

ANTÔNIO ALVES PIMENTA NETO

**ESPORULAÇÃO E CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS CAUSADAS POR
Phytophthora nicotianae EM TOMATE E BERINJELA**

**RECIFE-PE
FEVEREIRO-2012**

ANTÔNIO ALVES PIMENTA NETO

**ESPORULAÇÃO E CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS CAUSADAS POR
Phytophthora nicotianae EM TOMATE E BERINJELA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO

Orientadora: Professora Dra. Sônia Maria Alves de Oliveira

Co-orientadora: Professora Dra. Edna Dora Martins Newman Luz

**RECIFE-PE
FEVEREIRO-2012**

**ESPORULAÇÃO E CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS CAUSADAS POR
Phytophthora nicotianae EM TOMATE E BERINJELA**

ANTÔNIO ALVES PIMENTA NETO

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em 29/02/2012.

ORIENTADORA

Prof^a Dra. Sônia Maria Alves de Oliveira

EXAMINADORES:

Prof^a Dra. Edna Dora Martins Newman Luz
Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira - CEPLAC

Prof. Dr. José Luiz Bezerra
Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC

Dra. Severina Rodrigues de Oliveira Lins
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

**RECIFE-PE
FEVEREIRO-2012**

Ficha catalográfica

P644e Pimenta Neto, Antonio Alves
Esporulação e controle alternativo de doenças causadas por
Phytophthora nicotianae em tomate e berinjela / Antonio Alves
Pimenta Neto. -- Recife, 2012.
100 f. : il.

Orientadora: Sônia Maria Alves de Oliveira.
Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia,
Recife, 2012.

Referências.

1. Comportamento fisiológico 2. Controle de doenças de
plantas 3. *Phytophthora nicotianae* 4. *Syzygium aromaticum*
5. *Cymbopogon nardus* I. Oliveira, Sônia Maria Alves de,
orientadora II. Título

CDD 632

*Aos meus amados pais Joel e Islene,
meus irmãos Felipe e Renata, e a Thaís pelo
companheirismo, apoio e amor incondicional.*

DEDICO

A existência na Terra é um livro que estás escrevendo...

Cada dia é uma página...

Cada hora é uma afirmação de tua personalidade, através das pessoas e das situações que te buscam.

Não menosprezes o ensejo de criar uma epopéia de amor em torno de teu nome.

As boas obras são frases de luz que endereças à Humanidade inteira.

Em cada resposta aos outros, em cada gesto para com os semelhantes, em cada manifestação dos teus pontos de vista e em cada demonstração de tua alma, grafas com tinta perene, a história de tua passagem...

CHICO XAVIER

A sabedoria não é um produto da escolaridade, mas da tentativa, ao longo de uma vida, para obtê-la

ALBERT EINSTEIN

O rio atinge seus objetivos, porque aprendeu a contornar obstáculos.

LAO-TSÉ

AGRADECIMENTOS

Ao Grande Arquiteto do Universo, por me conceder saúde e força para me manter sempre de pé e a ordem diante dos desafios e provas que temos que passar;

Aos meus pais por abrirem mão de seus sonhos para a realização dos meus;

À Thaís, pela cumplicidade, companheirismo, amor, paciência e incentivo;

À Prof^a Dra. Edna Dora Martins Newman Luz, pelo amor maternal, orientação nos trabalhos desenvolvidos, pela amizade e carisma.

Ao Prof^o Dr. José Luiz Bezerra, pela amizade, incentivo e suporte técnico durante a elaboração e execução do projeto de dissertação;

À professora Dra. Sônia Maria Alves de Oliveira, pela amizade e orientação;

À professora Dra. Larissa Corrêa do Bonfim Costa, e ao Dr. Givaldo Niella pela colaboração na etapa experimental

À Universidade Federal Rural de Pernambuco pelo apoio institucional e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo;

À Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira, pela estrutura e recurso concedido; e à todos os funcionários da sessão de Fitopatologia do CEPEC, pela força e colaboração nos experimentos;

À grande família do Laboratório de *Phytophthora* do CEPEC, Denise (Deni), Edarcy (Tita) Cenilda, Márcia (Marcinha), Ademildes (Milde), Joel, Catarino, Maguinaldo, Lurdes, Gláucio, Rebeca, Carolina, Marcela, Tacila, Marcos Santos (Marquinhos) que me ajudaram em todas as etapas experimentais, que sofreram junto comigo todos os labores para o desenvolvimento desta dissertação;

Aos amigos, Cristiane Lima, Nadja, Leilson, Alice, Kátia, Christtianno, Cristiane Duarte, Eliane, Mariana, Marcos Valiense, Leila, Lívia, Rogério, Nara, Louise, Sanlai, Francisca, pela força, carinho, amizade.

Aos funcionários do programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco;

À todos os colegas da minha turma, em especial aos meus amigos Conrado, Camila, Wiler, Willie e Susan;

Enfim, a todos aqueles que de forma direta ou indireta participaram da minha trajetória me incentivando a seguir em frente e nunca desistir principalmente nos momentos mais difíceis.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS.....	vii
SUMÁRIO	viii
RESUMO GERAL.....	x
GENERAL ABSTRACT	xi
CAPÍTULO I.....	xii
INTRODUÇÃO GERAL	13
Solanáceas e importância econômica	13
O gênero <i>Phytophthora</i>	16
<i>Phytophthora nicotianae</i>	20
Doenças causadas por <i>Phytophthora</i> spp. à solanáceas	21
Controle alternativo.....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
CAPÍTULO II	37
INTRODUÇÃO	42
MATERIAL E MÉTODOS	44
Obtenção dos isolados	44
Influência de diferentes meios de cultura.....	44
Influência de condições de luminosidade.....	45
Avaliação do crescimento e esporulação	45
Influência de diferentes pH	46
Análises dos dados	46
RESULTADOS	47
DISCUSSÃO.....	50
AGRADECIMENTOS.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS	55
CAPÍTULO III	64
INTRODUÇÃO	67
MATERIAL E MÉTODOS	70
Seleção dos isolados.....	70
Obtenção de óleos e extratos vegetais.....	71
Efeito dos óleos e extratos vegetais no crescimento micelial e germinação de zoósporos “in vitro”.....	72

Efeito de óleo e extratos vegetais no controle da podridão algodão em frutos de tomate e berinjela.....	74
Experimentos utilizando plântulas	75
1º experimento - Seleção da melhor concentração de inóculo para infecção em plântulas de tomateiro e berinjela em casa-de-vegetação.....	76
2º experimento - Efeito de óleo e extratos vegetais no controle de “damping off” em plântulas de tomateiro e berinjela em casa-de-vegetação	76
Análises dos dados	78
RESULTADOS.....	78
Seleção dos isolados.....	78
Obtenção de óleos e extratos vegetais.....	79
Efeito dos óleos e extratos vegetais no crescimento micelial e germinação de zoósporos “in vitro”.....	79
Efeito de óleo e extratos vegetais no controle da podridão algodão em frutos de berinjela e tomate	80
Efeito de óleo e extratos vegetais no controle de “damping off” em plântulas de tomateiro e berinjela em casa-de-vegetação.....	81
DISCUSSÃO.....	83
AGRADECIMENTOS.....	88
REFERÊNCIAS.....	88
CONCLUSÕES GERAIS	101

RESUMO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de extratos e óleos vegetais no controle de doenças causadas por *Phytophthora nicotianae* em tomateiro e berinjela, bem como seus efeitos sobre os isolados do patógeno. A esporulação do patógeno foi inicialmente estudado para viabilizar as inoculações e os testes com os óleos e extratos vegetais. O primeiro estudo consistiu em avaliar a influência de diferentes meios de cultura líquidos e agarizados, obtidos de órgão vegetais de hospedeiros e/ou indicados na literatura para o cultivo de *Phytophthora* spp; além de diferentes regimes de luminosidade: ausência de luz (E), alternância luminosa de 12h (LE), e luz constante (L); e potencial hidrogeniônico no crescimento e esporulação de *P. nicotianae*. Nos meios agarizados, (E) proporcionou os maiores crescimentos, entretanto em todos os regimes de luz os meios se diferenciaram, destacando-se dos demais os de mandioca, berinjela, tomate, e suco de vegetais (V8), os dois primeiros com os maiores crescimentos e os dois últimos com os menores. Os regimes de luz não influenciaram significativamente o crescimento nos meios líquidos com 10 dias de incubação. Em alguns meios a presença de luz foi inversamente proporcional ao crescimento vegetativo, mas foi um fator essencial para a esporulação, pois se verificou a presença de zoósporos somente em (L) e (LE), a exceção do meio V8, no qual se obteve a mais alta esporulação na ausência de luz (E). Em (L) e (LE), os isolados, meios e a presença ou não de ágar, promoveram diferenças estatísticas quanto ao número de zoósporos/mL. Verificou-se que meios mais ácidos proporcionam um menor crescimento, mas uma maior esporulação para *P. nicotianae*. O segundo estudo foi dividido em bioensaios “in vitro” e “in vivo”, analisado o efeito fungitóxico e biocontrolador de óleos e extratos vegetais de *Syzygium aromaticum* e *Cymbopogon nardus* em frutos e plântulas de tomateiro e berinjela inoculados com *P. nicotianae*. Constatou-se que os produtos que mais inibiram o crescimento micelial e a germinação dos zoósporos, foram obtidos de *S. aromaticum*, a partir das concentrações de 0,5 µL/mL e 10% do OE e EBA, respectivamente. Enquanto que o tratamento que mais retardou a evolução da doença em frutos e plântulas quando comparado com a testemunha inoculada, foi o OE e EBA de *C. nardus* nas concentrações de 1,0 µL/mL e 20%, respectivamente. Com isso podemos inferir que os produtos obtidos de *S. aromaticum* e *C. nardus*, têm potencial para reduzir o ataque deste patógeno em plantas de tomate e berinjela.

Palavras-chave: oomicetos, esporogênese, fisiologia do crescimento, *Solanun melogena* L., *Lycopersicon esculentum* Mill., *Cymbopogon nardus*, *Syzygium aromaticum*.

GENERAL ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effectiveness of extracts and vegetable oils in controlling diseases of Solanaceae caused by *Phytophthora nicotianae* and its effects on the isolates of the pathogen. The effect of means and methods of cultivation in the sporulation of the pathogen was first studied to enable the inoculations and tests with oils and plant extracts. The first study was to evaluate the influence of various liquid and solid culture media, obtained from plant host tissues and/or indicated in the literature for the cultivation of *Phytophthora* spp, as well as different light regimes: constant dark (D), 12h alternating light (LD), and constant light (L) and the hydrogen potential in growth and sporulation of *P. nicotianae*. The mycelial growth was obtained at 10 and 15 days of culture, through the quantification of biomass. The development of the colonies in the agar media was monitored through daily measurement of radial growth. The spore (zoospores/mL) was obtained in different ways in the 10th and 15th day in a Neubauer chamber, and the data transformed to $\sqrt{x+1}$. In the agar media, (D) showed the largest growth increases, however means differed in all light regimes, especially those of cassava, eggplant, tomato and vegetable juice (V8), the first two with the largest increases and the last two with the lowest. The light regimes did not significantly affect growth in liquid media with 10 days of incubation. In some ways the presence of light is inversely proportional to the vegetative growth, but was an essential factor for sporulation, since it showed the presence of zoospores only (L) and (LD), except for the V8 medium, where it obtained the highest sporulation in the absence of light (D). Strains, media, and the presence of agar, promoted statistical difference in the number of zoospores/mL in (L) and (LD). More acids culture media induced more sporulation of *P. nicotianae* and less mycelial growth. The second study was divided in "in vitro" and "in vivo" bioassays aiming to analyse the antifungal and biocontrol effect of vegetable oils and extracts of *Syzygium aromaticum* and *Cymbopogon nardus* on fruit and tomato and eggplant seedlings inoculated with *P. nicotianae*. It was found that the products inhibited the germination of the mycelial growth and zoospores obtained from *S. aromaticum* at 0,5 μ L/ ml and 10% concentrations CAE and EO, respectively. Treatments with *C. nardus* EO and CAE at 1,0 μ L/ ml and 20% respectively, delayed progression of disease in fruit and seedlings compared to inoculated control. It can be inferred that the products obtained from *S. aromaticum* and *C. nardus*, have the potential to reduce the attack of this pathogen on tomato and eggplant.

Keywords: oomycetes, sporogenesis, physiology of the growth, *Solanun melogena* L., *Lycopersicon esculentum* Mill., *Cymbopogon nardus*, *Syzygium aromaticum*.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

ESPORULAÇÃO E CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS CAUSADAS POR *Phytophthora nicotianae* EM TOMATE E BERINJELA

INTRODUÇÃO GERAL

Solanáceas e importância econômica

A família Solanaceae é uma das maiores das angiospermas, compreendendo 3000 espécies enquadradas em cerca de 106 gêneros (OLMSTEAD et al.,1999) distribuídos em todos os continentes, tendo como centro de diversidade o continente americano. Cinquenta gêneros e várias espécies são endêmicas na América do Sul (HUNZIKER, 2001). No Brasil, são encontrados 33 gêneros e cerca de 500 espécies, com maior diversidade na Bahia, e nos estados das regiões Sudeste e Sul. *Solanum* é o gênero mais bem representado, com cerca de 250 espécies, das quais aproximadamente 120 são endêmicas do Brasil (AGRA, 2008).

Segundo Souza e Lorenzi (2005), características básicas inerentes a esta família incluem plantas anuais, bianuais ou perenes, que vão de arbustos a árvores de pequeno porte (raramente lianas), com folhas isentas de espículas e margem inteira. As inflorescências são, algumas vezes, reduzidas a uma única flor. As flores distinguem-se por serem na maioria actinomorfas, vistosas e bissexuadas, diclamídeas com cálice pentâmero, gamossépalo, prefloração valvar ou imbricada, corola gamopétala, cinco estames, disco nectarífero geralmente presente, ovário súpero e bicarpelar. Seus frutos são bagas ou em forma de cápsulas.

