LOBO, M.; MOLINA, A.; SOLANO, R. Constitutive expression of ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. **The Plant Journal**, Oxford, v.29, p.23-32, 2002.

BERROCAL-LOBO, M.; MOLINA, A. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 mediates *Arabidopsis* resistance to the soilborne fungus *Fusarium oxysporum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.17, p.763-770, 2004.

BHATTI, M.A.; KRAFT, A.M. Effects of inoculum density and temperature on root rot and wilt of chickpea. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 76, p. 50-54, 1992.

BIRCH, P.R.J.; REHMANY, A.P.; PRITCHARD, L. et al. Trafficking arms: oomycete effectors enter host plant cells. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v.14, p.8-11, 2006.

BOSCO, S.M.G.; BAGAGLI, E.; ARAÚJO Jr., J.P. et al. Human pythiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 11, p. 715-718, 2005.

BOUDJEKO, T.; ANDÈME-ONZIGHI, C.; VICRÉ, M. et al. Loss of pectin is an early event during infection of cocoyam roots by *Pythium myriotylum*. **Planta**, Berlin, v. 223, p. 271-282, 2006.

BRASIL. Instrução Normativa Conjunta N° 1, de 10 de setembro de 2002. Estabelece critério para utilização de Brometo de metila. **Diário Oficial da União[da República Federativa do Brasil]**, Brasília, 11 set 2002, p. 11, Seção 1.

BRODHAGEN, M.; HENKELS, M.D.; LOPER, J.E. Positive autoregulation and signaling properties of pyoluteorin, an antibiotic produced by the biological control organism *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 1758-1766, 2004.

BUGOS, R.C.; CHIANG, V.I.; ZHANG, X.H. et al. RNA isolation from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine. **BioTechniques**, Natick, v. 19, n.5, p. 734-737, 1995.

BUSTIN, S.A.; NOLAN, T. Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. **Journal of Biomolecular Techniques**, Bethesda, MD, v. 15, p.155-166, 2004.

CABI Biosciences. **Index Fungorum**. Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org>> Acesso em: dez. 2007.

CAMPION, C.; MASSIOT, P.; ROUXEL, F. Agressiveness and production of cell-wall degrading enzymes by *Pythium violae*, *Pythium sulcatum* and *Pythium ultimum*, responsible for cavity spot on carrots. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, p. 725-735, 1997.

CHELLEMI, D.O.; MITCHELL, D.J.; RAYSIDE, P.A. et al. *Pythium* spp. associated with bell pepper production in Florida. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, p. 12-71-1274, 2000.

CHÉRIF, M.; TIRILLY, Y. E BÉLANGER, R.R. Effect of oxygen concentration on plant growth, lipidperoxidation, and receptivity of tomato roots to *Pythium* F under

hydroponic conditions. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.103, p.255-264, 1997.

CHISHOLM, S.T.; COAKER, G.; DAY, B. et. al. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. **Cell**, Cambridge, v.124, p.803-814, 2006.

COHEN, Y.; COFFEY, M.D. Systemic fungicides and the control of oomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 311-328, 1986.

COOK, A.W.A.M. de; MENDOZA, L.; PADHYE, A.A. *Pythium insidiosum* sp. nov., the etiologic agent of pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 25, p. 344-349, 1987.

COSTA, J. Reacción em cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. **Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica**, Barcelona, v.22, n.5, p.299-305. 2004.

DEACON, J.W. Ecological implications of recognition events in the pre-infection stages of root pathogens. **New Phytologist**, Cambridge, v. 133, p. 135-145, 1996.

DESENDER, S.; ANDRIVON, D.; VAL, F. Activation of defense reactions in *Solanaceae*: where is the especificity? **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 9, p. 21-30, 2007.

DÍAZ, J.; HAVE, A.T.; VAN KAN, J.A.L. The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. **Plant Physiology**, Washington, v. 129, p. 1341-1351, 2002.

DJONOVIC, S.; POZO, M.J.; KENERLEY, C.M. Tvbgn3, a β -1,6-Glucanase from the biocontrol fungus *Trichoderma virens*, is involved in mycoparasitism and control of *Pythium ultimum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 7661-7670, 2006.

DONALDSON, S.P.; DEACON, J.W. Effects of amino acids and sugars on zoospore taxis, encystment and cyst germination in *Pythium aphanidermatum* (Edson) Eitzp., *P. catenulatum* Matthews and *P. dissotocum* Drechs. **New Phytologist**, Cambridge, v. 123, p. 289-295, 1993.

DORAK, M.D. **Real-Time PCR**. Disponível em: <<http://dorakmt.tripod.com/genetics/realtime.html>> Acesso em: fev. 2008.

EMBRAPA. **Cultivo de tomate para industrialização**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Tomate/TomateIndustrial/clima.htm>> Acesso: ago. 2006.

ENKERLI, J.; BHATT, G.; COVERT, S.F. Maackiain detoxification contributes to the virulence of *Nectria haematococca* MP VI on chickpea. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.11, p.317-326, 1998.

FAGOAFA, C.; RODRIGO, I.; CONEJERO, V. *et al.* Increased tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v.7, p. 175-185, 2001.

FERRARI, S.; PLOTNIKOVA, J.M.; DE LORENZO, G. *et al.* *Arabidopsis* local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires *EDS4* and *PAD2*, but not *SID2*, *EDS5* or *PAD4*. **The Plant Journal**, Oxford, v.35, p.193-205, 2003.

FLORS, V.; LEYVA, M. de la O.; VICEDO, B. *et al.* Absence of the endo- β -1,4-glucanases Cel1 e Cel2 reduces susceptibility to *Botrytis cinerea* in tomato. **The Plant Journal**, Oxford, v. 52, p. 1027-1040, 2007.

FLORS, V.; TON, J.; JAKAB, G. *et al.* Abscisic acid and callose: team players in defense against pathogens? **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 155, p. 377-383, 2005.

FOLMAN, L.B.; POSTMA, J.; VAN VEEN, J.A. Characterisation of *Lysobacter enzymogenes* (Christensen and Cook 1978) strain 3.1T8, a powerful antagonist of fungal diseases of cucumber. **Microbiological Research**, Jena, v.158, p.107-115, 2003.

FRANCIS, D.M.; ST. CLAIR, D.A. Population genetics of *Pythium ultimum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, p. 454-461, 1997.

GERAATS, B.P.J.; BAKKER, P.A.H.M.; LAWRENCE, C.B. *et al.* Ethylene-insensitive tobacco shows differentially altered susceptibility to different pathogens. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, p. 813-82, 2003.

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

GLAZEBROOK, J.; CHEN, W.; ESTES, B. *et al.* Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. **The Plant Journal**, Oxford, v. 34, p. 217-228, 2003.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.43, p.205-227, 2005.

GEORGAKOPOULOS, D.G.; FIDDAMAN, P.; LEIFERT, C. *et al.* Biological control of cucumber and sugar beet damping-off caused by *Pythium ultimum* with bacterial and fungal antagonists. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 92, p. 1078-1086, 2002.

GOVRIN, E.M.; LEVINE, A. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. **Current Biology**, London, v.10, p.751-757, 2000.

GÖTESSON, A.; MARSHAL, J.S; JONES, D.A. *et al.* Characterization and evolutionary analysis of a large polygalacturonase gene family in the oomycete plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 9, p. 907-921, 2002.

GRAVEL, V.; MARTINEZ, C.; ANTOUN, H. *et al.* Antagonist microorganisms with the ability to control *Pythium* damping-off of tomato seeds in rockwool. **Biocontrol**, Dordrecht, v.50, p.771-786, 2005.

GOUDEY, J.S.; SAINI, H.S.; SPENCER, M.S. Uptake and fate of ethephon ([2-Chloroethyl] Phosphonic Acid) in dormant weed seeds. **Plant Physiology**, Washington, v. 85, p. 155-157, 1987.

GUIDETTI-GONZALEZ, S.; FREITAS-ASTÚA, J.; AMARAL, A.M. *et al.* Genes associated with hypersensitive response (HR) in the citrus EST database (CitEST). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, p. 943-956, 2007.

HAMMERSCHMIDT, R. Phytoalexins: what have we learned after 60 years? **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 285-306, 1999.

HARDHAM, A.R. Cell biology of plant-oomycete interactions. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 9, p. 31-39, 2007.

HEITEFUSS, R. Defence reactions of plants to fungal pathogens: principles and perspectives, using powdery mildew on cereals as an example. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 88, p. 273-283, 2001.

HEITZ, T.; BERGEY, D.R.; RYAN, C.A. A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. **Plant Physiology**, Washington, v. 114, p. 1085-1093, 1997.

HENDRIX, F.F.; CAMPBELL, W.A. *Pythium* as a plant pathogen. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.11, p.77-98, 1973.

HERRERO, M.L.; HERMANSEN, A.; ELEN, O.N. Occurrence of *Pythium* spp. and *Phytophthora* spp. in norwegian greenhouses and their pathogenicity on cucumber seedlings. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 151, p. 36-41, 2003.

HEUNGES, K.; PARKE, J.L. Zoospore homing and infection events: effects of the biocontrol bacterium *Burkholderia cepacia* AMMDR1 on two oomycete pathogens of pea (*Pisum sativum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 5192-5200, 2000.

HIGGINBOTHAM, R.W.; PAULITZ, T.C.; KIDWELL, K.K. Virulence of *Pythium* species isolated from wheat fields in eastern Washington. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, p. 1021-1026, 2004.