Muitas espécies desta família apresentam importância econômica, como várias espécies dos gêneros *Capsicum* e *Solanum*, dentre as quais se pode destacar as pimentas e pimentões (*Capsicum annuum* L.), as pimentas malagueta e tabasco (*Capsicum frutescens* L.), pimentas de-cheiro (*Capsicum chinense* Jacq.), a berinjela (*Solanum melogena* L.), a batata (*Solanum tuberosum*), o jiló (*Solanum jillo* L.) e o tomate (*Solanum lycopersicon* L. = *Lycopersicon esculentum* Mill.) (SOUZA; LORENZI, 2005).

Segundo levantamentos realizados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção brasileira de hortaliças entre 1996 e 2006 foi de 15,5 milhões de toneladas, ocupando uma área cultivada de 771,4 milhões de hectares. O valor total da produção foi estimado em 11,529 bilhões (IBGE, 2006). A área de produção de hortaliças no Brasil, entre 1990 e 2006, cresceu 5% e a produção cresceu 63%, em função do aumento da produtividade de 54%. Atualmente a área ocupada com hortaliças no Brasil é de 779 mil hectares e a produção de 17 milhões de toneladas. Algumas hortaliças dominam a produção

como o tomate (21%), a batata (18%), a melancia (10%), a cebola (7%) e a cenoura (4%) (HORTALIÇAS..., 2010).

Dentre as olerícolas, o tomate é a segunda espécie mais importante, tanto sob o ponto de vista econômico quanto social, pelo volume da produção e geração de empregos (IBGE, 2009). São quase quatro milhões de hortas cultivadas com a espécie, o que gera uma produção de cerca de 122 milhões de toneladas (SILVA; VALE, 2007). É também considerada uma espécie cosmopolita, tendo como maiores produtores a China, seguida dos Estados Unidos, Itália, Turquia e Egito. Atualmente, o Brasil ocupa o sexto lugar no *ranking* da produção mundial de tomate, com uma produção de três milhões de toneladas plantadas numa área de 57,6 mil hectares (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009).

Embora seja cultivado em todos os estados brasileiros, em maior ou menor escala, o principal produtor em 2007, foi o Estado de Goiás com 801.960 t, seguido por São Paulo com 763.227 t, Minas Gerais com 421.455 t, Paraná com 310.338 t e Bahia com 211.727 t. Na região Nordeste, a Bahia ocupa o 1º lugar, acompanhada por Pernambuco em 2º com 165.278 t, Ceará em 3º lugar com 97.295 t, Paraíba em 4º lugar com 16.596 t e Rio Grande do Norte em 5º lugar com 9.287 t (IBGE, 2009). Segundo Silva e colaboradores (2003), a produção brasileira de tomate para industrialização, ou tomate rasteiro, começou em Pernambuco, no final do século XVIII; Porém, a cultura experimentou um grande impulso apenas na década de 1950, no Estado de São Paulo, viabilizando a implantação de diversas agroindústrias. Na década de 1980, ela expandiu-se na região Nordeste, especialmente em Pernambuco e no norte da Bahia.

A importância desta cultura pode ser atribuída a sua múltipla forma de consumo, podendo ser “in natura” ou como extratos industrializados. Do total da produção brasileira, 70% são destinados ao consumo natural e o restante é matéria prima para industrialização, com os quais são elaborados diversos produtos, tais como extratos, pastas, molhos, sucos e outros derivados (MAKISHIMA; MELO, 2004). O fruto é fonte de ácido fólico, vitamina C, potássio e carotenóides, dentre estes o principal é o licopeno (antioxidante). Outros componentes como vitaminas E, vitamina K e flavanóides e o baixo teor de caloria também são atrativos nutricionais (FONTES; SILVA, 2002).

As cultivares de tomate para mercado são diferentes daquelas para industrialização, variando também o sistema de cultivo. Quando a produção é destinada ao comércio para consumo natural, ou seja, mercado para mesa, o cultivo é feito pelo sistema tutorado e pelo não tutorado, para a produção industrial. No cultivo tutorado, os tomateiros são cultivados com crescimento indeterminado ou semi-determinado, para evitar que eles se desenvolvam

em contato com a terra e, assim, minimizar os problemas com doenças nas folhas e frutos. As cultivares atualmente plantadas são reunidas em cinco grupos ou tipos diferenciados: Santa Cruz, Salada, Cereja, Italiano e Agroindustrial. O grupo Santa Cruz destaca-se dentre os demais devido à notável resistência ao manuseio rude, à embalagem de madeira tipo “k”, e à sua elevada produtividade (FIGUEIRA, 2005).

A berinjela (*Solanum melongena* L.) é uma solanácea originária de regiões tropicais do Oriente, sendo cultivada há muitos séculos por chineses e árabes. Embora a área plantada no Brasil perfaça um pouco mais de 1.500 ha, há um crescente aumento no consumo desta hortaliça, motivado pela procura por parte dos consumidores de produtos mais saudáveis e com propriedades medicinais, como a redução do nível de colesterol (ANTONINI et al., 2002; FILGUEIRA, 2000). A berinjela é rica em vitaminas, riboflavina, niacina e ácido ascórbico. Além disso, é popularmente conhecida pelas suas propriedades nutracêuticas, auxiliando na redução de doenças coronarianas. A coloração arroxeada da casca da berinjela é atribuída à grande quantidade de flavonóides, que possuem propriedades antioxidantes e contribuem para o sabor da berinjela (GEBHARDT; THOMAS, 2002; SADILOVA et al., 2006).

A cultura da berinjela ainda possui menor importância econômica em relação aos principais produtos hortícolas, porém encontra-se em fase de expansão em muitos países do mundo (FAO, 1998). De acordo com IBGE (2006), os dados do Censo Agropecuário de 2006 indicam que 80% da produção nacional de berinjela (78.217 t), concentram-se na região Sudeste, seguida pelas regiões Sul, Nordeste, Centro-Oeste e Norte. No Nordeste, os Estados de Pernambuco, Bahia e Ceará despontam como os maiores produtores.

A berinjela apresenta grande variabilidade de formas e cores, no entanto poucas variedades são cultivadas comercialmente, sendo a de coloração vinho escuro e com formato alongado a de maior procura no mercado. Suas principais formas de uso são in natura, sem refrigeração e extrato seco, na forma de cápsulas (ANEFALOS, 2008).

Em todo o território nacional as hortaliças são produzidas predominantemente pelo sistema de cultivo convencional, mas nos últimos anos, tem se verificado um significativo crescimento de cultivos diferenciados com destaque para aqueles em ambiente protegido e sob sistemas orgânicos. Outro aspecto peculiar é que a maior parte da produção de hortaliças (60%) está concentrada em propriedades de exploração familiar com menos de 10 hectares intensivamente utilizadas, tanto no espaço quanto no tempo (MELO; VILELA, 2007).

A olericultura gera grande número de empregos devido à elevada exigência de mão-de-obra desde a semeadura até a comercialização. Estima-se que cada hectare plantado com

hortaliças possa gerar, em média, entre 3 e 6 empregos diretos e um número idêntico de indiretos (VILELA; HENZ, 2000). Entretanto, caracteriza-se ainda por ser uma atividade econômica de alto risco em função da maior sensibilidade às condições climáticas adversas, maior vulnerabilidade à sazonalidade da oferta gerando instabilidade de preços praticados na comercialização, além de problemas fitossanitários.

Dentre as olerícolas, as solanáceas são as mais afetadas por problemas fitossanitários (FIGUEIRA, 2000), e como consequência de sua alta vulnerabilidade destas culturas a doenças, são grandes as quantidades de agroquímicos empregados para o controle das mesmas é grande (KUROZAWA; PAVAN, 2005; LOPES; SANTOS, 1994).

Dentre os problemas oriundos do uso abusivo de agroquímicos estão: seleção de populações de patógenos resistentes ao princípio ativo, redução ou mesmo eliminação da microbiota benéfica, contaminação de aquíferos e o longo tempo de persistência e permanência de alguns desses compostos no solo e/ou nos órgãos vegetais (CAMPANHOLA; BETTIOL, 2003; ZAMBOLIM, 2001).

O gênero *Phytophthora*

Devido aos potenciais prejuízos e dificuldade de controle, doenças incitadas por fungos e pseudofungos habitantes de solo, a exemplo do gênero *Phytophthora*, destacam-se entre as principais doenças de hortaliças. O poder de disseminação e destruição deste grupo de fitopatógenos foi relatado pela primeira vez em 1876, pelo cientista alemão Heinrich Anton de Bary, em cultivos de batateira nos Estados Unidos e Europa. Essa solanácea era considerada a base da alimentação da população de muitos países, principalmente em pequenas comunidades, por isso a devastação dos batatais ocasionou a morte de, aproximadamente, um milhão de irlandeses e imigração de um milhão e meio de indivíduos para a América (LUZ; MATSUOKA, 2001). Após este primeiro relato, várias espécies deste gênero foram descritas, contando atualmente com mais de 70 espécies citadas na literatura, sendo em sua grande maioria causadoras de enfermidades a plantas de importância econômica em todo o mundo (SCHENA et al., 2008).

Phytophthora spp. apresentam características particulares que as diferenciam dos fungos verdadeiros, como parede celular com maior quantidade de glucanas e celulose que de quitina, micélio vegetativo cenocítico e diplóide na maior parte do ciclo de vida, presença de centríolos, produção de esporos biflagelados, além de diferenças moleculares, e por isso são considerados pseudofungos, pertencendo ao reino Straminipila (Chromista), filo Oomycota, classe Oomycetes, ordem Peronosporales, família Peronosporaceae (KIRK et al., 2008).

As características morfológicas além de enquadrar estes fitopatógenos em um grupo específico, são essenciais na rápida diferenciação das espécies. Capazes de sobreviver no solo e em restos orgânicos (necrotróficos) são facilmente cultivados em meio de cultura. Segundo Luz (2006), algumas características macroscópicas da forma e tipo de crescimento das colônias (petalóide, estrelar, roseta, irregular, zonada, concêntrica) e do aspecto do micélio (aéreo: ralo, farináceo, cottonoso, floculoso), podem ser importantes na distinção de algumas espécies juntamente com as estruturas microscópicas, representadas pelas medidas dos quatro tipos de propágulos infectivos (sexuais e assexuais). Os esporos assexuais desenvolvem-se endogenamente em corpos de frutificação denominados zoosporângios ou esporângios, os quais sofrem variações quanto à dimensão, forma, caducidade e inserção no esporangióforo, podendo este ser irregularmente ramificado, não ramificado, em simpódio simples, composto ou umbelado e, em algumas espécies, há a formação de novos esporângios em seu interior (ERWIN; RIBEIRO, 1996).

As espécies do gênero *Phytophthora* podem ser classificadas como homotáticas ou auto-férteis, por produzirem esporos sexuais a partir do próprio talo, ou heterotáticas, que necessitam de um talo diferente e compatível. A maioria das espécies de *Phytophthora* é auto-estéril, possuindo normalmente dois tipos de compatibilidade sexual, A1 e A2. A presença ou ausência e a morfometria dos oósporos, esporos formados a partir da fusão do protoplasma de células sexuais (gametângios), também é um caráter taxonômico bastante analisado. O gametângio masculino, chamado de anterídio, apresenta-se sob duas formas: anfígeno ou parágino, enquanto o oogônio, gametângio feminino, contendo uma oosfera, abriga o oósporo, esporo sexual (LUZ, 2006; SCHUMANN; D' ARCY, 2006).

Em condições de estresse, havendo a necessidade da perpetuação da espécie, vários mecanismos são ativados ou induzidos, como a formação de clamidósporos e oósporos que são esporos de resistência. Os esporos sexuais recém formados quando não encontram condições ideais para germinação e crescimento, poderão permanecer no solo por anos, através do engrossamento da parede. Os clamidósporos são esporos assexuais esféricos, formados terminal ou intercaladamente no micélio, que também tem como função permitir a sobrevivência das espécies, que os apresentam quando estas se encontram em condições adversas ao seu desenvolvimento, podendo permanecer no solo e em restos de cultura por até dois anos, dependendo da espécie e das condições ambientais (LUZ; MATSUOKA, 2001).

Além de caracteres morfológicos, os fisiológicos também são levados em consideração na taxonomia do gênero *Phytophthora*. Temperaturas cardinais mínima, ótima e máxima para crescimento e esporulação em meio de cultura; a liberação de zoósporos

(esporos assexuais) que pode ser abundante ou esparsa; a produção de pigmento em meio de caseína hidrolisada e tirosina; crescimento em meio com a adição de verde malaquita; são alguns destes fatores (LUZ, 2006). As ferramentas moleculares têm mostrado utilidade na identificação de algumas espécies (APPIAH et al., 2004; FALEIRO et al., 2004; SANTOS, 2010).

Phytophthora spp. além de apresentarem uma ampla gama de hospedeiros, habitam todo o globo terrestre, com diferentes condições de temperatura e umidade. Diversas espécies vegetais de importância econômica ou ecológica são consideradas hospedeiras e, constantemente estão surgindo outras que ainda não haviam sido assinaladas, como o primeiro registro de *Phytophthora nicotianae* Breda de Hann causando a necrose em bulbos de lírio da paz (*Spathiphyllum wallisi* Regel) no Brasil (FISCHER et al., 2004); o primeiro relato da podridão de frutos de abacate (*Persea americana* Mill.) causados por *Phytophthora cactorum* (Lebert e Cohn) Srhroter na Espanha (LOPEZ-HERRERA et al., 2005); o primeiro relato mundial de *Phytophthora tropicalis* Aragaki e Uchida infectando folhas de fruta-pão (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg) no Brasil (CERQUEIRA et al., 2006) e o primeiro registro de *P. nicotianae* causando danos em *Chamaerops humilis* var. *argentea* (FAEDDA et al., 2011), e em *Dendrobium candidum* e *Schizonepeta tenuifolia* (ervas da tradicional medicina chinesa) (ZHANG et al., 2008; ZHANG et al., 2009). Também tem sido descritas com certa frequência, nos últimos anos, novas espécies como *Phytophthora bisheria* Abad (ABAD et al., 2008); *Phytophthora siskiyouensis* Reeser e Hansen, (REESER et al., 2007); *Phytophthora pinifolia* (DURÁN et al., 2008); *Phytophthora gemini* sp. nov. isolada da planta aquática *Zostera marina* na Holanda (MAN et al., 2011), *Phytophthora chrysanthemi* sp. Nov (NAHER et al., 2011).