HONGXING, Z.; BENZHONG, Z.; BIANYUN, Y. *et al.* Cloning and DNA-binding properties of ethylene response factor, LeERF1 and LeERF2, in tomato. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 27, p. 423-428, 2005.

HSIANG, T.; WU, C.; YANG, L. *et al.* Pythium root rot associated with cool-season dieback of turfgrass in Ontario and Quebec. **Canadian Plant Disease Survey**, Ottawa, v. 72, p. 191-195, 1995.

HÜCKELHOVEN, R. Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 45, p. 101-127, 2007.

HUET, J-C.; CAER, J-P. Le; NESPOULOS, C. *et al.* The relationships between the toxicity and the primary and secondary structures of elicitorlike protein elicitors secreted by the phytopathogenic fungus *Pythium vexans*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 8, p. 302-310, 1995.

HUFFAKER, A.; PEARCE, G.; RYAN, C.A. An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.103, p.10098-10103, 2006.

ISLAM, M.T.; TAHARA, S. Chemotaxis of fungal zoospores, with special reference to *Aphanomyces cochlioides*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 65, p. 1933-1948, 2001.

JOHNSON, D.A.; INGLIS, D.A.; MILLER, J.S. Control of potato tuber rots caused by oomycetes with foliar applications of phosphorous acid. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, p. 1153-1159, 2004.

KAMOUN, S. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p. 41-60, 2006.

KAMOUN, S.; HUITEMA, E. VLEESHOUWERS, V.G.A.A. Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response? **Trends in Plant Science**, Oxford, v.4, p.196-200, 1999.

KIM, Y.J.; HWANG; B.K. Pepper gene encoding a basic pathogenesis-related 1 protein is pathogen and ethylene inducible. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 108, p. 51-60, 2000.

KIRÁLY, L.; BARNA, B.; KIRÁLY, Z. Plant resistance to pathogen infection: forms and mechanisms of innate and acquired resistance. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.155, p. 385-396, 2007.

KLEIN, D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. **Trends in Molecular Medicine**, London, v. 8, p. 257-260, 2002.

KOBAYASHI, D.Y.; REEDY, R.M.; PALUMBO, J.D. *et al.* A *clp* gene homologue belonging to the Crp gene family globally regulates lytic enzyme production,

antimicrobial activity, and biological control activity expressed by *Lysobacter enzymogenes* strain C3. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 261-269, 2005.

KOBAYASHI, Y.; YAMADA, M.; KOBAYASHI, I. *et al.* Actin microfilaments are required for the expression of nonhost resistance in higher plants. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 38, p. 725-733, 1997.

KUCHAREK, T.; MITCHELL, D. **Diseases of agronomic and vegetable crops caused by *Pythium***. Plant Pathology Fact Sheet. University of Florida, 2000. Disponível em: <<http://128.227.207.24/takextpub/FactSheets/pp53.pdf>>. Acesso em: ago. 2007.

LASCOMBE, M-B.; RETAILLEAU, P.; POLCHET, M. *et al.* Structure of sylvaticin, a new α -elicitor-like protein from *Pythium sylvaticum*. **Acta Crystallographica**, Copenhagen, v. D63, p. 1102-1108, 2007.

LIPKA, V.; DITTGEN, J.; BEDNAREK, P. *et al.* Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in Arabidopsis. **Science**, Washington, v. 310, p. 1180-1183, 2005.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. **Methods**, San Diego, v. 25, p. 402-408, 2001.

LORENZO, O.; PIQUERAS, R.; SÁNCHEZ-SERRANO, J.J. *et al.* ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. **The Plant Cell**, Rockville, v.15, p.165-178, 2003.

LORENZO, O.; SOLANO, R. Molecular players regulating the jasmonate signalling network. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.8, p. 532-540, 2005.

LU, Z.; TOMBOLINI, R.; WOO, S. *et al.* *In vivo* study of *Trichoderma*-pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, p.3073-3081, 2004.

MACDONALD, E.; MILLWARD, L.; RAVISHANKAR, J.P. *et al.* Biomechanical interaction between hyphae of two *Pythium* species (Oomycota) and host tissues. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 37, p. 245-249, 2002.

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

MAUCH-MANI, B.; MAUCH, F. The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 8, p. 409-414, 2005.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Sistema de Agrotóxicos fitossanitários.** Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons Acesso: dez. 2007.

MURASHIGE, T; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. **Plant Physiology**, Washington, v.15, p.473–493, 1962.

MURPHY, A.; TAIZ, L. Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in tem *Arabidopsis* ecotypes. **Plant Physiology**, Washington, v. 109, p. 945-954, 1995

NOGUEIRA, F.T.S.; COSTA, M.G., FIGUEIRA, M.L. *et al.* Regeneração *in vitro* de plantas de tomateiros 'santa Clara' e seu mutante natural 'firme'. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, p.63-71, 2001.

OSBOURN, A.E. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 1821-1831, 1996a.

OSBOURN, A.E. Saponins and plant defence: a soap story. **Trends in Plant Sciences**, Oxford, v. 1, p. 4-9, 1996b.

O'SULLIVAN, D.J.; O'GARA, F. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 56, p. 662-676, 1992.

PANICKER, S.; GANGADHARAN, K. Controlling downy mildew of maize caused by *Peronosclerospora sorghi* by foliar sprays of phosphonic acid compounds. **Crop Protection**, Guildford, v. 18, p. 115-118, 1999.

PANTHEE, D.R.; YUAN, J.S.; WRIGHT, D.L. *et al.* Gene expression analysis in soybean in response to the causal agent of Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow) in an early growth stage. **Functional and Integrative Genomics**, Berlin, v. 7, p. 291-301, 2007.

PARK, C.N.; LEE, D.; KIM, W. *et al.* Antifungal activity of salaceyin A against *Colletotrichum orbiculare* and *Phytophthora capsici*. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 47, p. 332-339, 2007.

PAUL, B.; BALA, K.; GOGNIES, S. *et. al.* Morphological and molecular taxonomy of *Pythium longisporangium* sp. nov. isolated from Burgundian region of France. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.246, p.207-212, 2005.

PAULITZ, T.C.; BÉLENGER, R.R. Biological control in greenhouse systems. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 39, p. 103-133, 2001.

PICARD, K., PONCHET, M.; BLEIN, J-P. Oligandrin. A proteinaceous molecule produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum* induces resistance to *Phytophthora parasitica* infection in tomato plants. **Plant Physiology**, Washington, v. 124, p. 379-395, 2000.

PORTA, H.; FIGUEROA-BALDERAS, R.E.; ROCHA-ROSA, M. Wounding and pathogen infection induce a chloroplast-targeted lipoxygenase in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Planta**, Berlin, v. 227, p. 363-373, 2008.

PORTA, H.; ROCHA-ROSA, M. Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. **Plant Physiology**, Washington, v. 130, p. 15-21, 2002.

PONCHEL, F.; TOOMES, C.; BRANSFIELD, K. *et al.* Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. **BMC Biotechnology**, Inglaterra, v. 3. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1472-6750/3/18>> Acesso em: Fev. 2008.

QIN, G.Z.; TIAN, S.P.; XU, Y. *et al.* Enhancement of biocontrol efficacy of antagonistic yeasts by salicylic acid in sweet cherry fruit. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 62, p. 147-154, 2003.

QUIRINO, B.F.; BENT, A.F. Deciphering host resistance and pathogen virulence: the *Arabidopsis/Pseudomonas* interaction as a model. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v.4, p.517-530, 2003.

QUTOB, D.; KEMMERLING, B.; BRUMMER, F. *et al.* Phytotoxicity and innate immune responses induced by Nep1-Like Proteins. **The Plant Cell**, Rockville, v. 18, p. 3721-3744, 2006.

RAFTOYANNIS, Y., DICK, M.W. Zoospore encystment and pathogenicity of *Phytophthora* and *Pythium* species on plant roots. **Microbiological Research**, Jena, v. 161, p. 1-8, 2006.

REAL, M.D.; COMPANY, P.; GARCÍA-AGUSTÍN, P. *et al.* Characterization of tomato endo-beta-1,4-glucanase Cel1 protein in fruit during ripening and after fungal infection. **Planta**, Berlin, v. 220, p. 80-86, 2004.

RIBEIRO, J.M.; PEREIRA, C.S.; SOARES, N.C. *et al.* The contribution of extensin network formation to rapid, hydrogen peroxide-mediated increases in grapevine callus wall resistance to fungal lytic enzymes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, p. 2025–2035, 2006.

ROBERT-SEILANIANZ, A.; NAVARRO, L.; BARI, R. *et al.* Pathological hormone imbalances. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 10, p. 372-379, 2007.

SCHEFE, J.H.; LEHMANN, K.E.; BUSCHMANN, I.R. *et al.* Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel “gene expression’s C_T difference” formula. **Journal of Molecular Medicine**, Amsterdam, v. 84, p. 901-910, 2006.

SCHENK, P.M.; KAZAN, K.; WILSON, I. *et al.* Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 97, p. 11655-11660, 2000.

SHIH, M.C.; HEINRICH, R.; GOODMAN, H.M. Cloning and chromosomal mapping of nuclear genes encoding chloroplast and cytosolic glyceraldehydes-3-phosphate-dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. **Gene**, Amsterdam, v. 119, p. 317-319, 1992.