Segundo Schena et al. (2008), o gênero *Phytophthora* é composto por mais de 70 espécies, dentre as quais 18 estão presentes no Brasil (LUZ et al., 2001). Luz e Matsuoka (2001) e Luz (2006), destacam a espécie *P. nicotianae* como a mais frequente no Brasil, possuindo 31 hospedeiros. Destacam-se também entre as espécies com vários hospedeiros *P. capsici* Leonian (16), *P. citrophthora* Leonian (14), *P. palmivora* Butler (12), *P. cactorum* Lebert e Cohn, e *P. cinnamomi* Rands (9) (LUZ, 2006).

Apesar de *P. nicotianae* possuir uma vasta gama de hospedeiros, para os estudos com esta espécie em laboratório e casa-de-vegetação, um fator tem sido limitante – a esporulação do patógeno *in vitro* – o que também influencia na obtenção de métodos de inoculação que melhor representem as condições de infecção nos campos de cultivo e propiciem a reprodução dos sintomas causados por esta espécie nas plantas hospedeiras (ABDANUR et al., 2003).

A deficiência de métodos padrões eficazes para a esporulação desta espécie induz a utilização de metodologias de inoculação que inviabilizam a quantificação e qualificação dos propágulos infectivos, como o uso de discos de meio de cultura onde podem encontra-se vários propágulos infectivos como o micélio (conjunto de hifas), clamidósporos (estruturas vegetativas de sobrevivência), esporângios (estruturas reprodutivas assexuais) e zoósporos (esporos assexuais móveis formados no interior dos esporângios) (SANTOS et al., 2005)

Esporângios e zoósporos são as principais estruturas responsáveis pela disseminação, infecção e desenvolvimento das doenças causadas por *Phytophthora* (LUZ; MATSUOKA, 2001). A obtenção dessas estruturas, no entanto, nem sempre é alcançada nos meios de cultura convencionais (ABDANUR, et al., 2003). Algumas espécies de *Phytophthora* esporulam bem em meios sólidos quando submetidas a estímulos, já outras não, esporulando melhor quando cultivadas em meios líquidos (sem adição de ágar) (RIBEIRO, 1983; RODRIGUES, 1985; URBEN, 1980; ZENTMYER; ERWIN, 1970).

A composição do meio de cultura influencia tanto no crescimento quanto na esporulação de fungos fitopatógenos, os quais apresentam exigências nutricionais específicas. Para o cultivo em laboratório, é necessário que os meios de cultura simulem ou até mesmo melhorem as condições naturais (PELCZAR et al., 1996). Para isso, meios de cultura, sintéticos, semi-sintéticos e naturais, já continuam sendo desenvolvidos, a fim de atender as exigências nutricionais das diferentes espécies de fungos encontrados em a natureza (MENEZES; ASSIS, 2004).

Pulz e Massola Jr. (2009), estudando a influência de meios de cultura e fatores físicos no crescimento e esporulação de *Alternaria dauci* (Kuhn) Groves & Skolko e *Alternaria solani* (Ell & Martin) Jones & Grout, comprovaram a necessidade de fatores injuriantes, sejam de ordem física ou mecânica, para que ocorra aumento da esporulação destas duas espécies e identificaram também que há grande variação da velocidade de crescimento e de esporulação entre isolado de cada espécie.

Os principais fatores relacionados ao processo ideal para avaliação de patossistemas e reprodução dos sintomas são: planta sadia, bem nutrida e mostrando seu potencial genético, atividade do patógeno, potencial de inóculo ajustado, método de inoculação adequada e ambiente controlado visando proporcionar condições ideais para estabelecimento e desenvolvimento da doença. Para a ocorrência da infecção é necessário que haja temperatura favorável, que varia para cada espécie do patógeno envolvido (SIVIERO et al., 2002), a exemplo da espécie *P. nicotianae* que é favorecida por temperaturas elevadas, apresentando crescimento ótimo em 27-32°C (ERWIN; RIBEIRO, 1996).

Várias espécies podem causar sintomas similares no hospedeiro, incitando uma doença como a gomose dos citros, fitomoléstia de ocorrência mundial, presente em todas as regiões produtoras, que é causada principalmente por *P. citrophthora* e *P. nicotianae*, sendo a última considerada o seu principal agente no Brasil. Tais patógenos são capazes de incitar doenças em diversos órgãos vegetais sob estádios variados de maturação: tombamento (damping-off), lesões em folhas, brotos novos e hastes, podridão do pé, gomose em tronco e ramos e podridão-parda dos frutos (FEICHTENBERGER, 2001).

A gomose também é considerada a principal doença da acácia-negra (*Acacia mearnsii* Wild.), espécie vegetal bastante cultivada no Brasil para exploração do tanino presente na casca, como também em reflorestamento, fabricação de papel e celulose, carvão e lenha (SANTOS et al., 2005). De acordo com Santos e Luz (2006), duas espécies de *Phytophthora* estão associadas a esta doença causando severos danos na porção basal e mediana do tronco, tendo *P. nicotianae* maior incidência na região basal, enquanto *P. boehmeriae* Sawada se distribui de forma generalizada no tronco. No entanto, *P. nicotianae* é considerada o principal agente da gomose da acácia-negra no Brasil.

No sul da Bahia, diversas espécies vegetais de grande importância econômica como o mamoeiro (*Carica papaya* L.), a seringueira (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg.), o cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.) (LUZ et al., 2001), bem como espécies de importância ecológica como *Parinari alvimii* Prance, *Manilkara maxima* T. D. Penn., e *Harleyodendron unifoliolatum* R. S. Cowan, endêmicas ao bioma Mata Atlântica são hospedeiras de *Phytophthora* spp. (MAGALHÃES, 2009).

Recentemente, Santos (2010) incorporou à lista de espécies vegetais cultivadas no sul da Bahia e hospedeiras de *Phytophthora* spp., algumas olerícolas, como o coentro (*Coriandrum sativum* L.), tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. = *Lycopersicon esculentum* Mill.), berinjela (*Solanum melongena* L.), jiló (*Solanum gilo* Raddi), agrião (*Nasturtium officinalis* R. Br.), espinafre (*Spinacia oleracea* L.) hortelã (*Mentha* sp.), e o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.).

Phytophthora nicotianae

Phytophthora nicotianae é a espécie dentre as demais do gênero que possui maior número de hospedeiro no Brasil (LUZ, 2006). Dentre os diferentes sintomas causados por esta espécie pode-se citar: ‘damping-off’ (morte de sementes ou plântulas), podridões radiculares, do colo, de frutos, lesões foliares, murcha da parte aérea e gomoses (ERWIN; RIBEIRO, 1996). Apesar de

causar danos em todos os órgãos das plantas, este fitopatógeno é considerado o agente causal de podridões de frutos em tomate, berinjela e jiló (LAUREANO; REIS, 2006).

As espécies e variedades *P. nicotianae* var. *nicotianae*, *P. nicotianae* var. *parasitica*, *P. parasitica* var. *nicotianae*, *P. parasitica* e *P. parasitica* var. *sesami* foram incluídas na sinonímia de *P. nicotianae*, o epíteto mais antigo (ERWIN; RIBEIRO, 1996).

Dentre as espécies patogênicas às solanáceas, *P. nicotianae* é a mais adaptada a altas temperaturas, com crescimento micelial ótimo variando entre 30° e 32°C, (ERWIN; RIBEIRO, 1996; FEICHTENBERGER, 2001). A produção de esporângios é mais frequente em estações quentes e chuvosas do ano, quando os solos apresentam temperaturas elevadas e grandes variações nos teores de umidade. A formação de esporângios é favorecida por teores de umidade a potenciais matriciais variando de 5 a 70 Pka (FEICHTENBERGER, 2001).

Doenças causadas por *Phytophthora* spp. à solanáceas

Com o incremento na produção de hortaliças nas últimas décadas no Brasil, alguns problemas fitossanitários têm se intensificado, em especial aqueles causados por fungos e pseudofungos (REIS et al., 2006). Entre os principais problemas fitossanitários do tomateiro e das hortaliças solanáceas em geral, estão as doenças, causadas por oomicetos do gênero *Phytophthora*. As pimentas do gênero *Capsicum*, o pimentão, o tomateiro, a berinjela e o jiló são as principais solanáceas hospedeiras de *Phytophthora* spp.

Dentre as espécies de *Phytophthora*, três se destacam como patógenos de hortaliças, *P. infestans*, *P. capsici* Leonian e *P. nicotianae*, ocasionando murcha, requeima e podridões em frutos (LOPES et al., 2005; LAUREANO; REIS, 2006).

Devido à habilidade de sobrevivência no solo, os sintomas iniciam-se geralmente nas raízes, sendo comum o aparecimento de raízes escurecidas e em processo de apodrecimento, causando em seguida murcha generalizada da parte aérea da planta. Plantas individualizadas podem apresentar estes sintomas, mas em poucos dias o ataque estende-se, ocorrendo em reboleiras (MATSUOKA; ALENCAR, 2001). As plantas das solanáceas hospedeiras podem ser suscetíveis ao patógeno em todos os estádios de desenvolvimento, afetando desde tecidos jovens à órgãos plenamente desenvolvidos.

Plântulas enviveiradas manifestam sintomas de murcha e tombamento “damping off”, inicialmente com manchas encharcadas na região do colo, evoluindo rapidamente para lesões escuras e deprimidas, que podem provocar fendilhamento e constrição do caule, levando ao tombamento e posterior decomposição destas pelo patógeno (BEDENDO, 2011). As raízes

secundárias destacam-se facilmente da principal no arranquio devido à separação da epiderme e do córtex do cilindro central da raiz.

Permanecendo as condições de alta umidade, o quadro sintomatológico pode evoluir para um rápido desenvolvimento necrótico em folhas, frutos e hastes. Nos frutos em qualquer estágio de desenvolvimento, observa-se inicialmente sintoma de anasarca que evolui para podridões deprimidas, sem apresentar cheiro característico de podridão por bactérias (MATSUOKA; ALENCAR, 2001). A rápida colonização do tecido proporciona o desenvolvimento de um micélio aéreo branco, abundante, de aspecto cotonoso. Em tomates o sintoma é mais evidente quando o fruto é atacado ainda verde, sendo observada uma podridão dura, de cor marrom a pardo-escura, que pode cobrir parte ou toda a sua superfície sem, entretanto, causar sua queda (REIS, 2010).

Mesmo os zoósporos tendo a capacidade de se locomoverem até as raízes da planta hospedeira, a disseminação passiva é mais eficiente por proporcionar a distribuição do inóculo a longas distâncias, tanto na forma de enxurrada (chuvas e irrigação por sulco) como na forma de respingos (chuva ou irrigação por aspersão), por tratos culturais de movimentação de solo como aração e gradagem, pelo transporte de mudas e sementes contaminadas.

O início da infecção ocorre quando as hifas infectivas penetram diretamente a superfície intacta do tecido vegetal, através da formação de apressórios, assim como estômatos ou ferimentos (MATSUOKA; ALENCAR, 2001). O processo de colonização ocorre através de pressões mecânicas exercidas pelas hifas e produção de toxinas e enzimas pectolíticas e proteolíticas, desenvolvendo inter e intracelularmente e formando novas estruturas vegetativas e reprodutivas. O micélio desenvolve-se inicialmente entre as células, formando estruturas semelhantes a haustórios e com o avanço da colonização, o patógeno passa a colonizar intracelularmente, atingindo todos os tecidos, inclusive o sistema vascular (MATSUOKA, 1988).

O aparecimento e desenvolvimento dos sintomas em campo ou em frutos pós-colheita e a disseminação, podem ser retardados ou estimulados em decorrência dos fatores ambientais existentes. No campo, sob condições ambientais favoráveis de umidade e temperatura, diversas gerações ou ciclos de esporângios podem ser produzidos a fim de infectarem plantas, caracterizando uma doença policíclica, podendo devastar rapidamente uma plantação inteira (TRIGIANO et al., 2010). Os esporângios da maioria das espécies de *Phytophthora* são formados no solo dentro de 12h a partir de quando o potencial mátrico alcançar entre -0,1 e -0,15 bars. Como a capacidade de campo é próxima de -0,3 bars de potencial da água, os

esporângios formam-se sob condições de solo bastante úmido. Os zoósporos formados necessitam de solos saturados (0 bar de potencial de água) por alguns horas para se locomoverem pelos poros saturados através de um gradiente quimiotático formado a partir de exudatos de compostos de carbono da rizosfera (OWNLEY; BENSON, 2010).

Controle alternativo

O controle das doenças ocasionadas por *Phytophthora* spp. compreende o uso de medidas profiláticas com a utilização de defensivos químicos, práticas culturais, escolha do porta-enxerto, desinfestação de solos para produção de mudas, dentre outros (MAY-DE MIO et al., 2002). O controle de doenças de plantas por meio de agroquímicos ainda é o mais utilizado, pois poderão apresentar em curto prazo, efeito positivo para o produtor. Entretanto, além do surgimento de isolados dos fitopatógenos resistentes às substâncias químicas utilizadas (RODRIGUES et al., 2007; TIMMER et al., 1998), os resultados para a sociedade e para o meio ambiente podem se tornar negativos devido à poluição causada pelos resíduos, exacerbados principalmente quando aplicados de forma inadequada. A conscientização dos consumidores a respeito do efeito dos alimentos na manutenção da saúde gera maior exigência por produtos de qualidade, especialmente para o consumo *in natura*, em que a relação produto/consumidor é bastante estreita (FORTES; OSÓRIO, 2003).

Nesse contexto, termos como agricultura alternativa ou agricultura sustentável obtêm enfoque político (ZADOCKS, 1992) e estimulam a busca de novas medidas de proteção das plantas contra as doenças. Um dos aspectos deste tipo de agricultura é o controle alternativo de doenças de plantas, no qual estão incluídos o controle biológico (AMORIM; MELO, 2002; BETTIOL; MORANDI, 2009), a utilização de compostos antimicrobianos (BERNARDO; BETTIOL, 2010; BOSENBECKER et al., 2006; SCHWAN-ESTRADA et al., 2000) e a indução de resistência em plantas (BONALDO, 2005; SILVA et al., 2007).

Uma das formas de manejo sustentável de grande interesse no cenário mundial baseia-se na utilização de sistemas orgânicos de produção que evitam ou excluem o uso de agroquímicos (SAMINÉZ, 1999). O Brasil ocupa a segunda posição na América Latina em área manejada organicamente, com estimativa de 800.000 ha cultivados neste sistema (WILLER; YUSSEFI, 2005), sendo a soja e as hortaliças as principais culturas produzidas (DINIZ et al., 2006). A agricultura orgânica favorece maior independência dos agricultores quanto aos fatores de produção, além de lhes propiciar maior estabilidade financeira, pois, a diversificação da produção, os deixa menos vulneráveis às variações de preços de mercado e mais competitivos (CAMPANHOLA; VALARINI, 2001). Todavia, existe pouco

conhecimento sobre sistemas orgânicos de produção, incluindo os aspectos relacionados às doenças de plantas (RODRIGUES et al., 2004; VAN BRUGGEN, 2001).

Nas últimas décadas, as propriedades antimicrobianas das plantas vêm sendo estudadas mais criteriosamente e a utilização de óleos essenciais ou extratos botânicos, com compostos naturais biologicamente ativos contra pragas agrícolas tem sido frequentemente relatada (BOWERS; LOCKE, 2004; LOPES et al., 2005; SILVA; BASTOS, 2007;). Os compostos secundários presentes no extrato bruto ou óleo essencial das plantas podem ser, ao lado da indução de resistência, mais uma forma potencial de controle alternativo de doenças em plantas cultivadas (SILVA et al., 2005).

A identificação de novos compostos químicos a partir de plantas nativas e/ou medicinais possibilita a obtenção de algumas substâncias capazes de controlar ou inibir o desenvolvimento dos fitopatógenos, apresentando segundo Stadnik e Talamini (2004), três atividades principais: antimicrobiana, agindo direto sobre o patógeno; indutores de resistência, ativando os mecanismos de defesa da planta através de moléculas bioativas; e também como bioestimulantes do crescimento da planta. O uso de plantas no tratamento de doenças humanas e de animais é conhecido e estudado há anos, porém, sua utilização no tratamento das doenças de plantas e controle de pragas é mais recente (MARQUES et al., 2002; SILVA et al., 2008).

Até o momento, pouco se sabe sobre a composição química de 99,6% das plantas de nossa flora, estimada entre 40 mil a 55 mil espécies (MING, 1996). Além disso, uma grande quantidade de compostos secundários das plantas medicinais já isolados e com estrutura química determinada ainda não foi estudada quanto às suas atividades biológicas. Esses compostos pertencem a várias classes distintas de substâncias químicas, como alcalóides, terpenos, ligninas, flavonóides, cumarinas, benzenóides, quinonas, xantonas, lactonas e esteróides, entre outras (DI STASI, 1996). Quando esses compostos são extraídos das plantas por processos específicos, como a destilação por arraste de vapor de água, originam líquidos de consistência semelhante ao óleo, voláteis, dotados de aroma forte, quase sempre agradável, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, denominados de óleos essenciais (SILVA et al., 1995).

Compostos secundários de plantas medicinais estão distribuídos em um grande número de famílias botânicas, com muitos deles apresentando atividade antimicrobiana, como é o caso dos alcalóides, com origem biossintética a partir da via metabólica do ácido shiquímico (BENNETT; WALLSGROVE, 1994).

O óleo essencial de *Piper aduncum* L., apresenta excelente rendimento (2,5 a 3,5%), é rico em dilapiol (31,5 a 91,1%), um éter fenílico com alto teor de oxigenação e possui atividades fungicida, larvicida, inseticida e moluscicida (SOUSA et al., 2008). Quando este óleo foi testado contra o fungo *Moniliophthora perniciosa* Aime & Phillips-Mora (sin. *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer), agente causal da vassoura-de-bruxa no cacauzeiro e cupuaçuzeiro, nas concentrações de 50 a 100 ppm inibiu 100%, tanto o crescimento quanto a germinação dos esporos deste fungo (BASTOS, 1997). Também como 100% de inibição da germinação de conídios e do crescimento micelial de *Colletotricum musae* Berk e Curt isolado de banana, foram obtidos com concentrações de 100 µg/mL e 150 µg/mL (BASTOS; ALBUQUERQUE, 2004).

O óleo essencial de *Piper callosum* Ruiz & Pav., rico em safrol (50-70%), quando testado em *M. perniciosa* inibiu completamente a germinação e o crescimento nas concentrações de 500 e 1000 ppm, respectivamente (BASTOS, 2007). Quando testes *in vitro* foram realizados com o óleo essencial de *P. callosum* e *P. enckea* sobre o crescimento micelial dos isolados de *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*, constatou-se que nas concentrações de 1µL e 0,75 /mL, respectivamente, houve 100% de inibição do crescimento micelial (SILVA; BASTOS, 2007).

A citronela (*Cymbopogon nardus* L.) possui uma composição de óleo essencial com alto teor de geraniol e citronelal (CASTRO et al., 2007). O citronelal é utilizado como material básico para a síntese de importantes compostos químicos denominados iononas e para a síntese de vitamina A. O geraniol possui atividade anti-séptica, inibindo o crescimento de fungos e bactérias (PEREIRA, 2009). A utilização deste óleo em testes *in vitro* proporcionou 100% de inibição da germinação de urediniosporos de *Phakopsora pachyrhizi* Sidow isolado da soja, na concentração de 0,5mL (MEDICE et al., 2007), como também provocou 100% de inibição no crescimento micelial de *M. perniciosa* na concentração de 100 ppm, e, na concentração de 500 ppm, 100% da germinação dos basidiósporos deste patógeno (BASTOS, 2007).

Outra espécie do gênero *Cymbopogon*, conhecida popularmente como capim-santo, capim limão (*Cymbopogon citratus* Stapf), além de ser bastante utilizada para fins fitoterápicos, possui propriedades antimicrobianas que o faz despontar com potencial biocontrolador de doenças de plantas. Este óleo demonstrou efeito inibitório a *Colletotrichum gloeosporioides* (ROZAWALKA et al. 2008), além da eficiência no controle de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G.W. Wilson e *Phoma sorghina* (Sacc.) Boerema, Dorenb. & Kesteren em grãos de sorgo (SOMDA et al., 2007).

O óleo essencial e extrato aquoso de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) na concentração de 10% inibiu totalmente o crescimento micelial de *Glomerella cingulata* (Stonemam) Spauld & Schrenk e *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc, apresentando efeito fungitóxico satisfatório também na concentração de 1% (ROZWALKA et al., 2008).

Várias plantas que possuem substâncias comprovadamente antimicrobianas, vêm sendo bastante utilizadas no controle alternativo a doenças de plantas, tanto isoladamente quanto em conjunto com outras espécies vegetais. Tais compostos podem ser aplicados através da atomização da parte aérea, ou incorporados ao solo, a fim de controlar a densidade populacional principalmente de patógenos habitantes do solo como *Phytophthora* spp. (BOWERS; LOCKE, 2004).

Wang e colaboradores (2001) avaliaram a eficiência de extratos de 88 espécies de plantas e 19 deles inibiram a formação de zoósporos e o crescimento *in vitro* de *P. infestans*. Óleos essenciais de *Piper aduncun*, *Piper callosum* e *Cymbopogon nardus* foram testados sobre o crescimento micelial e germinação de zoósporos de oito espécies de *Phytophthora*, *P.heveae*, *P.idaei*, *P.bohemeriae*, *P.palmivora*, *P.capsici*, *P.nicotiana*, *P. drechsleri* e *P. citrophthora*. O óleo de *C. nardus* a 0,5µL/ml, inibiu 100% o crescimento das seis primeiras espécies apresentadas, enquanto que os demais apresentaram apenas efeito fungistático. O óleo de *C. nardus* na concentração de 0,5 µL/ml inibiu totalmente a germinação dos zoósporos de *P. citrophthora*, *P. bohemeriae* e *P. nicotiana* mesmo após 24 horas de contato destes com o óleo (LIMA, 2008; VALIENSE, 2009). Extrato de alho (*Allium sativum* L.) inibiu completamente a formação de zoósporos (KE-QIANG; VAN BRUGGEN, 2001; WANG et al., 2001) e a formação de colônias de *P. infestans* (KE-QIANG; VAN BRUGGEN, 2001). O extrato de pimenta longa (*Piper longum* L.) reduziu em 60% a mortalidade de tomateiros inoculados com *P. infestans* (LEE et al., 2001). Em experimento semelhante, todos os tomateiros tratados com curcumina, produto derivado do rizoma de açafrão-da-índia (*Curcuma longa* L.), sobreviveram depois de inoculados com *P. infestans*, do mesmo modo que aquelas tratadas com o fungicida clorotalonil (KIM et al., 2003). O óleo de cravo-da-índia nas concentrações de 0,3 e 0,75 µL/ml foi capaz de inibir o crescimento micelial e a germinação dos zoósporos de *P. palmivora* e *P. citrophthora* (SILVA, 2010).

Extrato bruto ou óleo essencial obtidos a partir de plantas medicinais e aromáticas têm indicado o potencial das mesmas no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela indução de mecanismos de defesa, indicando a presença de composto(s) com característica de elicitor(es)

(SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005).

O fracionamento dos metabólitos secundários dessas plantas, bem como a determinação da atividade biológica dessas moléculas, com respeito à atividade elicitora ou antimicrobiana poderá contribuir para a aquisição de conhecimentos que reforcem sua possível utilização como um método alternativo de controle de doença de plantas.

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram: i. - testar o efeito de meios de culturas, regimes de luz, e pH na produção de esporângios e liberação de zoósporos de *Phytophthora nicotianae*; ii. - avaliar o efeito *in vitro* e *in vivo* de óleos e extratos vegetais no controle de *P. nicotianae* em tomateiro e berinjela cultivadas organicamente no sul da Bahia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, Z. G. et al. *Phytophthora bisheria* sp. nov., a new species identified in isolates from the *Rosaceous raspberry*, rose and strawberry in three continents. **Mycologia**, New York, v. 100, n. 1, p. 99-110, 2008.
- ABDANUR, A.; SANTOS, A. F.; TRATCH, R. Crescimento micelial e esporulação de isolados de *Phytophthora* sp. patogênicos à Acácia-negra. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, v. 47, n. 2, p. 33-42, 2003.
- AGRA, M. F. Diversidade e endemismo de Solanaceae no Brasil. In: LOIOLA, M. I. B.; BASEIA, I. G.; LICHSTON, J. E. **Atualidades desafios e perspectivas da botânica no Brasil**. Natal, Imagem Gráfica, p. 285-287, 2008.
- AMORIM, E. P. da R.; MELO, I. S. de. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 24, p. 565-568, 2002.
- ANEFALOS, L. C. et al. Sazonalidade da oferta de produtos hortícolas: o mercado de berinjela. In: XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Rio Branco. **Anais...** Fortaleza: Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2008. p. 1-18.
- ANTONINI, A. C. C. et al. Capacidade produtiva de cultivares de berinjela. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 4, p. 646-648, 2002.
- APPIAH, A. A.; JENNINGS, P.; TURNER, J. A. *Phytophthora ramorum*: One pathogen and many diseases, an emerging threat to forest ecosystems and ornamental plant life. **Mycologist**, Cambridge, v. 18, p. 145-150, 2004.
- BASTOS, C. N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipellis pernicioso* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 441-443, 1997.
- BASTOS, C. N.; Fungitoxicidade *in vitro* e ação protetora e curativa de óleos essenciais contra *Crinipellis pernicioso*. **Revista Brasileira de Ciências agrárias**, Belém do Pará, n. 47, p.137-148, 2007.
- BASTOS, N. B.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle de pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 555-557, 2004.

BEDENDO, I. P. Damping Off. In: AMORIM L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. v. 1, p. 435-441.

BENNETT, R.; WALLSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. **New Phytologist**, Cambridge, v. 127, p. 617-633, 1994.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM L. Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 3 ed. São Paulo: Ceres, v.1, 1995. 919 p.

BERNARDO, E. R. A.; BETTIOL, W. Controle da pinta preta dos frutos cítricos em cultivo orgânico com agentes de biocontrole e produtos alternativos. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 37-42, 2010.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 341 p.

BONALDO, S. M.; PASCHOLATI, S. F.; ROMEIRO, R. S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. (Eds.) **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 11-28.

BOSENBECKER V. K; GOMES C. B.; GOMES J. C. C. Efeito de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de *Phytophthora infestans* em batata. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 1, p. 1721-1724, 2006.

BOWERS, J. H.; J. C. LOCKE, Effect of formulated plant extracts and oils on population density of *Phytophthora nicotianae* in soil and control of *Phytophthora* blight in the greenhouse. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, p. 11-16, 2004.

CAMPANHOLA, C.; VALARINI, P. J. A agricultura orgânica e seu potencial para o pequeno agricultor. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 18, n. 3, p. 69-101, 2001.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. **Métodos Alternativos de Controle Fitossanitário**. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, 2003. 279 p.

CASTRO, H. G.; BARBOSA, L. C. A.; LEAL, T. Crescimento, teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 04, p. 55-61, 2007.

CERQUEIRA, A. O.; LUZ, E. D. M. N.; Souza, J. T. First record of *Phytophthora tropicalis* causing leaf blight and fruit rot on breadfruit in Brazil. **Plant Pathology**, Oxford, v. 55, n. 1, p. 296-296, 2006.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. Editora UNESP, São Paulo, 1996.

DINIZ, L. P. et al. Avaliação de produtos alternativos para o controle da requeima do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 2, p. 171-179, 2006.

DURÁN, A. et al. *Phytophthora pinifolia* sp. nov. associated with a serious needle disease of *Pinus radiata* in Chile. **Plant Pathology**, Saint Paul, v. 57, n. 4, p. 715-727, 2008.

ERWIN, D. C.; RIBEIRO, O. K. **Phytophthora diseases worldwide**. Saint Paul: APS Press, 1996. 562 p.

FALEIRO, F. G. et al. Caracterização e diversidade genética de isolados de *Phytophthora* spp. do cacauzeiro com base em marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 303-306, 2004.

FAO. **The state of the world's plant genetic resources for food and agriculture**. Rome: Food and Agriculture Organization of United Nations, 1998. 510 p.