SIVASANKAR, S.; SHELDRIK, B.; ROTHSTEIN, S.J. Expression of Allene Oxide Synthase determines defense gene activation in tomato. **Plant Physiology**, Washington, v. 122, p. 1335-1342, 2000.

SOMMER-KNUDSEN, J.; BACIC, A.; CLARKE, A.E. Hydroxyproline-rich plant glycoproteins. **Phytochemistry**, New York, v. 47, p. 483-497, 1998.

SOUZA, J.T.; BOER, M. de; WAARD, P. *et al.* Biochemical, genetic, and zoosporicidal properties of cyclic lipopeptide surfactants produced by *Pseudomonas fluorescens*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 7161-7172, 2003.

STANGHELLINI, M.E.; MILLER, R.M. Biosurfactants. Their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, p. 4-12, 1997.

STANGHELLINI, M.E.; TOMLINSON, J.A. Inhibitory and lytic effects of a nonionic surfactant on various asexual stages in the life cycle of *Pythium* and *Phytophthora* species. **Phytopathology**, Palo Alto, v. 77, p. 112-114, 1987.

STASWICK, P.E.; YUEN, G.Y.; LEHMAN, C.C. Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 15, p. 747-754, 1998.

TAO, Y.; XIE, Z.; CHEN, W. *et al.* Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, p. 317-330, 2003.

THATCHER, L.F.; ANDERSON, J.P.; SINGH, K.B. Plant defence responses: what have we learnt from *Arabidopsis*? **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 32, p. 1-19, 2005.

THOMMA, B.P.H.J.; EGGERMONT, K.; PENNINGCKX, I.A.M.A. *et al.* Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 15107-15111, 1998.

THOMMA, B.P.H.J.; NELISSEEN, I.; EGGERMONT, K. *et al.* Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 19, p. 163-171, 1999.

TOMLINSON, J.A.; BARKER, I.; BOONHAM, N. Faster, simpler, more-specific methods for improved molecular detection of *Phytophthora ramorum* in the field. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 4040-4047, 2007.

TYLER, B.M. Molecular basis of recognition between *Phytophthora* pathogens and their hosts. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 137-167, 2002.

VAN DER PLAATS-NITERINK, J. Monograph of the genus *Pythium*. **Studies in Mycology**, n.21, 1981. Disponível em: <http://www.cbs.knaw.nl/simonline/sim_021/sim21.htm> Acesso em: dez. 2007.

VAN DIJK, K.; NELSON, E.B. Fatty acid competition as a mechanism by which *Enterobacter cloacae* suppresses *Pythium ultimum* sporangium germination and damping-off. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 5340-5347, 2000.

VAN KAN, J.A. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.11, p.247-253, 2006.

VAN LOON, L.C.; GERAATS, B.P.J.; LINTHORST, H.J.M. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.11, p.184-191, 2006a.

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

VAN WEST, P.; APPIAH, A.A.; GOW, N.A.R. Advances in research on oomycete root pathogens. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 62, p.99-113, 2003.

VEIT, S.; WÖRLE, J.M.; NÜRNBERGER, T. *et al.* A novel protein elicitor (PaNie) from *Pythium aphanidermatum* induces multiple defense responses in carrot, *Arabidopsis*, and tobacco. **Plant Physiology**, Washington, v.127, p.832-841, 2001.

VIJAYAN, P.; SHOCKEY, J.; LÉVESQUE, C.A. *et al.* A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 7209-7214, 1998.

WASTERACKA, C.; STENZELA, I.; HAUSEB, B. *et al.* The wound response in tomato – Role of jasmonic acid. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 163, p. 297-306, 2006.

WELLER, S.A.; BERESFORD-JONES, N.J.; HALL, J. *et al.* Detection of *Xanthomonas fragariae* and presumptive detection of *Xanthomonas arboricola* pv.

fragariae, from strawberry leaves, by real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 70, p. 379–383, 2007.

YAN, H-Z.; LIU, R-F. Cloning and analysis of pppg1, an inducible endopolygalacturonase gene from the oomycete plant pathogen *Phytophthora parasitica*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 42, p. 339-350, 2005.

YAZAKI, K. ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 580, p. 1183-1191, 2005.

8. APÊNDICES

Apêndice 1: Tabela de análise de variância. Avaliação da severidade da doença causada por isolados de cinco espécies do gênero *Pythium* em plântulas de *Solanum lycopersicum* na temperatura de 20°C.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F	p
Espécie	5	298,44	59,69	37,66	<0,0001
Concentração	3	25,85	8,62	5,44	0,0022
Repetição (concentração)	12	29,02	2,42	1,53	0,1401
Espécie*Concentração	15	49,19	3,28	2,07	0,0244
Erro	60	95,09	1,58		
Total	95	497,59			

CV = 42%

Apêndice 2: Tabela de análise de variância. Avaliação da severidade da doença causada por isolados de cinco espécies do gênero *Pythium* em plântulas de *Solanum lycopersicum* na temperatura de 25°C.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F	p
Espécie	5	250,35	50,07	34,82	<0,0001
Concentração	3	34,88	11,62	8,09	0,0001
Repetição (concentração)	12	23,66	1,97	1,37	0,2049
Espécie*Concentração	15	69,82	4,66	3,24	0,0006
Erro	60	86,28	1,44		
Total	95	464,99			

CV = 40%

Apêndice 3: Tabela de análise de variância. Avaliação da severidade da doença causada por isolados de cinco espécies do gênero *Pythium* em plântulas de *Solanum lycopersicum* na temperatura de 30°C.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F	p
Espécie	5	408,68	81,74	85,04	<0,0001
Concentração	3	22,3	7,43	7,73	0,0002
Repetição (concentração)	12	14,49	1,21	1,26	0,2682
Espécie*Concentração	15	100,56	6,7	6,97	<0,0001
Erro	60	57,67	0,96		
Total	95	603,7			

CV = 30%

Apêndice 4: Ciclo limiar (Ct), médias, desvio padrão (DP) e níveis de acúmulo de mRNA obtidos para *ERF1* em plântulas de *Solanum lycopersicum* a 20°C ± 2°C, após a inoculação com isolados de *Pythium* spp.. Dai=dias após a inoculação; Pgra=*P. graminicola*; Pdel=*P. deliense*; Pinf=*P. inflatum*; Pult=*P. ultimum*; Pdis=*P. dissotocum*. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.

Dai	Inóculo	<i>ERF1</i>			<i>GAPDH</i>			Quantificação relativa				Acúmulo mRNA ^c
		Ct	Média	DP	Ct	Média	DP	ΔCt^a	DP	$\Delta \Delta Ct^b$	DP	
2	H ₂ O	24,06	23,88	0,27	21,49	20,62	0,82	3,26	0,87	0,00	0,87	1,00
		24,01			19,84							
		23,57			20,54							
	Pgra	24,07	24,17	0,15	20,06	20,18	0,15	3,99	0,21	0,73	0,21	0,60
		24,34			20,36							
		24,11			20,13							
	Pdel	20,14	20,24	0,14	21,29	21,14	0,18	-0,90	0,23	-4,16	0,23	17,88
		20,34			21,19							
		--			20,94							
	Pinf	23,42	23,53	0,10	19,94	20,16	0,24	3,37	0,26	0,11	0,26	0,93
		23,58			20,12							
		23,60			20,42							
	Pult	24,40	24,38	0,10	21,21	21,2	0,13	3,19	0,16	-0,07	0,16	1,05
		24,47			21,32							
		24,27			21,06							
	Pdis	21,96	21,97	0,02	18,1	18,09	0,06	3,88	0,06	0,62	0,06	0,65
		21,99			18,03							
		21,98			18,15							
5	Pgra	21,99	22,06	0,08	23,01	22,94	0,06	-0,88	0,10	-4,14	0,10	17,59
		22,04			22,90							
		22,15			22,91							
	Pdel	20,04	19,97	0,14	21,12	21,04	0,23	-1,07	0,27	-4,33	0,27	20,07
		20,08			21,23							
		19,81			20,78							
	Pinf	24,54	24,50	0,12	20,89	20,59	0,27	3,92	0,29	0,66	0,29	0,63
		24,37			20,49							
		24,60			20,38							
	Pult	21,71	21,67	0,09	21,06	21,24	0,22	0,44	0,24	-2,82	0,24	7,06
		21,57			21,18							
		21,74			21,48							
Pdis	20,60	20,68	0,12	22,11	22,40	0,36	-1,72	0,38	-4,97	0,38	31,42	
	20,63			22,29								
	20,82			22,80								

a. $\Delta Ct = Ct_{ERF1} - Ct_{GAPDH}$, b. $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{Amostra} - \Delta Ct_{H_2O}$, c. Acúmulo de mRNA de *ERF1* relativo ao calibrador 2^{- $\Delta \Delta Ct$} (Applied Biosystems, 1997).

Apêndice 5: Ciclo limiar (Ct), médias, desvio padrão (DP) e níveis de acúmulo de mRNA obtidos para *ERF1* em plântulas de *Solanum lycopersicum* a 25°C ± 2°C, após a inoculação com isolados de *Pythium* spp.. Dai=dias após a inoculação; Pgra=*P. graminicola*; Pdel=*P. deliense*; Pinf=*P. inflatum*; Pult=*P. ultimum*; Pdis=*P. dissotocum*. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.