FAEDDA, R. et al. First report of *Phytophthora nicotianae* as pathogen of blue Mediterranean fan palm. **New Disease Reports**, v. 23, n. 3, p. 3, 2011.

FEICHTENBERGER, E. Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros. In: LUZ, E. D. M. N.; SANTOS, A. F.; MATUSOKA, K.; BEZERRA, J.L (Eds.). **Doenças Causadas por Phytophthora no Brasil**. Campinas. Livraria e Editora Rural. 2001. v. 1, cap. 9, p. 283-342.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: UFV, 2000. 402 p.

FISCHER, I. H. et al. Ocorrência de *Phytophthora parasitica* em Lírio da Paz no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 6, 2004.

FONTES, P. C. R; SILVA, D. J. H. Fatores climáticos. In: FONTES, P. C. R. **Produção de tomate de mesa**. Viçosa: Editora Aprenda Fácil. 2002. p. 23-25.

FORTES, J. F.; OSÓRIO, V. A. **Pêssego: fitossanidade**. Brasília: Embrapa Clima Temperado, 2003. 53 p. (Informação Tecnológica).

GEBHARDT, S. E., THOMAS, R. G. **Nutritive Value of foods**. USDA, Home Gardem Bulletin, n. 72, 2002.

HORTALIÇAS em números. Hortbrasil: Instituto Brasileiro em Qualidade em Horticultura, 2010. Disponível em: <<http://www.hortibrasil.org.br>>. Acesso em: 02 fev. 2012.

HUNZIKER, A.T. **Genera Solanacearum**. The genera of Solanaceae illustrated, arranged according to a new system. Ruggell: A.R.G.Gantner Verlag. 2001. 500 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Sistema IBGE de Recuperação Automática**. Banco de dados agregados. Brasília: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 10 jan. 2012.

KE-QIANG, C.; VAN BRUGGEN, A. H. C. Inhibitory efficacy of several plant extracts and plant products on *Phytophthora infestans*. **Journal of Agricultural University of Hebei**, Hebei, v. 24, p. 108-116, 2001.

KIM, M. K.; CHOI, G. J.; LEE, H. S. F. Fungicidal property of *Curcuma longa* L. rhizome-derived curcumin against phytopathogenic fungi in a greenhouse. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 1578-1581. 2003.

KIRK, P. M., et al. Dictionary of the fungi. 10 ed. **CAB International**, Wallingford. 2008.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. Doenças das solanáceas. In KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 589-596.

LAUREANO, I. B.; REIS, A. **Caracterização de isolados de *Phytophthora nicotianae* obtidos de tomate, berinjela e jiló**. Brasília, DF; Embrapa Hortaliças, 2006. 15 p. (Embrapa Hortaliças. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 20).

LEE, S. E. et al. Fungicidal activity of piperonaline, a piperidine alkaloid derived from long pepper, *Piper longum* L., against phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, Guildford, v. 20, p. 523-528, 2001.

LOPES, C. A.; REIS, A.; BOITEUX, L. S. Doenças fúngicas. In: LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C. (Ed.). **Doenças do tomateiro**. Brasília, DF, Embrapa Hortaliças, 2005. p. 19-51.

LOPES, C. A.; SANTOS, J. R. M. **Doenças do tomateiro**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1994. 61p.

LÓPEZ-HERRERA C. J., PÉREZ-JIMÉNEZ, R. M.; ZEA-BONILLA, T. First report of *Phytophthora cactorum* causing fruit rot on avocado in Spain. **Plant Disease**. Saint Paul, v. 89, p. 1362, 2005.

LUZ, E. D. M. N. O gênero *Phytophthora* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 3 (suplementos), p. 80-81, 2006.

LUZ, E. D. M. N.; MATSUOKA, K. *Phytophthora*: fungo, protista ou chromista? In: LUZ, E. D. M. N.; SANTOS, A. F. dos; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J. L. (Eds.) **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Livraria e Editora Rural, 2001. v.1, cap.5, p. 1-14.

LUZ, E. D. M. N. et al. **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Livraria e Editora Rural, 2001. 754 p.

MAGALHÃES, D. M. A. **Diversidade de fungos na serrapilheira e de *Phytophthora* na rizosfera de plantas da Mata Atlântica no Sul da Bahia**. 2009. 139 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2009.

MAKISHIMA, N.; MELO, W. F. O rei das hortaliças. **Revista Cultivar Hortaliças e Frutas**, 2004/2005. Disponível em: <http://www.grupocultivar.com.br/arquivos/hf29_rei.pdf>. Acesso em 20 jun. 2011.

MAN, I. V. W. A. et al. *Phytophthora gemini* sp. nov., a new species isolated from the halophilic plant *Zostera marina* in the Netherlands. **Fungal Biology**, Oxford, v. 115, n. 8, p. 724-732, 2011.

MARQUES, M. C. S. et al. Efeito fungitóxico dos extratos de *Caryocar brasiliense* Camb. sobre os fungos *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum truncatum* e *Fusarium oxysporum*. **Ciência Agrotecnica**, Lavras, p. 1410-1419, 2002.

MATSUOKA, K. **Resistência de *Capsicum anuum* L. à *Phytophthora capsici* Leonian: um estudo ultraestrutural da interação.** 1988. 112 f. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1988.

MATSUOKA, K.; ALENCAR, V. C. Murcha ou requeima do pimentão e podridão do fruto de abóbora causados por *Phytophthora capsici* Leonian. In: E. D. M. N. Luz; A. F. dos SANTOS; K. MATSUOKA; J. L. BEZERRA (Eds.) **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil.** Campinas: Livraria e Editora Rural, 2001, v. 1, p. 509-559.

MAY-DE MIO, L. L.; GHINI, R.; KIMATI, H. Solarização para controle de *Phytophthora parasitica* em mudas de citros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 254-258. 2002.

MEDICE, R. Produtos alternativos no manejo da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) da soja. 2007. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

MELO, P. C. T.; VILELA, N. J. **Importância da cadeia produtiva brasileira de hortaliças** – Palestra apresentada na 13ª Reunião Ordinária da Câmara Setorial da Cadeia Produtiva de Hortaliças/MAPA. Brasília, 2007. Disponível em:
< <http://www.abhorticultura.com.br> >. Acesso em 29 de jan. de 2009.

MENEZES, M.; ASSIS, S. M. P. **Guia prático para fungos fitopatogênicos.** 2ª ed. Recife PE. Imprensa Universitária da UFRPE, 2004, 106 p.

MING, L. C. Coleta de plantas medicinais. In: L.C. Di Stasi (Ed.). **Plantas medicinais: arte e ciência** - um guia de estudos multidisciplinar. São Paulo: Universidade Paulista, 1996. 345 p.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Hortifrutigranjeiros.** Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 8 out. 2009.

NAHER, M. et al. *Phytophthora chrysanthemi* sp. nov., a new species causing root rot of chrysanthemum in Japan. **Mycological Progress**, v. 10, p. 21-31, 2011.

OLMSTEAD, R. G. R. et al. Phylogeny and provisional classification of the Solanaceae based on chloroplast DNA. In: NEE, M. et al. (Ed.) **Solanaceae IV.** Advances in Biology and Utilization. Kew: Royal Botanic Gardens, 1999. p. 111-138.

OWNLEY, B. H.; BENSON, D. M. Fitopatógenos do solo. In: TRIGIANO, R. N.; WINDHAN, M. T.; WINDHAN, A. S. (Eds.) **Fitopatologia**. Conceitos e Exercícios de Laboratório. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

PELCZAR, M. J.; CHANG, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**, Vol. 2, 2ª ed. São Paulo: Makron Books, 1996. 554 p.

PEREIRA, F. O. **Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bar sobre dermatófilos do gênero *Trichophyton***. 2009, 117 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

PULZ, P.; MASSOLA, Jr.; N., S. Efeito de meios de cultura e fatores físicos no crescimento e esporulação de *Alternaria dauci* e *A. solani*. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 35, n. 2, p.121-126. 2009.

REESER, P. W.; HANSEN, E. M.; SUTTON, W. *Phytophthora siskiyouensis*, a new species from soil, water, myrtlewood (*Umbellularia californica*) and tanoak (*Lithocarpus densiflorus*) in southwestern Oregon. **Mycologia**, New York, v. 99, n. 5, p. 639-643, 2007.

REIS, A.; RIBEIRO, F. H. S.; MIZUBUTI, E. S. G. Caracterização de isolados de *Phytophthora infestans* do Distrito Federal e de Goiás. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 270-276, 2006.

REIS, A. **Requeima**: doença destrutiva e comum ao tomateiro e à batateira. Brasília: Embrapa hortaliças, 2010. 7 p. (Comunicado técnico - Embrapa hortaliças).

RIBEIRO, O. Physiology of asexual sporulation and spore germination in *Phytophthora*. Microbial antagonism to *Phytophthora*. In: D. C. ERWIN, S. BARTNICKI-GARCIA, and P. H. TSAO. **Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology**. Saint Paul: APS press, 1983. p. 55-70.

RODRIGUES, C. **Caracterização morfofisiológica de *Phytophthora*, obtidos de figo e de goiaba**. Viçosa: UFV, 1985. 77 p.

RODRIGUES, M. B. C.; ANDREOTE, F. D.; SPÓSITO, M. B.; AGUILLAR-VILDOSO, C. I.; ARAÚJO, W. L.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Resistência a benzimidazóis por *Guignardia citricarpa*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 42, p. 323-327, 2007.

RODRIGUES, V. J. L. B.; MICHEREFF, S. J.; MENEZES, D.; AGUIAR FILHO, M. R.; SILVA, L. G. C.; BIONDI, C. M. Epidemiologia comparativa da alternariose em cultivares de brássicas sob cultivo convencional e orgânico. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 30, n. 2, p. 226-233, 2004.

ROZWALKA, L. C. et al. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, 2008.

SADILOVA, E.; STINTZING, F. C.; CARLE, R.; Anthocyanins, colour and antioxidant properties of eggplant (*Solanum melongena* L.) and violet pepper (*Capsicum annuum* L.) peel extracts . **Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 61, n.7-8, p.527-535, 2006.

SAMINÊZ, T. C. de O. **Efeito do sistema de cultivo, tensão da água, biomassa microbiana e temperatura do solo nos fluxos de CH₄ e N₂O em solos de cerrados**. 1999. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília.

SANTOS, A. F.; LUZ, E. D. M. N.; SOUZA, J. T. *Phytophthora nicotianae*: agente etiológico da gomose da acácia-negra no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 81-84, 2005.

SANTOS, A. F. dos; LUZ, E. D. M. N. Distribuição de *Phytophthora nicotianae* e *P. boehmeriae* nas plantações brasileiras de acácia-negra. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 4, p. 398-400, 2006.

SANTOS, M. V. O. **Identificação de *Phytophthora* spp. e de agentes de biocontrole em diversos cultivos no sul da Bahia**. 2010. 91 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus.

SCHUMANN, G. L.; D' ARCY, C. J. **Essential plant pathology**. Saint Paul: APS Press, 2006. 338 p.

SCHENA, L.; DUNCAN, J. M.; COOKE, D. E. L. Development and application of a PCR-based 'molecular tool box' for the identification of *Phytophthora* species damaging forests and natural ecosystems. **Plant Pathology**, Saint Paul, v. 57, n. 1, p. 64-75, 2008.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. F. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L. S., DI PIERO, R. M., CIA, P., PASCHOLATI, S. F., RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. (Eds.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ. 2005. p. 125-138.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Revista Floresta**, Curitiba, v. 30, n. 1, p. 129-137, 2000.

SILVA, D. J. H.; VALE, F. X. R. **Tomate**: Tecnologia de produção. Viçosa, MG. UFV; Brasília, Ministério do Desenvolvimento Agrário. 2007.

SILVA, M. N. **Avaliação em vitro da atividade antifúngica dos óleos essenciais de arueira (*Schinus Terebinthfolius*) e cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) sobre as principais espécies de *Phytophthora* causadoras da podridão-parda do cacauzeiro no Brasil**. 2010. 22 f. Monografia (Graduação) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus.

SILVA, C. L.; SANTOS, E. S. L.; LUZ, E. D. M. N. Ação fungitóxica de óleos essenciais sobre o desenvolvimento de espécies de *Phytophthora* que atacam o cacauzeiro. In: XIV Seminário de Iniciação Científica-Pesquisa e sociedade, 2008, Ilhéus. **Anais...** Ilhéus: Universidade Estadual de Santa Cruz, 2008. CD-ROM 1.

SILVA, D. M. H.; BASTOS, C. N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 143-145, 2007.

SILVA, I. et al. **Noções Sobre o Organismo Humano e Utilização de Plantas Medicinais**. Cascavel: Assoeste, 1995. 203 p.

SILVA, M. B. et al. Desenvolvimento de produtos à base de extratos de plantas para o controle de doenças de plantas. In: VENEZON, M.; PAULA JR., T. J.; PALLINI, A. (Eds.). **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa: EPAMIG/CTZM, 2005. p. 221-246.

SILVA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; BEDENDO, I. P. Indução de Resistência em Tomateiro por Extratos Aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 3, 2007.

SIVIERO, A.; FURTADO, E. L.; MACHADO, M. A. Métodos de inoculação e avaliação de doenças causadas por *Phytophthora* em citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 23, n. 1, p. 203-219, 2002.

SOMDA, I.; LETH, V.; SEREME, P. Antifungal effect of *Cymbopogon citratus*, *Eucalyptus camaldulensis* and *Azadirachta indica* oil extracts on sorghum seed-borne fungi. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 6, p. 1182-1189, 2007.

SOUSA, P. J. C. et al. Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper aduncum* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 217-221, 2008.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. **Instituto Plantarum**, Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005, 639 p.

STADNIK M. J; TALAMINI V. **Manejo Ecológico de Doenças de Plantas**. Florianópolis: CCA/UFSC. 2004. 293 p.

TIMMER, L.W. et al. Environmental factors affecting production, release, and field populations of conidia of *Alternaria alternata*, the cause brown spot of citrus, **Phytopathology**, Saint Paul, v. 88, n. 11, p. 1218-1223, 1998.

TRIGIANO, R. N.; AMENT, M. H.; LAMOUR, K. H. Oomicetos. In: TRIGIANO, M. T.; WINDHAM, M. T.; WINDHAM, A. S. **Fitopatologia: conceitos e exercícios de laboratório**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, p. 215-225.

URBEN, A. F. ***Phytophthora capsici* Leonian agente etiológico da murcha de *Capsicum annum* L.** 1980. 63 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1980.

VALIENSE, M.L. **Avaliação in vitro da germinação de zoósporos de *Phytophthora spp.* sob a ação dos óleos essenciais**. 2009. 25 f. Monografia (Graduação) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2009.

VAN BRUGGEN, A. Switching over to organic farming systems: consequences for plant pathological research. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 145, 2001.

VILLELA, N. J.; HENZ, G.P. Situação atual da participação das hortaliças no agronegócio brasileiro. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, v. 17, p. 71-89, 2000.

WANG, S.; WANG, X.; LIU, J.; CAO, K. Screening of Chinese herbs for the fungitoxicity against *Phytophthora infestans*. **Journal of Agricultural University of Hebei**, Hebei, v. 24, p. 101-107. 2001.

WILLER H; YUSSEFI M. **The world of organic agriculture. Statistics and emerging trends.** Bonn: International Federation of Organic Movement (IFOAM) & Research Institute of Organic Agriculture FiBL, 2005.167 p.

ZADOKS, J.C. The costs of change in plant protection. **Journal of Plant Protection** v. 9, p. 151-159, 1992.

ZAMBOLIM, L. **Manejo integrado da fitossanidade:** cultivo protegido, pivô central e plantio direto. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 722 p.

ZENTMYER, G. A.; ERWIN, D. C. Development and reproduction of *Phytophthora*. **Phytopathology**, Saint Paul, n. 60, p. 1120-1127, 1970.

ZHANG, J. Z.; LI, J.; XU, T. First report of *Phytophthora nicotianae* causing blight of *Dendrobium candidum* Zhejiang province, China. **Plant Pathology**, Oxford, v. 57, n. 2, p. 370, 2008.

ZHANG, Z.; CAO, L.; YANG, C. M.; WEI, J. H. First report of *Phytophthora nicotianae* causing black shank of *Schizonepeta tenuifolia* in China. **Plant Pathology**, Oxford, v. 58, n. 4, p. 804, 2009.

CAPÍTULO II

INFLUÊNCIA DE MEIOS DE CULTURA, LUMINOSIDADE E pH NO CRESCIMENTO
E ESPORULAÇÃO DE *Phytophthora nicotianae*

1 **Influência de meios de cultura, luminosidade e pH no crescimento e**
2 **esporulação de *Phytophthora nicotianae***

3
4 **Antônio A. Pimenta Neto^{1,2}, Edna D. M. N. Luz²; Gláucio D. Gonçalves², Marcela T.**
5 **Venturini² & Sônia M. A. Oliveira¹**

6
7 ¹UFRPE - Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n,
8 Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brasil; ²CEPLAC/CEPEC - Sessão de Fitopatologia,
9 Laboratório de Phytophthora, Rodovia Ilhéus-Itabuna, s/n, 45650-000, Ilhéus, BA, Brasil

10
11 Autor para correspondência: Edna D. M. N. Luz, email: ednadora@yahoo.com.br

12
13
14 **RESUMO**

15 O comportamento de dois isolados *Phytophthora nicotianae* foi avaliado em meios de
16 cultura líquidos e agarizados de cenoura (c), tomate (t), berinjela (b), feijão (f), soja (s),
17 mandioca (m) e suco de vegetais (V8), submetidos a luz (L) e escuro constante (E), e
18 fotoperíodo de 12h (LE), à 25±2°C. O pH inicial dos meios e após ajuste para 4,8 foi
19 correlacionado com o crescimento e esporulação nos meios líquidos. O crescimento
20 vegetativo foi avaliado em meios agarizados pelo crescimento radial diário e em meios
21 líquidos, por biomassa produzida após 10 e 15 dias de incubação. A esporulação
22 (zoósporos/mL) nos diferentes meios foi ponderada no 10º e 15º dia em câmara de Neubauer,
23 sendo os dados transformados para $\sqrt{x+1}$. Nos meios agarizados, (E) proporcionou os
24 maiores crescimentos, entretanto em todos os regimes de luz os meios se diferenciaram,
25 destacando-se dos demais os de (m), (b), (t), e (V8) os dois primeiros com os maiores

26 crescimentos e os dois últimos com os menores. Os regimes de luz não influenciaram
27 significativamente o crescimento nos meios líquidos com 10 dias de incubação. Já com 15
28 dias, o crescimento vegetativo nos meios (b) (c) (t) e (V8), foi inversamente proporcional a
29 presença de luz, mas foi um fator essencial para a esporulação, pois se verificou a presença de
30 zoósporos somente em (L) e (LE), a exceção do (V8), no qual se obteve a mais alta
31 esporulação na ausência de luz (E). Correlacionando o pH com o crescimento e esporulação,
32 verificou-se que meios mais ácidos proporcionam um menor crescimento, mas uma maior
33 esporulação para *P. nicotianae*.

34 **Palavras chave:** oomicetos, zoosporogênese, comportamento fisiológico.

35

36 **ABSTRACT**

37 **Influence of culture media, lightness and pH on growth and sporulation of *Phytophthora*** 38 ***nicotianae***

39 The behavior of *Phytophthora nicotianae* isolates was evaluated in solid and liquid culture
40 media of carrot (c), tomato (t), eggplant (b), beans (f), soybeans (s), cassava (m) and
41 vegetable juice (V8) subjected to light (L) and constant darkness (E), and 12h photoperiod
42 (CO), at 25 ± 2 ° C. The initial pH of culture media and after adjustment to 4,8, was correlated
43 with the growth and sporulation in liquid media. The vegetative growth was evaluated in solid
44 media by daily radial growth measurement and in liquid media, by biomass production 10 and
45 15 days after incubation. Sporulation (zoospores/mL) was calculate in all media 10 and 15
46 day after incubation in a Neubauer chamber, and the data transformed to $\sqrt{x+1}$. The agar
47 media agarizados, (E) showed the largest increases, however in all light regimes means
48 differed, with the advantage of (m), (b), (t) and (V8), the first two with the largest increases
49 and the last two with the lowest. The light regimes did not significantly affect growth in liquid
50 media with 10 days of incubation. In some ways the presence of light is inversely proportional
51 to the vegetative growth, but it was an essential factor for sporulation, since it showed the

52 presence of zoospores in (L) and (LE), (V8) presented the highest sporulation in the absence
53 of light (E). The number of zoospores/mL was influenced by the type of isolates, type of
54 culture media and the presence or not of agar in the media when the pathogen was grown in (L)
55 and (LE). In the correlation of pH, with growth and sporulation, it was found that more acidic
56 media produced less growth, but more sporulation for *P. nicotianae*.

57 **Keywords:** oomycetes, zoosporogênese, physiological behavior.

58

59 INTRODUÇÃO

60

61 Dentre os fitopatógenos habitantes do solo, um grupo em especial possui merecido
62 destaque em razão do seu efeito destrutivo em plantas hospedeiras, e também devido ao seu
63 caráter polífago e cosmopolita. Espécies de *Phytophthora* podem estar associadas a diversos
64 órgãos vegetais como folhas, troncos, hastes, almofadas florais, frutos em qualquer estágio de
65 amadurecimento, e principalmente a raízes, ocasionando sintomas típicos de podridões
66 radiculares e tombamento (Luz et al., 2001).

67 No Brasil, *Phytophthora nicotianae* Breda de Hann é relatada como a espécie do
68 gênero que possui a maior gama de hospedeiros, sendo patogênica a mais de 31 espécies
69 vegetais (Luz, 2006), incluindo plantas aromáticas, ornamentais, medicinais, espécies
70 florestais, e cultivos agrícolas perenes e anuais de grande importância econômica. Apesar
71 desta espécie estar associada a inúmeras plantas incitando doenças, a dificuldade em
72 conseguir isolados esporulantes, ou mesmo padronizar condições ideais para a esporulação, é
73 um dos principais problemas para o estudo da patogênese a estes hospedeiros.

74 A esporulação é um processo de diferenciação mais específico, no qual, estão
75 envolvidas as células reprodutivas afetadas por modificações morfológicas, fisiológicas e
76 bioquímicas (Griffin, 1993). A luminosidade exerce efeito direto sobre a célula fúngica,

77 induzindo ou inibindo a formação de estruturas de reprodução, embora haja algumas espécies
78 que são indiferentes à quantidade e/ou qualidade da luz (Hawker, 1957). A maioria dos
79 fungos sensíveis à luz esporula quando expostos à luz contínua, mas alguns, chamados de
80 esporuladores diurnos, requerem a alternância de luminosidade (Dhingra & Sinclair, 1995). A
81 necessidade de luz para o crescimento e esporulação de fungos é tão variável, que pode
82 ocorrer até mesmo entre isolados da mesma espécie (Masangkay et al., 2000). Alguns
83 esporulam melhor na presença de luz contínua ou em escuro contínuo (Cooperman & Jenkins,
84 1986).

85 Assim como a qualidade e intensidade luminosa (Pulz & Massola Jr., 2008), a
86 composição do meio de cultura e a temperatura determinam a quantidade e qualidade do
87 crescimento micelial e esporulação dos fitopatógenos (Dhingra & Sinclair, 1995).

88 Esporângios e zoósporos são as principais estruturas responsáveis pela disseminação,
89 infecção e desenvolvimento das doenças causadas por *Phytophthora* (Luz & Matsuoka,
90 2001), entretanto a obtenção dessas estruturas nem sempre é alcançada nos meios de cultura
91 convencionais (Abdanur et al., 2003).

92 Os fungos e os oomicotas requerem uma variedade de elementos químicos para se
93 desenvolverem, portanto para o cultivo em laboratório, é necessário que os meios de cultura
94 simulem ou até mesmo melhorem as condições naturais (Pelczar et al., 1996). Vários meios de
95 cultura foram desenvolvidos para atender as exigências nutricionais das diferentes espécies de
96 fungos encontrados em a natureza, podendo ser sintéticos, semi-sintéticos ou naturais
97 (Menezes & Assis, 2004).

98 Estudos visando testar meios e métodos de produção de esporângios e liberação dos
99 zoósporos “in vitro”, incluindo a ação de outros fatores fisiológicos, contribuirão para facilitar
100 os testes de patogenicidade com *P. nicotianae*, tornando-os mais apropriados à realidade do
101 campo, bem como aqueles que visam o controle da doença. Com estas perspectivas, o

102 objetivo do presente estudo foi fornecer informações sobre os efeitos de diferentes meios de
103 cultura, luminosidade, e pH no crescimento micelial, e padrões de esporulação de isolados de
104 *P. nicotianae*.

105

106 MATERIAL E MÉTODOS

107

108 O trabalho foi conduzido no Laboratório de Phytophthora do Centro de Pesquisas do
109 Cacao (CEPEC), da Comissão Executiva da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), Ilhéus, Bahia,
110 Brasil.

111

112 **Obtenção dos isolados**

113 Foram utilizados dois isolados de *P. nicotianae* obtidos de material vegetal e solos
114 cultivados com hospedeiros, pertencentes a Coleção Brasileira de *Phytophthora* “Arnaldo
115 Gomes Medeiros” (CEPEC-CEPLAC). Para a obtenção de culturas novas e patogenicamente
116 viáveis, os isolados foram inoculados em frutos de berinjela (*Solanum melongena* L.) e re-
117 isolados segundo metodologia de Luz et al. (2008).

118

119 **Influência de diferentes meios de cultura**

120 Sete diferentes substratos foram escolhidos para a composição dos meios de cultura
121 com base na literatura existente e/ou suscetibilidade da espécie vegetal a *P. nicotianae*:
122 sementes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) (f), sementes de soja (*Glycine*
123 *max* L.) (s), frutos de berinjela (b) e de tomate (t), raízes de mandioca (*Manihot esculenta*
124 Crantz) (m) além de suco de vegetais - V8 (Campbell Soup Company) (V8), e raízes de
125 cenoura (*Daucus carota* L.) (c). A exceção do V8, os substratos foram submetidos à fervura
126 por 15min em microondas com água destilada, triturados em liquidificador e filtrados em

127 quatro camadas de gase, de modo a obter meios líquidos (200 g do substrato; 800 mL de água
128 destilada) e meios agarizados (200 g do substrato; 800 mL de água destilada; 14 g de ágar).
129 Após o preparo, os meios foram autoclavados a 121°C por 20 minutos e vertidos
130 assepticamente em placas de Petri. Discos de 0,9 mm de diâmetro foram retirados dos bordos
131 das colônias dos isolados, cultivados por sete dias em cenoura-ágar (CA), e transferidos para
132 o centro de placas de Petri com os meios supracitados.

133

134 **Influência de condições de luminosidade**

135 Os isolados cresceram sob três condições de luminosidade: luz constante (L),
136 fotoperíodo de 12h (LE), e ausência de luz (E). Na iluminação contínua, três lâmpadas
137 fluorescentes (General Eletric, 40 Watts, luz do dia), foram posicionadas a cerca de 50 cm
138 acima das placas (2000 lux), expondo-as aos raios luminosos. No regime de alternância
139 luminosa, as placas foram incubadas em BOD com temperaturas ajustadas para 25°C e 12h de
140 fotoperíodo. A ausência de iluminação foi obtida pelo acondicionamento das placas em caixas
141 plásticas foscas. O ensaio foi conduzido em ambiente do laboratório, com temperatura
142 mantida em 25±2°C e monitorada com aparelhos data logger HOBO®.

143

144 **Avaliação do crescimento e esporulação**

145 O crescimento radial das colônias formadas em meios agarizados foi avaliado
146 diariamente com paquímetro, em dois sentidos diametralmente opostos das colônias para a
147 obtenção da média, e cálculo da taxa de crescimento ao longo de seis dias. Em meios líquidos,
148 avaliou-se o peso seco da biomassa produzida após 10 e 15 dias de incubação, com cinco
149 repetições/tratamento. A esporulação nos diferentes meios, líquidos e agarizados, foi
150 ponderada com 10 e 15 dias de incubação, quantificando os zoósporos em câmara de
151 Neubauer em cinco repetições por tratamento. Nos meios líquidos, após o 9º e o 14º dia de

152 incubação, foi escorrido o excesso dos meios de cultura, o micélio lavado com água destilada
153 esterilizada (ADE) e incubado novamente sob as mesmas condições que se encontrava por
154 24h. A obtenção da suspensão de zoósporos, seja nos meios líquidos ou sólidos seguiu
155 metodologia proposta por Luz et al. (2008).