Dai	Inóculo	<i>ERF1</i>			<i>GAPDH</i>			Quantificação relativa				Acúmulo mRNA ^c
		Ct	Média	DP	Ct	Média	DP	ΔCt^a	DP	$\Delta \Delta Ct^b$	DP	
2	H ₂ O	24,06	23,88	0,27	21,49	20,62	0,82	3,26	0,87	0,00	0,87	1,00
		24,01			19,84							
		23,57			20,54							
	Pgra	21,77	21,92	0,16	23,68	23,59	0,18	-1,67	1,51	-4,93	1,51	30,41
		22,09			23,38							
		21,89			23,70							
	Pdel	23,26	23,30	0,06	21,45	21,39	0,06	1,91	0,08	-1,35	0,08	2,55
		23,27			21,39							
		23,37			21,33							
	Pinf	22,04	22,04	0,01	19,35	19,37	0,02	2,67	0,02	-0,59	0,02	1,50
		22,06			19,39							
		22,04			19,37							
	Pult	22,98	22,79	0,23	22,48	22,10	0,35	0,69	0,42	-2,57	0,42	5,94
		22,85			22,04							
		22,54			21,79							
Pdis	21,54	21,57	0,04	20,31	20,63	0,33	0,94	0,33	-2,32	0,33	5,00	
	21,57			20,62								
	21,61			20,97								
5	Pgra	24,09	24,13	0,04	22,33	22,61	0,33	1,52	0,33	-1,74	0,33	3,34
		24,12			22,51							
		24,16			22,97							
	Pdel	24,06	24,01	0,07	22,27	22,07	0,29	1,94	0,30	-1,32	0,30	2,49
		23,93			21,86							
		24,04			--							
	Pinf	22,14	22,18	0,03	20,22	20,41	0,25	1,77	0,25	-1,49	0,25	2,80
		22,20			20,31							
		22,19			20,69							
	Pult	23,82	23,77	0,14	21,85	21,75	0,18	2,02	0,23	-1,24	0,23	2,36
		23,87			21,54							
		23,62			21,87							
	Pdis	24,86	24,92	0,13	24,93	25,12	0,19	-0,20	0,23	-3,45	0,23	10,96
		24,83			25,11							
		25,07			25,32							

a. $\Delta Ct = Ct_{ERF1} - Ct_{GAPDH}$, b. $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{amostra} - \Delta Ct_{H_2O}$, c. Acúmulo de mRNA de *ERF1* relativo ao calibrador 2^{- $\Delta \Delta Ct$} (Applied Biosystems, 1997).

Apêndice 6: Ciclo limiar (Ct), médias, desvio padrão (DP) e níveis de acúmulo de mRNA obtidos para *ERF1* em plântulas de *Solanum lycopersicum* a 30°C ± 2°C, após a inoculação com isolados de *Pythium* spp.. Dai=dias após a inoculação; Pgra=*P. graminicola*; Pdel=*P. deliense*; Pinf=*P. inflatum*; Pult=*P. ultimum*; Pdis=*P. dissotocum*. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.

Dai	Inóculo	<i>ERF1</i>			<i>GAPDH</i>			Quantificação relativa				Acúmulo mRNA ^c
		Ct	Média	DP	Ct	Média	DP	ΔCt^a	DP	$\Delta\Delta Ct^b$	DP	
2	H ₂ O	24,06	23,88	0,27	21,49	20,62	0,82	3,26	0,87	0,00	0,87	1,00
		24,01			19,84							
		23,57			20,54							
	Pgra	21,50	21,73	0,21	22,64	22,86	0,22	-1,13	0,30	-4,39	0,30	20,89
		21,88			22,87							
		21,82			23,07							
	Pdel	21,60	21,49	0,10	19,73	19,73	0,17	1,76	0,20	-1,50	0,20	2,82
		21,39			19,56							
		21,49			19,91							
	Pinf	21,63	21,56	0,07	19,71	19,63	0,09	1,93	0,12	-1,33	0,12	2,51
		21,56			19,64							
		21,48			19,53							
	Pult	22,27	22,29	0,06	19,90	20,03	0,14	2,25	0,16	-1,01	0,16	2,01
		22,23			20,00							
22,36		20,19										
Pdis	22,09	22,04	0,07	20,70	20,73	0,07	1,31	0,10	-1,95	0,10	3,86	
	21,99			20,69								
				20,81								
5	Pgra	24,08	24,02	0,07	23,30	23,23	0,06	0,78	0,09	-2,48	0,09	5,56
		24,04			23,22							
		23,93			23,19							
	Pdel	22,16	22,27	0,11	20,10	20,19	0,14	2,08	0,17	-1,18	0,17	2,27
		22,29			20,29							
		22,36			--							
	Pinf	24,14	23,82	0,27	23,97	23,53	0,39	0,29	0,47	-2,96	0,47	7,80
		23,69			23,34							
		23,64			23,27							
	Pult	30,26	30,71	0,41	27,20	27,23	0,18	3,48	0,45	0,23	0,45	0,85
		31,06			27,07							
		30,82			27,42							
	Pdis	24,06	24,13	0,11	23,75	23,98	0,21	0,15	0,24	-3,11	0,24	8,62
		24,21			24,04							
--		24,16										

a. $\Delta Ct = Ct_{ERF1} - Ct_{GAPDH}$, b. $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Amostra} - \Delta Ct_{H_2O}$, c. Acúmulo de mRNA de *ERF1* relativo ao calibrador 2^{- $\Delta\Delta Ct$} (Applied Biosystems, 1997).

Apêndice 7: Ciclo limiar (Ct), médias, desvio padrão (DP) e níveis de acúmulo de mRNA obtidos para *LOXD* em plântulas de *S. lycopersicum* a 20°C ± 2°C, após a inoculação com isolados de *Pythium* spp.. Dai=dias após a inoculação; Pgra=*P. graminicola*; Pdel=*P. deliense*; Pinf=*P. inflatum*; Pult=*P. ultimum*; Pdis=*P. dissotocum*. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.

Dai	Inóculo	<i>LOXD</i>			<i>GAPDH</i>			Quantificação relativa				Acúmulo mRNA ^c
		Ct	Média	DP	Ct	Média	DP	ΔCt^a	DP	$\Delta\Delta Ct^b$	DP	
2	H ₂ O	24,46	24,26	0,2	21,49	20,62	0,82	3,64	0,85	0	0,85	1
		24,27			19,84							
		24,05			20,54							
	Pgra	23,03	22,99	0,08	20,06	20,18	0,15	2,8	0,17	-0,83	0,17	1,78
		22,89			20,36							
		23,04			20,13							
	Pdel	20,52	20,52	0,01	21,29	21,14	0,18	-0,62	0,18	-4,26	0,18	19,17
		20,51			21,19							
		20,53			20,94							
	Pinf	23,23	23,3	0,06	19,94	20,16	0,24	3,13	0,25	-0,5	0,25	1,42
		23,35			20,12							
		23,3			20,42							
	Pult	22,46	22,27	0,18	21,21	21,2	0,13	1,08	0,22	-2,56	0,22	5,91
		22,27			21,32							
		22,09			21,06							
	Pdis	23,72	23,64	0,1	18,1	18,09	0,06	5,54	0,11	1,91	0,11	0,27
		23,66			18,03							
		23,53			18,15							
5	Pgra	21,24	21,22	0,02	23,01	22,94	0,06	-1,72	0,06	-5,36	0,06	41,06
		21,21			22,9							
		21,21			22,91							
	Pdel	18,9	18,99	0,12	21,12	21,04	0,23	-2,06	0,26	-5,7	0,26	51,87
		19,07			21,23							
		--			20,78							
	Pinf	25,61	25,75	0,2	20,89	20,59	0,27	5,16	0,33	1,52	0,33	0,35
		25,89			20,49							
		--			20,38							
	Pult	21,51	21,51	0,02	21,06	21,24	0,22	0,27	0,22	-3,37	0,22	10,32
		21,48			21,18							
		21,53			21,48							
	Pdis	20,05	20,09	0,05	22,11	22,4	0,36	-2,31	0,36	-5,95	0,36	61,68
		20,07			22,29							
		20,15			22,8							

a. $\Delta Ct = Ct_{LOXD} - Ct_{GAPDH}$, b. $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Amostra} - \Delta Ct_{H_2O}$, c. Acúmulo de mRNA de *LOXD* relativo ao calibrador $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Applied Biosystems, 1997).

Apêndice 8: Ciclo limiar (Ct), médias, desvio padrão (DP) e níveis de acúmulo de mRNA obtidos para *LOXD* em plântulas de *S. lycopersicum* a 25°C ± 2°C, após a inoculação com isolados de *Pythium* spp.. Dai=dias após a inoculação; Pgra=*P. graminicola*; Pdel=*P. deliense*; Pinf=*P. inflatum*; Pult=*P. ultimum*; Pdis=*P. dissotocum*. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.