156

157 **Influencia de diferentes pH**

158 Após a confecção dos meios de cultura foi aferido o pH inicial, e os valores
159 correlacionados com o crescimento e esporulação. A influência do pH na esporulação também
160 foi avaliada através do número de zoósporos produzidos após submissão da massa micelial
161 formada nos diferentes meios líquidos ao 14º dia, em soluções salinas (NaCl e KH₂PO₄) com
162 pH ajustado para 4,8, por 48h. Os valores de pH foram aferidos a partir de amostras de 15 mL
163 de cada meio de cultura, com potenciômetro previamente calibrado por soluções tampão pH
164 4,0 e 7,0.

165

166 **Análises dos dados**

167 O comportamento de dois isolados de *P. nicotianae* foi avaliado após 10 e 15 dias de
168 incubação através de esquema fatorial 7x3 (meios de cultura x luminosidade), totalizando 21
169 tratamentos com 5 repetições cada. O crescimento micelial nos meios sólidos foi mensurado
170 até a maioria das colônias atingirem os bordos das placas (seis dias de cultivo). Os ensaios
171 foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. O crescimento micelial, taxas
172 de crescimento em meios agarizados, e biomassa e esporulação após transformação ($\sqrt{x+1}$)
173 foram submetidas à análise de variância pelo teste F ($p = 0,01$), e comparadas pelo teste de
174 Tukey ($p = 0,05$). A biomassa e a esporulação produzida pelos isolados ao 15º dia de
175 incubação foram correlacionadas, através do coeficiente de Pearson. As análises foram
176 realizadas através da versão 9 do software SAS[®] (Statistical Analysis System).

RESULTADOS

177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201

Os isolados 1365 e 1405 se comportaram de forma análoga, não diferindo significativamente ao apresentar crescimento vegetativo semelhante nos diferentes meios agarizados ou líquidos, permitindo que fosse usada a média de crescimento dos dois isolados para avaliação do efeito dos meios e regimes de luminosidade.

Houve efeito do regime de luminosidade no crescimento dos isolados em diferentes meios de cultura. No geral, a exceção dos meios de cenoura e mandioca, a ausência da luz (E) durante todo o tempo de cultivo e alternância luminosa de 12h (L/E) proporcionou uma rápida evolução do diâmetro médio das colônias comparado aos tratamentos com luz constante (E) (Tabela 1). Destacaram-se os grupos formados pelos meios a base de mandioca (m) e berinjela (b), e tomate (t) e suco de vegetais (V8), evidenciando sempre os maiores crescimentos nos dois primeiros e, nos dois últimos, os menores. Apesar da menor taxa de crescimento micelial entre o terceiro e o sexto dia de incubação, ter sido evidenciada em (m), este meio induziu a formação das maiores colônias em todas as condições. Os regimes de luz pouco influenciaram o crescimento dos isolados no meio (s), não havendo diferenças significativas em relação às variáveis analisadas. O efeito dos regimes de luz foi mais acentuado quando os isolados foram cultivados em (V8), manifestando-se desde os primeiros dias de avaliação do crescimento. A taxa de crescimento e o tamanho da colônia ao sexto dia de incubação demonstram a diferença na evolução das colônias nos regimes (LE), (E), (L), que proporcionaram, nestes meios, em ordem decrescente, os maiores crescimentos.

Comparando-se a biomassa seca produzida pelos isolados com 10 e 15 dias de cultivo, na maioria dos meios líquidos avaliados observa-se que não houve um aumento significativo da biomassa no intervalo de cinco dias de cultivo, sendo, portanto apresentados somente os dados referentes à 15 dias de cultivo. Assim como nos meios agarizados, os meios e regimes

202 de luz influenciaram significativamente o comportamento dos isolados. A presença de luz
203 retardou o desenvolvimento das colônias na maioria dos meios, tendo como exceções o meio
204 (m) por não haver diferença da biomassa produzida nos três regimes de luz, e (s) por
205 proporcionar o maior desenvolvimento da colônia em alternância luminosa de 12h. A maior
206 produção de biomassa ocorreu quando os isolados foram cultivados em (m), e as menores em
207 (t) e (V8).

208 Quanto à esporulação, houve diferença significativa entre o comportamento dos dois
209 isolados de *P. nicotianae* testados (ANOVA, Teste F $p \geq 0,05$), sendo, portanto apresentados
210 separadamente os dados obtidos para cada um deles. A avaliação foi realizada aos 10 e 15
211 dias de crescimento nos diferentes meios levando em consideração apenas concentrações
212 acima de 10^4 zoósporos/mL, sendo a concentração mínima de zoósporos utilizada nas
213 metodologias de inoculação de *Phytophthora* spp. (Luz et al., 2008).

214 Aos 10 dias, os dois isolados apresentaram esporulação abaixo de 10^4 zoósporos/mL,
215 na maioria dos meios líquidos avaliados, à exceção dos meios (V8) e (t), que proporcionaram
216 a esporulação máxima para o isolado 1365 de $1,4 \times 10^4$ zoósporos/mL, e para o isolado 1405
217 de 5,5 (V8) e 15,8 (t). Os regimes de luz influenciaram a esporulação apenas do isolado 1365,
218 no meio (V8). Nos meios agarizados, também foram identificadas esporulações significativas
219 somente nos meios (V8) e (t), havendo em (t), um decréscimo no número de zoósporos
220 observados em relação à ausência de luz.

221 As maiores concentrações de zoósporos dos dois isolados foram observadas em
222 culturas com 15 dias de incubação, sendo, portanto apresentados somente os dados referentes
223 à 15 dias de cultivo. Os meios (b), (c), (t), e (V8) foram os únicos meios que proporcionaram
224 esporulação nos três regimes de luminosidade para o isolado 1405 (Tabela 4). O meio (m),
225 que proporcionou o maior crescimento, induziu esporulação do isolado 1365 apenas em (L/E)
226 e do isolado 1405 em (L/E) e (L). Nos meios (f) e (s) não houve esporulação em nenhum

227 regime de luz. As maiores concentrações de zoósporos foram proporcionadas pelo meio V8
228 em (E), $1,7 \times 10^6$ (isolado 1365) e $1,1 \times 10^6$ (isolado 1405).

229 Como a maioria dos meios apresentou baixa liberação de zoósporos em 10 dias de
230 incubação, não foi possível correlacioná-las com a biomassa. As exceções foram os meios
231 (V8) e (t), que proporcionaram a esporulação dos dois isolados em todas as condições
232 avaliadas (Tabela 5). O isolado 1365 apresentou uma correlação negativa alta, quando
233 cultivado no meio (V8), e incubado na ausência de luz por 10 dias, indicando que quanto
234 menor a biomassa, maior a esporulação, no entanto, como houve um maior desenvolvimento
235 da colônia do isolado 1405 nestas condições, a correlação foi positiva e fraca. No regime de
236 luz (LE), a correlação existente entre o crescimento e a esporulação produzida pelo isolado
237 1365 foi ainda mais alta e significativa, mas esse resultado foi proporcionado pelo efeito
238 inverso ao da situação anterior, devido à uma maior produção de biomassa e menor
239 concentração de zoósporos. A correlação do isolado 1405 nestas condições também foi fraca.
240 A presença de luz durante todo o tempo de cultivo proporcionou ao isolado 1365 uma baixa
241 esporulação e crescimento, havendo assim correlação nula. O isolado 1405 esporulou mais
242 nessas condições, mas teve um crescimento equivalente ao isolado 1365, gerando uma
243 correlação negativa alta e significativa. No meio (t), mesmo sendo observada a presença de
244 quantidades significativas de zoósporos, não houve alta correlação entre as variáveis biomassa
245 e esporulação.

246 Poucas correlações altas foram identificadas aos 15 dias de incubação. Na ausência de
247 luz, a biomassa e o número de zoósporos produzidos pelo isolado 1405 evoluíram de forma
248 inversamente proporcional nos meios (b) e (t), apresentando coeficientes de correlação de -
249 0,845 e -0,936, respectivamente.

250 Os meios que induziram a formação das menores colônias possuíam pH inicial mais
251 ácidos, entretanto os maiores crescimentos foram verificados em meios mais próximos da

252 neutralidade. A concentração de H^+ nos meios testados também influenciou a esporulação,
253 sendo observado que a acidez induziu a maior produção de zoósporos. Este fator de indução
254 foi corroborado quando os isolados após cultivo nos meios anteriormente testados foram
255 imersos em soluções salinas com pH 4,8 e mantidos nestas condições por 24h, verificando-se
256 produção de zoósporos em todos os meios. A quantidade de zoósporos obtidas através da
257 imersão da massa micelial nos diferentes sais não diferiu significativamente.

258

259 **DISCUSSÃO**

260

261 O meio de (m) influenciou positivamente o crescimento dos isolados testados, ao
262 proporcionar os maiores crescimentos em todos os tratamentos, nos meios líquidos ou
263 agarizados. Dentre os meios testados, (m) é o mais rico em carbono por ser composto
264 majoritariamente de amido. Várias fontes de carbono são utilizadas na suplementação de
265 meios de cultivo para fungos, como frutose, maltose, sacarose, além da glucose ou dextrose,
266 presente na composição do meio BDA (batata-dextrose-ágar), considerado um meio de rotina
267 na maioria dos laboratórios de micologia.

268 A composição dos meios, bem como os regimes de luz, induz variações no micélio
269 aéreo e nas colônias (Luz, 2006). Neste estudo, os meios mais ricos em carbono, em ausência
270 de luz induziram a formação de um micélio aéreo denso e cotonoso.

271 Segundo Hohl (1983), as fontes de alimento têm uma profunda influencia no
272 crescimento, tanto na extensão linear ou no aumento da massa celular. Elas também
273 determinam as chances de sobrevivência nas várias condições ambientais e formam a base
274 para a reprodução e germinação dos esporos.

275 A relação entre carbono e nitrogênio é muito importante para o crescimento e
276 esporulação dos fungos; alta concentração de nitrogênio reprime a esporulação e está

277 diretamente ligada a concentração de carbono (Elliot, 1949; Griffin, 1993). Desse modo, a
278 adequação de composições de meios de cultivo é fundamental para que se obtenham
279 quantidades satisfatórias de inóculo. A glicose geralmente é estimuladora da formação de
280 esporângios nas concentrações até 0,5g/L . Acima desta concentração, a formação de
281 esporângios é normalmente inibida (Tariq, 1990)

282 A concentração mínima de nutrientes que permite o crescimento micelial é, muitas
283 vezes, insuficiente para induzir a produção de esporos, ou seja, geralmente a condição
284 nutricional ótima para o crescimento micelial não é necessariamente para a melhor produção
285 de esporos e freqüentemente inibe a reprodução (Véras, et al., 1997). Isto foi observado em
286 relação aos meios (m) e (b), e ao meio (V8) neste trabalho.

287 A interferência negativa de certos componentes, incluindo a glicose e vários
288 aminoácidos como a leucina, valina e asparagina foram relatadas por Leal et al. (1966) e Leal
289 e Gomez-Miranda (1967). A inibição do crescimento e da reprodução sexual foram atribuídas
290 a acumulação de ácidos orgânicos no meio e a produção de níveis tóxicos de amônia.

291 Segundo Nozaki et al. (2004), nem sempre as condições que favorecem o crescimento
292 do fungo são as mesmas para esporulação. Sabe-se ainda que, alguns meios de cultura são
293 mais favoráveis para a esporulação de fungos que outros. Os meios a base de tomate (V8 e
294 suco de tomate) proporcionaram o menor desenvolvimento das colônias, entretanto induziram
295 a formação de esporângios, obtendo conseqüentemente as maiores concentrações de
296 zoósporos dos isolados testados quando cultivados nestes substratos. Os vegetais que
297 compõem tais meios possuem alto valor nutricional, por isso são citados por diversos autores
298 como capazes de induzir a reprodução de muitos fungos “mitospóricos” (Miller, 1955;
299 Queiroz et al., 2004; Brunelli, et al., 2006; Dias Neto, et al., 2010) e oomicetos (Guo & Ko,
300 1993; Luz et al., 2008). Existem variações na composição de meios formados a partir do (V8),

301 com diferentes porcentagens destes componentes, bem como adição de CaCO₃, esteróis e
302 vitaminas (Menezes & Assis, 2004).

303 Para Ribeiro (1983), a esporulação é um processo complexo que envolve o potencial
304 hídrico; nutrientes; esteróis; aeração; luz; temperatura; cátions como Ca²⁺, Fe³⁺, Mg²⁺ e K⁺; a
305 idade da cultura; exudatos radiculares; e extratos de solo, com importância destes fatores
306 variando entre espécies e isolados da mesma espécie.

307 Segundo Caldwell (1998), algumas moléculas biológicas essenciais podem ser
308 degradadas por radiações, que são fortemente absorvidas pelas células e ocasionam uma
309 variedade de fotoprodutos incompatíveis com a função celular. Na maioria dos meios
310 avaliados, a presença de luz foi inversamente proporcional ao crescimento vegetativo, sendo,
311 no entanto, fator importante para a esporulação em meios a base de cenoura e mandioca. A
312 exceção foi o meio (V8), que mesmo tendo o crescimento inibido pela presença de luz,
313 proporcionou as maiores concentrações de zoósporos quando cultivados em (E).

314 A literatura tem revelado que existe uma grande variação em relação ao efeito da luz
315 sobre o crescimento e esporulação de *Phytophthora* spp., bem como entre isolados da mesma
316 espécie. Alguns autores utilizam metodologias para esporulação de *P. nicotianae*, onde os
317 isolados são cultivados na ausência de luz (Santos et al., 2004; Taylor & Pasche, 2008),
318 outros sob luz constante (Widmer et al., 1998; Lamour et al., 2003). A ausência de luz para
319 indução da esporulação já foi relatada para diversos fungos fitopatogênicos como *Alternaria*
320 *brassicae* (Rotem et al., 1989), *Alternaria solani* (Lukens, 1963) e *Mycosphaerella*
321 *fijensis* (Hanada et al., 2002).