Dai	Inóculo	<i>LOXD</i>			<i>GAPDH</i>			Quantificação relativa				Acúmulo mRNA ^c
		Ct	Média	DP	Ct	Média	DP	ΔCt^a	DP	$\Delta\Delta Ct^b$	DP	
2	H ₂ O	24,46	24,26	0,20	21,49	20,62	0,82	3,64	0,85	0,00	0,85	1,00
		24,27			19,84							
		24,05			20,54							
	Pgra	21,33	21,34	0,11	23,68	23,59	0,18	-2,24	0,21	-5,88	0,21	59,01
		21,46			23,38							
		21,24			23,70							
	Pdel	21,00	21,03	0,03	21,45	21,39	0,06	-0,36	0,07	-4,00	0,07	15,95
		21,04			21,39							
		21,06			21,33							
	Pinf	24,64	24,71	0,06	19,35	19,37	0,02	5,33	0,06	1,70	0,06	0,31
		24,76			19,39							
		24,72			19,37							
	Pult	24,51	24,46	0,07	22,48	22,10	0,35	2,36	0,36	-1,28	0,36	2,43
		24,41			22,04							
		--			21,79							
	Pdis	22,90	22,85	0,05	20,31	20,63	0,33	2,21	0,33	-1,43	0,33	2,69
22,79		20,62										
22,85		20,97										
5	Pgra	23,10	23,10	0,01	22,33	22,61	0,33	0,50	0,33	-3,14	0,33	8,82
		23,11			22,51							
		--			22,97							
	Pdel	23,13	23,16	0,02	22,27	22,07	0,29	1,09	0,29	-2,55	0,29	5,85
		23,17			21,86							
		23,17			--							
	Pinf	23,10	23,08	0,05	20,22	20,41	0,25	2,68	0,25	-0,96	0,25	1,95
		23,11			20,31							
		23,03			20,69							
	Pult	24,63	24,51	0,13	21,85	21,75	0,18	2,76	0,22	-0,88	0,22	1,84
		24,51			21,54							
		24,38			21,87							
Pdis	23,87	23,91	0,09	24,93	25,12	0,19	-1,21	0,21	-4,84	0,21	28,73	
	24,02			25,11								
	23,85			25,32								

a. $\Delta Ct = Ct_{LOXD} - Ct_{GAPDH}$, b. $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Amostra} - \Delta Ct_{H_2O}$, c. Acúmulo de mRNA de *LOXD* relativo ao calibrador 2^{- $\Delta\Delta Ct$} (Applied Biosystems, 1997).

Apêndice 9: Ciclo limiar (Ct), médias, desvio padrão (DP) e níveis de acúmulo de mRNA obtidos para *LOXD* em plântulas de *S. lycopersicum* a 30°C ± 2°C, após a inoculação com isolados de *Pythium* spp.. Dai=dias após a inoculação; Pgra=*P. graminicola*; Pdel=*P. deliense*; Pinf=*P. inflatum*; Pult=*P. ultimum*; Pdis=*P. dissotocum*. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.

Dai	Inóculo	<i>LOXD</i>			<i>GAPDH</i>			Quantificação relativa				Acúmulo mRNA ^c
		Ct	Média	DP	Ct	Média	DP	ΔCt^a	DP	$\Delta\Delta Ct^b$	DP	
2	H ₂ O	24,46	24,26	0,20	21,49	20,62	0,82	3,64	0,85	0,00	0,85	1,00
		24,27			19,84							
		24,05			20,54							
	Pgra	22,09	22,16	0,09	22,64	22,86	0,22	-0,69	0,23	-4,33	0,23	20,16
		22,15			22,87							
		22,25			23,07							
	Pdel	20,82	20,67	0,13	19,73	19,73	0,17	0,94	0,21	-2,7	0,21	6,49
		20,59			19,56							
		20,61			19,91							
	Pinf	24,55	24,87	0,28	19,71	19,63	0,09	5,24	0,3	1,6	0,3	0,33
		25,09			19,64							
		24,95			19,53							
	Pult	23,19	23,13	0,07	19,90	20,03	0,14	3,1	0,16	-0,54	0,16	1,45
		23,16			20,00							
23,05		20,19										
Pdis	23,83	23,82	0,03	20,70	20,73	0,07	3,08	0,07	-0,56	0,07	1,47	
	23,78			20,69								
	23,84			20,81								
5	Pgra	22,44	22,41	0,10	23,30	23,23	0,06	-0,82	0,12	-4,46	0,12	22,05
		22,29			23,22							
		22,50			23,19							
	Pdel	22,91	22,84	0,07	20,10	20,19	0,14	2,65	0,16	-0,99	0,16	1,99
		22,85			20,29							
		22,76			--							
	Pinf	23,28	23,04	0,22	23,97	23,53	0,39	-0,49	0,44	-4,13	0,44	17,47
		22,99			23,34							
		22,85			23,27							
	Pult	26,57	26,39	0,21	27,20	27,23	0,18	-0,84	0,28	-4,48	0,28	22,25
		26,15			27,07							
		26,45			27,42							
	Pdis	22,52	22,66	0,19	23,75	23,98	0,21	-1,33	0,29	-4,97	0,29	31,25
		22,79			24,04							
--		24,16										

a. $\Delta Ct = Ct_{LOXD} - Ct_{GAPDH}$, b. $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Amostra} - \Delta Ct_{H_2O}$, c. Acúmulo de mRNA de *LOXD* relativo ao calibrador 2^{- $\Delta\Delta Ct$} (Applied Biosystems, 1997).

Apêndice 10: Ciclo limiar (Ct), médias, desvio padrão (DP) e níveis de acúmulo de mRNA obtidos para *PR-1A1* em plântulas de *S. lycopersicum* mantidas a 20°C ± 2°C, após a inoculação com isolados de *Pythium* spp.. Dai=dias após a inoculação; Pgra=*P. graminicola*; Pdel=*P. deliense*; Pinf=*P. inflatum*; Pult=*P. ultimum*; Pdis=*P. dissotocum*. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.

Dai	Inóculo	<i>PR-1A1</i>			<i>GAPDH</i>			Quantificação relativa				Acúmulo mRNA ^c
		Ct	Média	DP	Ct	Média	DP	ΔCt^a	DP	$\Delta\Delta Ct^b$	DP	
2	H ₂ O	22,07	21,88	0,19	21,49	20,62	0,82	1,26	0,85	0,00	0,85	1,00
		21,7			19,84							
		21,86			20,54							
	Pgra	23,15	23,11	0,11	20,06	20,18	0,15	2,93	0,19	1,68	0,19	0,31
		22,99			20,36							
		23,20			20,13							
	Pdel	18,81	18,83	0,04	21,29	21,14	0,18	-2,31	0,18	-3,56	0,18	11,81
		18,88			21,19							
		18,82			20,94							
	Pinf	21,31	21,39	0,08	19,94	20,16	0,24	1,23	0,26	-0,02	0,26	1,02
		21,41			20,12							
		21,46			20,42							
	Pult	21,98	21,82	0,15	21,21	21,2	0,13	0,62	0,2	-0,63	0,2	1,55
		21,78			21,32							
21,69		21,06										
Pdis	20,70	20,66	0,06	18,10	18,09	0,06	2,57	0,08	1,32	0,08	0,40	
	20,60			18,03								
	20,70			18,15								
5	Pgra	19,68	19,83	0,13	23,01	22,94	0,06	-3,11	0,14	-4,37	0,14	20,63
		19,93			22,90							
		19,87			22,91							
	Pdel	18,65	18,56	0,11	21,12	21,04	0,23	-2,48	0,26	-3,74	0,26	13,34
		18,59			21,23							
		18,44			20,78							
	Pinf	22,41	22,4	0,04	20,89	20,59	0,27	1,81	0,27	0,56	0,27	0,68
		22,44			20,49							
		22,35			20,38							
	Pult	20,60	20,57	0,04	21,06	21,24	0,22	-0,66	0,22	-1,92	0,22	3,78
		20,53			21,18							
		20,59			21,48							
	Pdis	20,39	20,53	0,13	22,11	22,4	0,36	-1,87	0,38	-3,12	0,38	8,72
		20,54			22,29							
20,65		22,80										

a. $\Delta Ct = Ct_{PR-1A1} - Ct_{GAPDH}$, b. $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Amostra} - \Delta Ct_{H_2O}$, c. Acúmulo de mRNA de *PR-1A1* relativo ao calibrador 2^{- $\Delta\Delta Ct$} (Applied Biosystems, 1997).

Apêndice 11: Ciclo limiar (Ct), médias, desvio padrão (DP) e níveis de acúmulo de mRNA obtidos para *PR-1A1* em plântulas de *S. lycopersicum* mantidas a 25°C ± 2°C, após a inoculação com isolados de *Pythium* spp.. Dai=dias após a inoculação; Pgra=*P. graminicola*; Pdel=*P. deliense*; Pinf=*P. inflatum*; Pult=*P. ultimum*; Pdis=*P. dissotocum*. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.

Dai	Inóculo	<i>PR-1A1</i>			<i>GAPDH</i>			Quantificação relativa				Acúmulo mRNA ^c
		Ct	Média	DP	Ct	Média	DP	ΔCt^a	DP	$\Delta\Delta Ct^b$	DP	
2	H ₂ O	22,07	21,88	0,19	21,49	20,62	0,82	1,26	0,85	0,00	0,85	1,00
		21,70			19,84							
		21,86			20,54							
	Pgra	17,08	16,98	0,11	23,68	23,59	0,18	-6,61	0,22	-7,86	0,22	232,7
		17,00			23,38							
		16,86			23,70							
	Pdel	17,6	17,71	0,11	21,45	21,39	0,06	-3,68	0,13	-4,94	0,13	30,65
		17,81			21,39							
		17,72			21,33							
	Pinf	19,65	19,72	0,08	19,35	19,37	0,02	0,34	0,08	-0,91	0,08	1,88
		19,70			19,39							
		19,80			19,37							
	Pult	19,28	19,17	0,09	22,48	22,1	0,35	-2,94	0,36	-4,19	0,36	18,28
		19,11			22,04							
		19,12			21,79							
	Pdis	18,26	18,21	0,05	20,31	20,63	0,33	-2,42	0,33	-3,68	0,33	12,82
		18,18			20,62							
		18,18			20,97							
5	Pgra	20,12	20,49	0,32	22,33	22,61	0,33	-2,11	0,46	-3,37	0,46	10,32
		20,68			22,51							
		20,68			22,97							
	Pdel	20,07	20,10	0,06	22,27	22,07	0,29	-1,97	0,30	-3,23	0,30	9,35
		20,07			21,86							
		20,16			--							
	Pinf	19,84	19,68	0,14	20,22	20,41	0,25	-0,73	0,29	-1,98	0,29	3,95
		19,65			20,31							
		19,55			20,69							
	Pult	21,31	21,21	0,12	21,85	21,75	0,18	-0,55	0,22	-1,80	0,22	3,49
		21,08			21,54							
		21,23			21,87							
	Pdis	20,14	20,11	0,04	24,93	25,12	0,19	-5,01	0,20	-6,26	0,20	76,69
		20,07			25,11							
		20,13			25,32							

a. $\Delta Ct = Ct_{PR-1A1} - Ct_{GAPDH}$, b. $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Amostra} - \Delta Ct_{H_2O}$, c. Acúmulo de mRNA de *PR-1A1* relativo ao calibrador 2^{- $\Delta\Delta Ct$} (Applied Biosystems, 1997).

Apêndice 12: Ciclo limiar (Ct), médias, desvio padrão (DP) e níveis de acúmulo de mRNA obtidos para *PR-1A1* em plântulas de *S. lycopersicum* mantidas a 30°C ± 2°C, após a inoculação com isolados de *Pythium* spp.. Dai=dias após a inoculação; Pgra=*P. graminicola*; Pdel=*P. deliense*; Pinf=*P. inflatum*; Pult=*P. ultimum*; Pdis=*P. dissotocum*, UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.

Dai	Inóculo	<i>PR-1A1</i>			<i>GAPDH</i>			Quantificação relativa				Acúmulo mRNA ^c
		Ct	Média	DP	Ct	Média	DP	ΔCt^a	DP	$\Delta\Delta Ct^b$	DP	
2	H ₂ O	22,07	21,88	0,19	21,49	20,62	0,82	1,26	0,85	0,00	0,85	1,00
		21,70			19,84							
		21,86			20,54							
	Pgra	18,74	18,84	0,10	22,64	22,86	0,22	-4,02	0,24	-5,27	0,24	38,70
		18,84			22,87							
		18,94			23,07							
	Pdel	18,54	18,49	0,07	19,73	19,73	0,17	-1,24	0,18	-2,5	0,18	5,66
		18,51			19,56							
		18,41			19,91							
	Pinf	22,51	22,39	0,11	19,71	19,63	0,09	2,77	0,15	1,51	0,15	0,35
		22,39			19,64							
		22,28			19,53							
Pult	19,45	19,41	0,05	20,00	20,03	0,14	-0,62	0,15	-1,88	0,15	3,68	
	19,37			20,00								
	--			20,19								
Pdis	18,96	19,00	0,04	20,70	20,73	0,07	-1,73	0,08	-2,99	0,08	7,92	
	19,00			20,69								
	19,05			20,81								
5	Pgra	19,08	19,00	0,11	23,3	23,23	0,06	-4,24	0,13	-5,49	0,13	45,00
		19,04			23,22							
		18,87			23,19							
	Pdel	19,47	19,5	0,03	20,10	20,19	0,14	-0,69	0,14	-1,94	0,14	3,85
		19,51			20,29							
		19,54			--							
	Pinf	19,29	19,24	0,06	23,97	23,53	0,39	-4,29	0,39	-5,55	0,39	46,75
		19,25			23,34							
		19,17			23,27							
	Pult	26,41	26,43	0,02	27,20	27,23	0,18	-0,8	0,18	-2,06	0,18	4,17
		26,44			27,07							
		--			27,42							
Pdis	20,23	20,27	0,07	23,75	23,98	0,21	-3,71	0,22	-4,96	0,22	31,23	
	20,24			24,04								
	20,35			24,16								

a. $\Delta Ct = Ct_{PR-1A1} - Ct_{GAPDH}$, b. $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Amostra} - \Delta Ct_{H_2O}$, c. Acúmulo de mRNA de *PR-1A1* relativo ao calibrador 2^{- $\Delta\Delta Ct$} (Applied Biosystems, 1997).

Apêndice 13: Ciclo limiar (Ct), médias, desvio padrão (DP) e níveis de acúmulo de mRNA obtidos para *PR-5* em plântulas de *S. lycopersicum* mantidas a 20°C ± 2°C, após a inoculação com isolados de *Pythium* spp.. Dai=dias após a inoculação; Pgra=*P. graminicola*; Pdel=*P. deliense*; Pinf=*P. inflatum*; Pult=*P. ultimum*; Pdis=*P. dissotocum*. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.

Dai	Inóculo	<i>PR-5</i>			<i>GAPDH</i>			Quantificação relativa				Acúmulo mRNA ^c
		Ct	Média	DP	Ct	Média	DP	ΔCt^a	DP	$\Delta\Delta Ct^b$	DP	
2	H ₂ O	19,00	18,86	0,13	21,49	20,62	0,82	-1,77	0,83	0,00	0,83	1,00
		18,81			19,84							
		18,75			20,54							
	Pgra	19,07	19,17	0,10	20,06	20,18	0,15	-1,01	0,18	0,76	0,18	0,59
		19,2			20,36							
		19,25			20,13							
	Pdel	15,90	15,87	0,06	21,29	21,14	0,18	-5,27	0,19	-3,50	0,19	11,32
		15,91			21,19							
		15,81			20,94							
	Pinf	17,42	17,44	0,09	19,94	20,16	0,24	-2,72	0,26	-0,96	0,26	1,94
		17,35			20,12							
		17,54			20,42							
	Pult	18,67	18,63	0,13	21,21	21,2	0,13	-2,57	0,18	-0,80	0,18	1,75
		18,73			21,32							
18,48		21,06										
Pdis	17,05	17,11	0,06	18,10	18,09	0,06	-0,98	0,08	0,79	0,08	0,58	
	17,18			18,03								
	17,11			18,15								
5	Pgra	16,43	16,42	0,07	23,01	22,94	0,06	-6,52	0,09	-4,76	0,09	27,03
		16,48			22,90							
		16,34			22,91							
	Pdel	15,91	15,88	0,05	21,12	21,04	0,23	-5,17	0,24	-3,4	0,24	10,56
		15,91			21,23							
		15,82			20,78							
	Pinf	19,35	19,37	0,04	20,89	20,59	0,27	-1,22	0,27	0,54	0,27	0,69
		19,35			20,49							
		19,41			20,38							
	Pult	16,74	16,88	0,13	21,06	21,24	0,22	-4,36	0,25	-2,59	0,25	6,03
		16,9			21,18							
		17,00			21,48							
	Pdis	17,01	17,06	0,04	22,11	22,4	0,36	-5,34	0,36	-3,58	0,36	11,94
		17,08			22,29							
17,08		22,80										

a. $\Delta Ct = Ct_{PR-5} - Ct_{GAPDH}$, b. $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Amostra} - \Delta Ct_{H_2O}$, c. Acúmulo de mRNA de *PR-5* relativo ao calibrador 2^{- $\Delta\Delta Ct$} (Applied Biosystems, 1997).

Apêndice 14: Ciclo limiar (Ct), médias, desvio padrão (DP) e níveis de acúmulo de mRNA obtidos para *PR-5* em plântulas de *S. lycopersicum* mantidas a 25°C ± 2°C, após a inoculação com isolados de *Pythium* spp.. Dai=dias após a inoculação; Pgra=*P. graminicola*; Pdel=*P. deliense*; Pinf=*P. inflatum*; Pult=*P. ultimum*; Pdis=*P. dissotocum*. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.

Dai	Inóculo	<i>PR-5</i>			<i>GAPDH</i>			Quantificação relativa				Acúmulo mRNA ^c
		Ct	Média	DP	Ct	Média	DP	ΔCt^a	DP	$\Delta \Delta Ct^b$	DP	
2	H ₂ O	19,00	18,86	0,13	21,49	20,62	0,82	-1,77	0,83	0,00	0,83	1,00
		18,81			19,84							
		18,75			20,54							
	Pgra	15,08	15,05	0,02	23,68	23,59	0,18	-8,53	0,18	-6,77	0,18	109,02
		15,05			23,38							
		15,03			23,70							
	Pdel	15,61	15,61	0,00	21,45	21,39	0,06	-5,78	0,06	-4,02	0,06	16,18
		15,61			21,39							
		15,61			21,33							
	Pinf	16,79	16,81	0,26	19,35	19,37	0,02	-2,56	0,26	-0,8	0,26	1,74
		16,83			19,39							
		--			19,37							
	Pult	16,36	16,35	0,00	22,48	22,1	0,35	-5,75	0,35	-3,99	0,35	15,87
		16,37			22,04							
16,32		21,79										
Pdis	16,06	16,06	0,03	20,31	20,63	0,33	-4,57	0,33	-2,81	0,33	7,01	
	16,03			20,62								
	16,09			20,97								
5	Pgra	17,65	17,62	0,04	22,33	22,61	0,33	-4,98	0,33	-3,22	0,33	9,32
		17,59			22,51							
		--			22,97							
	Pdel	17,17	17,17	0,04	22,27	22,07	0,29	-4,90	0,29	-3,14	0,29	8,80
		17,12			21,86							
		17,21			--							
	Pinf	16,25	16,29	0,05	20,22	20,41	0,25	-4,12	0,25	-2,35	0,25	5,11
		16,28			20,31							
		16,34			20,69							
	Pult	18,12	18,04	0,10	21,85	21,75	0,18	-3,71	0,21	-1,95	0,21	3,86
		18,07			21,54							
		17,92			21,87							
	Pdis	18,03	18,07	0,04	24,93	25,12	0,19	-7,05	0,2	-5,28	0,20	38,97
		18,12			25,11							
18,06		25,32										

a. $\Delta Ct = Ct_{PR-5} - Ct_{GAPDH}$, b. $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{Amostra} - \Delta Ct_{H_2O}$, c. Acúmulo de mRNA de *PR-5* relativo ao calibrador $2^{-\Delta \Delta Ct}$ (Applied Biosystems, 1997).

Apêndice 15: Ciclo limiar (Ct), médias, desvio padrão (DP) e níveis de acúmulo de mRNA obtidos para *PR-5* em plântulas de *S. lycopersicum* mantidas a 30°C ± 2°C, após a inoculação com isolados de *Pythium* spp.. Dai=dias após a inoculação; Pgra=*P. graminicola*; Pdel=*P. deliense*; Pinf=*P. inflatum*; Pult=*P. ultimum*; Pdis=*P. dissotocum*. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.

Dai	Inóculo	<i>PR-5</i>			<i>GAPDH</i>			Quantificação relativa				Acúmulo mRNA ^c
		Ct	Média	DP	Ct	Média	DP	ΔCt^a	DP	$\Delta\Delta Ct^b$	DP	
2	H ₂ O	19,00	18,86	0,13	21,49	20,62	0,82	-1,77	0,83	0,00	0,83	1,00
		18,81			19,84							
		18,75			20,54							
		16,43			22,64							
	Pgra	16,62	16,5	0,10	22,87	22,86	0,22	-6,36	0,24	-4,59	0,24	24,16
		16,45			23,07							
		15,82			19,73							
		15,69			19,91							
	Pdel	15,75	15,75	0,07	19,56	19,73	0,17	-3,98	0,18	-2,22	0,18	4,64
		19,18			19,71							
		19,08			19,64							
		19,32			19,53							
	Pinf	16,01	19,19	0,12	19,9	19,63	0,09	-0,43	0,15	1,33	0,15	0,40
		16,05			20,00							
16,00		20,19										
16,35		20,70										
Pult	16,36	16,02	0,03	20,69	20,03	0,14	-4,01	0,15	-2,25	0,15	4,75	
	16,26			20,19								
	16,27			20,70								
	16,21			20,81								
5	Pgra	16,27	16,23	0,03	23,3	23,23	0,06	-7,00	0,06	-5,23	0,06	37,65
		16,21			23,22							
		16,23			23,19							
		16,38			20,10							
	Pdel	16,38	16,49	0,19	20,29	20,19	0,14	-3,71	0,23	-1,94	0,23	3,84
		16,71			--							
		16,13			23,97							
		16,11			23,34							
	Pinf	16,17	16,13	0,03	23,27	23,53	0,39	-7,39	0,39	-5,63	0,39	49,49
		32,08			27,20							
		32,97			27,07							
		--			27,42							
	Pult	17,25	32,52	0,63	23,75	27,23	0,18	5,29	0,65	7,06	0,65	0,01
		17,15			24,04							
17,14		23,98										
17,14		24,16										

a. $\Delta Ct = Ct_{PR-5} - Ct_{GAPDH}$, b. $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Amostra} - \Delta Ct_{H_2O}$, c. Acúmulo de mRNA de *PR-5* relativo ao calibrador 2^{- $\Delta\Delta Ct$} (Applied Biosystems, 1997).

Apêndice 16: Ciclo limiar (Ct), médias, desvio padrão (DP) e níveis de acúmulo de mRNA obtidos para *EXT* em plântulas de *S. lycopersicum* mantidas a 20°C ± 2°C, após a inoculação com isolados de *Pythium* spp.. Dai=dias após a inoculação; Pgra=*P. graminicola*; Pdel=*P. deliense*; Pinf=*P. inflatum*; Pult=*P. ultimum*; Pdis=*P. dissotocum*. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.

Dai	Inóculo	<i>EXT</i>			<i>GAPDH</i>			Quantificação relativa				Acúmulo mRNA ^c
		Ct	Média	DP	Ct	Média	DP	ΔCt^a	DP	$\Delta \Delta Ct^b$	DP	
2	H ₂ O	23,14	23,00	0,14	21,49	20,62	0,82	2,38	0,84	0,00	0,84	1,00
		22,98			19,84							
		22,87			20,54							
	Pgra	23,71	23,55	0,19	20,06	20,18	0,15	3,36	0,25	0,99	0,25	0,50
		23,59			20,36							
		23,34			20,13							
	Pdel	15,68	15,66	0,02	21,29	21,14	0,18	-5,48	0,18	-7,85	0,18	230,94
		15,66			21,19							
		15,65			20,94							
	Pinf	20,99	20,95	0,15	19,94	20,16	0,24	0,79	0,29	-1,59	0,29	3,00
		21,07			20,12							
		20,78			20,42							
	Pult	21,95	21,80	0,14	21,21	21,2	0,13	0,60	0,19	-1,78	0,19	3,42
		21,76			21,32							
		21,68			21,06							
	Pdis	17,88	17,88	0,01	18,10	18,09	0,06	-0,22	0,06	-2,59	0,06	6,03
		17,87			18,03							
		17,87			18,15							
5	Pgra	17,31	17,34	0,05	23,01	22,94	0,06	-5,59	0,08	-7,97	0,08	250,66
		17,33			22,90							
		17,40			22,91							
	Pdel	16,50	16,45	0,06	21,12	21,04	0,23	-4,59	0,24	-6,97	0,24	125,34
		16,46			21,23							
		16,38			20,78							
	Pinf	22,27	22,64	0,76	20,89	20,59	0,27	2,06	0,80	-0,32	0,80	1,25
		22,15			20,49							
		23,52			20,38							
	Pult	19,06	19,03	0,04	21,06	21,24	0,22	-2,21	0,22	-4,59	0,22	24,03
		19,05			21,18							
		18,98			21,48							
	Pdis	17,71	17,79	0,11	22,11	22,4	0,36	-4,60	0,37	-6,98	0,37	126,21
		17,75			22,29							
		17,92			22,80							

a. $\Delta Ct = Ct_{EXT} - Ct_{GAPDH}$, b. $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{Amostra} - \Delta Ct_{H_2O}$, c. Acúmulo de mRNA de *EXT* relativo ao calibrador $2^{-\Delta \Delta Ct}$ (Applied Biosystems, 1997).

Apêndice 17: Ciclo limiar (Ct), médias, desvio padrão (DP) e níveis de acúmulo de mRNA obtidos para *EXT* em plântulas de *S. lycopersicum* mantidas a 25°C ± 2°C, após a inoculação com isolados de *Pythium* spp.. Dai=dias após a inoculação; Pgra=*P. graminicola*; Pdel=*P. deliense*; Pinf=*P. inflatum*; Pult=*P. ultimum*; Pdis=*P. dissotocum*. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.

Dai	Inóculo	<i>EXT</i>			<i>GAPDH</i>			Quantificação relativa				Acúmulo mRNA ^c
		Ct	Média	DP	Ct	Média	DP	ΔCt^a	DP	$\Delta\Delta Ct^b$	DP	
2	H ₂ O	23,14	23,00	0,14	21,49	20,62	0,82	2,38	0,84	0,00	0,84	1,00
		22,98			19,84							
		22,87			20,54							
	Pgra	17,16	17,18	0,02	23,68	23,59	0,18	-6,40	1,50	-8,78	1,50	439,40
		17,19			23,38							
		17,19			23,70							
	Pdel	16,89	16,92	0,02	21,45	21,39	0,06	-4,47	0,06	-6,85	0,06	115,25
		16,93			21,39							
		16,93			21,33							
	Pinf	21,58	21,65	0,19	19,35	19,37	0,02	2,27	0,19	-0,10	0,19	1,07
		21,50			19,39							
		21,86			19,37							
	Pult	20,94	20,86	0,09	22,48	22,1	0,35	-1,24	0,36	-3,62	0,36	12,27
		20,89			22,04							
		20,76			21,79							
	Pdis	18,24	18,33	0,11	20,31	20,63	0,33	-2,30	0,35	-4,68	0,35	25,55
		18,46			20,62							
		18,31			20,97							
5	Pgra	19,36	19,39	0,04	22,33	22,61	0,33	-3,21	0,33	-5,59	0,33	48,06
		19,39			22,51							
		19,44			22,97							
	Pdel	18,45	18,34	0,13	22,27	22,07	0,29	-3,73	0,32	-6,11	0,32	68,87
		18,37			21,86							
		18,19			--							
	Pinf	17,91	17,96	0,31	20,22	20,41	0,25	-2,45	0,39	-4,82	0,39	28,32
		17,67			20,31							
		18,29			20,69							
	Pult	19,22	19,19	0,07	21,85	21,75	0,18	-2,56	0,20	-4,94	0,20	30,68
		19,24			21,54							
		19,10			21,87							
	Pdis	19,47	19,44	0,02	24,93	25,12	0,19	-5,67	0,19	-8,05	0,19	264,97
		19,43			25,11							
		19,44			25,32							

a. $\Delta Ct = Ct_{EXT} - Ct_{GAPDH}$, b. $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Amostra} - \Delta Ct_{H_2O}$, c. Acúmulo de mRNA de *EXT* relativo ao calibrador $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Applied Biosystems, 1997).

Apêndice 18: Ciclo limiar (Ct), médias, desvio padrão (DP) e níveis de acúmulo de mRNA obtidos para *EXT* em plântulas de *S. lycopersicum* mantidas a 30°C ± 2°C, após a inoculação com isolados de *Pythium* spp.. Dai=dias após a inoculação; Pgra=*P. graminicola*; Pdel=*P. deliense*; Pinf=*P. inflatum*; Pult=*P. ultimum*; Pdis=*P. dissotocum*. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.

Dai	Inóculo	<i>EXT</i>			<i>GAPDH</i>			Quantificação relativa				Acúmulo mRNA ^c
		Ct	Média	DP	Ct	Média	DP	ΔCt^a	DP	$\Delta\Delta Ct^b$	DP	
2	H ₂ O	23,14	23,00	0,14	21,49	20,62	0,82	2,38	0,84	0,00	0,84	1,00
		22,98			19,84							
		22,87			20,54							
	Pgra	18,05	18,06	0,02	22,64	22,86	0,22	-4,79	0,22	-7,17	0,22	143,95
		18,08			22,87							
		18,05			23,07							
	Pdel	16,37	16,24	0,11	19,73	19,73	0,17	-3,49	0,20	-5,86	0,20	58,20
		16,20			19,56							
		16,17			19,91							
	Pinf	22,43	22,56	0,19	19,71	19,63	0,09	2,94	0,21	0,56	0,21	0,68
		22,69			19,64							
		18,96			19,53							
Pult	19,06	19,01	0,05	19,9	20,03	0,14	-1,02	0,15	-3,39	0,15	10,52	
	19,02			20,00								
	19,91			20,19								
Pdis	19,91	19,94	0,06	20,70	20,73	0,07	-0,79	0,09	-3,17	0,09	8,98	
	20,01			20,69								
				20,81								
5	Pgra	20,22	20,13	0,10	23,3	23,23	0,06	-3,11	0,11	-5,48	0,11	44,69
		20,14			23,22							
		20,03			23,19							
	Pdel	17,99	17,91	0,11	20,10	20,19	0,14	-2,29	0,18	-4,66	0,18	25,31
		17,95			20,29							
		17,78			--							
	Pinf	20,15	20,13	0,02	23,97	23,53	0,39	-3,40	0,39	-5,78	0,39	54,88
		20,12			23,34							
		20,11			23,27							
	Pult	24,89	25,01	0,11	27,20	27,23	0,18	-2,22	0,21	-4,60	0,21	24,22
		25,02			27,07							
		25,11			27,42							
Pdis	20,07	20,06	0,09	23,75	23,98	0,21	-3,93	0,23	-6,30	0,23	78,90	
	19,96			24,04								
	20,14			24,16								

a. $\Delta Ct = Ct_{EXT} - Ct_{GAPDH}$, b. $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Amostra} - \Delta Ct_{H_2O}$, c. Acúmulo de mRNA de *EXT* relativo ao calibrador 2^{- $\Delta\Delta Ct$} (Applied Biosystems, 1997).

Apêndice 19: Ciclo limiar (Ct), médias, desvio padrão (DP) e níveis de acúmulo de mRNA obtidos para *PR-1A1* em plântulas de *S. lycopersicum* inoculadas com isolados de espécies do gênero *Pythium* e submetidas a tratamentos com diferentes compostos. Pdel = *P. deliense*, ABA = ácido abscísico, AS = ácido salicílico, ET = etileno e AVG = aminoetoxivinilglicina. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.

Tratamento	<i>PR-1A1</i>			<i>GAPDH</i>			Quantificação relativa				Acúmulo mRNA ^c
	Ct	Média	DP	Ct	Média	DP	ΔCt^a	DP	$\Delta \Delta Ct^b$	DP	
H ₂ O	21,61	21,58	0,06	24,04	23,53	0,46	-1,94	0,46	0,00	0,46	1,00
	21,51			23,36							
	21,63			23,18							
Pdel	17,10	17,05	0,04	23,28	23,06	0,31	-6,01	0,31	-4,06	0,31	16,69
	17,02			22,70							
	17,05			23,20							
ABA	25,34	25,29	0,08	24,30	23,84	0,66	1,45	0,66	3,39	0,66	0,10
	25,23			23,38							
	--			--							
ABA + Pdel	20,24	20,17	0,07	23,69	23,70	0,10	-3,53	0,12	-1,59	0,12	3,00
	20,17			23,81							
	20,11			23,61							
AS	23,53	23,44	0,08	27,38	27,30	0,07	-3,86	0,11	-1,92	0,11	3,77
	23,43			27,25							
	23,36			27,27							
AS + Pdel	24,50	24,53	0,03	28,05	28,05	0,11	-3,52	0,12	-1,57	0,12	2,98
	24,56			28,16							
	24,53			27,94							
ET	18,28	18,28	0,10	22,67	22,34	0,31	-4,06	0,32	-2,12	0,32	4,35
	18,38			22,29							
	18,18			22,06							
ET + Pdel	24,14	24,08	0,12	30,31	29,62	0,65	-5,54	0,66	-3,59	0,66	12,08
	23,95			29,02							
	24,16			29,54							
AVG	22,60	22,69	0,17	23,14	23,30	0,22	-0,60	0,27	1,34	0,27	0,39
	22,60			23,45							
	22,89			--							
AVG + Pdel	20,85	20,77	0,19	24,47	24,72	0,22	-3,95	0,29	-2,01	0,29	4,02
	20,90			24,80							
	20,55			24,89							

a. $\Delta Ct = Ct_{PR-1A1} - Ct_{GAPDH}$, b. $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{Amostra} - \Delta Ct_{H_2O}$, c. Acúmulo de mRNA de *PR-1A1* relativo ao calibrador $2^{-\Delta \Delta Ct}$ (Applied Biosystems, 1997).

Apêndice 20: Ciclo limiar (Ct), médias, desvio padrão (DP) e níveis de acúmulo de mRNA obtidos para *PR-5* em plântulas de *S. lycopersicum* inoculadas com isolados de espécies do gênero *Pythium* e submetidas a tratamentos com diferentes compostos. Pdel = *P. deliense*, ABA = ácido abscísico, AS = ácido salicílico, ET = etileno e AVG = aminoetoxivinilglicina. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.

Tratamento	<i>PR-5</i>			<i>GAPDH</i>			Quantificação relativa				Acúmulo mRNA ^c
	Ct	Média	DP	Ct	Média	DP	ΔCt^a	DP	$\Delta \Delta Ct^b$	DP	
H ₂ O	17,70	17,97	0,25	24,04	23,53	0,46	-5,55	0,52	0,00	0,52	1,00
	18,03			23,36							
	18,19			23,18							
Pdel	14,37	14,16	0,10	23,28	23,06	0,31	-8,90	0,33	-3,35	0,33	10,18
	13,96			22,70							
	14,15			23,20							
ABA	19,53	19,71	0,25	24,30	23,84	0,66	-4,13	0,70	1,43	0,70	0,37
	19,89			23,38							
	--			--							
ABA + Pdel	17,35	17,46	1,32	23,69	23,70	0,10	-6,24	1,33	-0,69	1,33	1,61
	17,50			23,81							
	17,54			23,61							
AS	20,28	20,17	0,11	27,38	27,30	0,07	-7,13	0,13	-1,58	0,13	2,98
	20,17			27,25							
	20,06			27,27							
AS + Pdel	20,35	20,38	0,11	28,05	28,05	0,11	-7,67	0,16	-2,12	0,16	4,35
	20,28			28,16							
	20,50			27,94							
ET	15,26	15,29	0,03	22,67	22,34	0,31	-7,05	0,31	-1,50	0,31	2,83
	15,31			22,29							
	15,29			22,06							
ET + Pdel	21,38	21,39	0,02	30,31	29,62	0,65	-8,23	0,65	-2,68	0,65	6,40
	21,41			29,02							
	21,38			29,54							
AVG	29,66	30,93	1,80	23,14	23,30	0,22	7,64	1,81	13,19	1,81	0,00
	32,21			23,45							
	--			--							
AVG + Pdel	17,21	16,79	0,81	24,47	24,72	0,22	-7,93	0,84	-2,38	0,84	5,20
	17,31			24,80							
	15,85			24,89							

a. $\Delta Ct = Ct_{PR-5} - Ct_{GAPDH}$, b. $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{Amostra} - \Delta Ct_{H_2O}$, c. Acúmulo de mRNA de *PR-5* relativo ao calibrador $2^{-\Delta \Delta Ct}$ (Applied Biosystems, 1997).