322 Algumas espécies de *Phytophthora* possuem uma boa esporulação em meios sólidos
323 quando submetidas a estímulos, já outras apresentam baixa produção de esporângios quando
324 cultivadas nestes meios, demonstrando a influência de líquidos na produção de esporângios de
325 várias espécies (Zentmyer & Erwin, 1970; Ribeiro, 1983). As maiores esporulações foram

326 identificadas quando os isolados foram cultivados em meios líquidos, apesar de haver
327 concentrações acima de 10^4 zoósporos/mL do isolado 1405 nos meios sólidos de (c), (b), (t) e
328 (V8).

329 As baixas concentrações de zoósporos obtidas através do cultivo em meios sólidos são
330 decorrentes da aeração, um fator que influencia significativamente a formação de esporângios.
331 A espécie *P. nicotianae* raramente produz esporângios em micélio submerso, provavelmente
332 devida a falta de oxigênio. Mesmo quando há a produção de esporângios nestas condições, a
333 liberação e obtenção de suspensões de zoósporos também são dificultadas pela caducidade
334 dos esporângios (Ribeiro, 1983).

335 Outro fator que influenciou a esporulação foi a idade da cultura. Em todos os meios
336 analisados, as maiores concentrações de zoósporos foram obtidas após 15 dias de incubação.
337 O micélio jovem quando consome todos os nutrientes, produz mais esporângios que culturas
338 mais velhas (Ribeiro, 1983). A formação de esporângios decresce com o tempo de cultivo em
339 condições axênicas (Ayers & Zentmyer, 1971), entretanto há variações nos tempos de cultivo
340 ideais para a esporulação até mesmo dentre isolados da mesma espécie. *P. nicotianae*
341 possuem esporulação tardia em comparação com espécie como *P. palmivora* que produz
342 esporângios em abundância ao 5º dia de incubação.

343 O pH dos meios de cultivo testados correlacionou-se de forma positiva em relação a
344 esporulação e negativamente em relação ao crescimento, corroborando a necessidade de
345 fatores injuriantes ou estimulantes para a esporulação em grande parte dos fungos
346 fitopatogênicos (Pulz & Massola Jr., 2008). Assim como a luz, o pH ótimo para a formação
347 de esporângios é muito variável até mesmo entre isolados da mesma espécie (Ribeiro, 1983).

348 Devido o requerimento nutricional de *Phytophthora* spp., alguns trabalhos aliam a
349 adição de sais como KNO_3 (Santos, et al., 2004), com a ajuste do pH dos meios. Os meios (f)
350 e (s), que possuem pH inicial de 6,10 e 6,27 respectivamente, apesar de induzirem os maiores

351 crescimentos, não proporcionaram a formação de esporângios. Entretanto quando a massa
352 micelial formada nestes meios foram transferidas para soluções com pH ácido, a presença
353 nestas condições por 24h foi suficiente para produzir as maiores concentrações de zoósporos.
354 Estes resultados indicam que dentre os fatores que induzem a alta esporulação de *P.*
355 *nicotianae*, o pH pode ter grande influencia.

356 Os resultados deste estudo permitem corroborar a influência estimuladora de líquidos,
357 dos requerimentos nutricionais, da luminosidade, do pH e idade da cultura na produção de
358 esporângios, e conseqüentemente na obtenção de altas concentrações de suspensões de
359 zoósporos de *P. nicotianae*. A combinação do meio líquido a base do suco de vegetais (V8), o
360 qual possui pH ácido em torno de 4,7; ausência de luz e culturas com idade a partir de 15 dias,
361 apesar de não induzirem os maiores crescimentos, induzem a esporulação em isolados desta
362 espécie. Apesar de proporcionarem uma menor produção de zoósporos em relação ao (V8), os
363 meios obtidos de berinjela e tomate aparecem como alternativa, podendo futuramente ser
364 testadas formulações através da união dos mesmos.

365 A deficiência de métodos padrões eficazes para a esporulação desta espécie, induz a
366 utilização de metodologias de inoculação que não permitem a quantificação e qualificação dos
367 propágulos infectivos, reunindo em discos de meio de cultura vários propágulos infectivos
368 como o micélio (conjunto de hifas), clamidósporos (estrutura vegetativa de sobrevivência),
369 esporângios (estruturas reprodutivas assexuais) e zoósporos (esporos assexuais móveis
370 formados no interior dos esporângios). A partir destes resultados, novos estudos poderão ser
371 norteados, na tentativa de se obter as concentrações de zoósporos de várias espécies de
372 *Phytophthora* necessárias para testes de patogenicidade com *P. nicotianae*, tornando-os mais
373 apropriados à realidade cultivo no campo de, bem como aqueles que visam o controle da
374 doença.

375

AGRADECIMENTOS

376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão de bolsa de estudo. À Dra Edna Dora M. Newman Luz, pela estima, apoio, orientação e ensinamentos passados. À Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira – CEPLAC, pela estrutura e recurso concedido. Ao CNPq, pela concessão de recursos para a execução deste trabalho. À Lindolfo Pereira dos Santos Filho, pela colaboração nas análises estatísticas. Aos amigos do Laboratório de *Phytophthora* do CEPEC/CEPLAC, pelo convívio e ajuda nos experimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS

Abdanur A, Santos AF, Tratch R (2003) Crescimento micelial e esporulação de isolados de *Phytophthora* sp. patogênicos a Acácia-negra. Boletim de Pesquisa Fl. 47:33-42.

Ayers WA, Zentmyer GA (1971) Effect of soil solution and two soil on sporangium production by *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology 61:1188-1193.

Brunelli KR, Fazza AC, Athayde Sobrinho C, Camargo LEA (2006) Effect of culture media and light exposure on the sporulation of *Cercospora zae-maydis*. Summa Phytopathologica. 32: 92-94.

Caldwell MM, Björn LO, Bornman JF, Flint SD, Kulandaivelu G, Teramura AH, Tevini ME (1998) Effects of increased solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. Journal of Photochemistry and Photobiology 46:40-52.

- 401
- 402 Cooperman CJ, Jenkins SF (1986). Conditions influencing growth sporulation of *Cercospora*
- 403 *asparagi* and *Cercospora* blight development in Asparagus. *Phytopathology* 76:617-622.
- 404
- 405 Dhingra OD, Sinclair JB (1995) *Basic Plant Pathology Methods*. Lewis Publishers. Boca
- 406 Raton. Florida.
- 407
- 408 Dias Neto JJ, Santos GR, Anjos LM, Rangel, PHN (2010) Hot spots for diversity of
- 409 *Magnaporthe oryzae* physiological races in irrigated rice fields in Brazil. *Pesquisa*
- 410 *Agropecuária Brasileira* 45:252-260.
- 411
- 412 Elliott ES (1949) The effect of the sugar concentration on conidial size of some species
- 413 de *Helminthosporium*. *Phytopathology* 39:953-958.
- 414
- 415 Griffin DH (1993) *Fungal Physiology*. 2nd Ed . New York. Wiley-Liss.
- 416
- 417 Guo LY, Ko WH (1993) Two Widely Accessible Media for Growth and Reproduction of
- 418 *Phytophthora* and *Pythium* Species. *Applied and Environmental Microbiology* 59:2323-2325.
- 419
- 420 Hanada RE, Gasparotto L, Pereira JCR (2002) Esporulação de *Mycosphaerella fijiensis* em
- 421 diferentes meios de cultura. *Fitopatologia Brasileira* 27:170-173.
- 422
- 423 Hawker LE (1957) *The physiology of reproduction in fungi* 6th Ed. Cambridge: Cambridge
- 424 University Press.
- 425

426 Hohl HR (1983) Nutrition of Phytophthora. In: Erwin DC, Bartnicki-Garcia S, Tsao PH
427 (Eds.) *Phytophthora: its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*, APS, Minnesota, pp.
428 41-54.

429

430 Lamour KH, Daughtrey ML, Benson DM, Hwang J, Hausbeck MK (2003) Etiology of
431 *Phytophthora drechsleri* and *P. nicotianae* (= *P. parasitica*) diseases affecting floriculture
432 crops. *Plant Disease* 87:854-858.

433

434 Leal JA, Gomez-Miranda B (1967) Effect of amino acids and organic acids on the sexual
435 reproduction of species of *Phytophthora* and *Pythium*. *Transactions of the British*
436 *Mycological Society* 50:77-84.

437

438 Leal JA, Gomez-Miranda B, Nicolas G (1966) Formation of toxic substances by fungi in the
439 degradation of some amino acids. *Canadian Journal of Microbiology* 12:1073-1076.

440

441 Lukens RJ (1963) Photo-inhibition of sporulation in *Alternaria solani*. *American Journal of*
442 *Botany* 50:721-724.

443

444 Luz EDMN (2006) O gênero *Phytophthora* no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 31:80-81.

445

446 Luz EDMN, Matsuoka K (2001) *Phytophthora*: fungo, protista ou chromista? In: Luz EDMN,
447 Santos AF dos, Matsuoka K, Bezerra JL (Eds). *Doenças causadas por Phytophthora no Brasil*.
448 *Campinas: Livraria e Editora Rural*. pp. 1-14.

449

450 Luz EDMN, Silva SDVM, Bezerra JL, Souza JT, Santos AF (2008) Glossário ilustrado de
451 *Phytophthora*: técnicas especiais para o estudo de Oomicetos. Itabuna BA FAPESB/CEPLAC
452 204 p.

453

454 Masangkay RF, Paulitz TC, Hallet SG, Watson AK (2000) Characterization of sporulation of
455 *Alternaria alternata* f.sp. *sphenocleae* Biocontrol Science and Technology 10:385-397.

456

457 Menezes M, Assis SMP (2004) Guia prático para fungos fitopatogênicos. 2^a. Ed. Recife PE.
458 Imprensa Universitária UFRPE. 106 p.

459

460 Nozaki MH, Camargo M, Barreto M (2004) Caracterização de *Diaporthe citri* em diferentes
461 meios de cultura, condições de temperatura e luminosidade. Fitopatologia Brasileira 29:429-
462 432.

463

464 Pelczar MJ, Chang ECS, Krieg NR (1996) Microbiologia: conceitos e aplicações. Vol. 2. 2^a.
465 Ed. São Paulo SP. Makron Books.

466

467 Pulz P, Massola Júnior NS (2009) Efeito de meios de cultura e fatores físicos no crescimento
468 e esporulação de *Alternaria dauci* e *A. solani*. Summa Phytopathologica 35:119-124.

469

470 Queiroz FM, Batista UG, Brommschenkel SH (2004) Avaliação de meios de cultura no
471 crescimento micelial e esporulação de *Alternaria brasiliensis*. Fitopatologia Brasileira
472 29:541-543.

473

474 Ribeiro OK (1983) Physiology of asexual sporulation and spore germination in *Phytophthora*.
475 In: Erwin DC, Bartnicki-Garcia S, Tsao PH (Eds). *Phytophthora: its biology, taxonomy,*
476 *ecology and pathology*. Saint Paul MN. American Phytopathological Society. pp. 139-147.

477

478 Rotem J, Bickle W, Kranz J (1989) Effect on environment and host on sporulation
479 of *Alternaria macrospora* in cotton. *Phytopathology* 79:263-266.

480

481 Santos AF, Luz EDMN, Souza JT (2004) *Phytophthora boehmeriae* causando a gomose da
482 acácia-negra no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 29:144.

483

484 Tariq VN (1990) Factors influencing zoosporangia formation by *Phytophthora fragariae in*
485 *vitro*. *Mycological Research* 94: 205-210.

486

487 Taylor RJ, Pasche JS (2008) A Foliar Blight and Tuber Rot of Potato Caused by
488 *Phytophthora nicotianae*: New Occurrences and Characterization of Isolates. *Plant Disease*
489 92:492-503.

490

491 Vérias SM, Gasparoto L, Menezes M (1997) Variabilidade fisio-morfológica
492 de *Colletotrichum guaranicola* em diferentes substratos. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*
493 40:297-305.

494

495 Widmer TL, Graham JH, Mitchell DJ (1998) Histological comparasion of fibrous root
496 infection of disease- tolerant and susceptible citrus hosts by *Phytophthora nicotianae* and *P.*
497 *palmivora*. *Phytopathology* 88:389-395.

498

499 Zentmyer GA (1970) Tactic responses of zoospores of *Phytophthora*. Toussoun TA, Bega
500 RB, Nelson PE. (eds.) Root Diseases and Soil Borne Pathogens. University of Calif. Press,
501 Berkeley. pp. 109-11.

502

503

504

505

506

507

508

509

510

511

512

513

514

515

516

517

518

519

520

521

522

523

524

525

526 **Tabela 1** - Crescimento micelial em meios agarizados (cm) e líquidos (g) produzida por dois isolados (1365 e
 1405) de *Phytophthora nicotianae* em diferentes meios de cultura e regimes de luz, à 25±2°C

MEIOS ¹	DIÂMETRO MÉDIO DA COLÔNIA						BIOMASSA ⁴ (g)		
	TCM ² (cm.dia ⁻¹)			CM6 ³ (cm)			E	LE	L
	E ⁵	LE ⁶	L ⁷	E	LE	L			
B	1,42 aA	1,32 aA	1,14 bB	9,49 aA	9,50 aA	9,07 aB	0,076 cdA	0,041 dB	0,022 eC
C	1,15 cB	1,31 aA	1,34 aA	9,39 aA	9,47 aA	8,87 aB	0,134 cA	0,100 cdB	0,104 cB
F	1,26 bA	1,24 aA	1,15 bB	9,00 bA	8,41 bB	8,52 bB	0,161 bA	0,155 cbAB	0,096 cdB
M	0,87 dC	1,29 aA	1,16 bB	9,50 aA	9,48 aA	9,18 aA	0,397 aA	0,386 aA	0,362 aA
S	1,09 cA	1,13 bA	1,03 bcA	7,95 cA	8,00 cA	8,15 cA	0,173 bB	0,210 bA	0,165 bB
T	1,27 bA	1,30 aA	1,14 bB	7,84 cA	7,58 dA	6,71 dB	0,090 dA	0,074 daB	0,042 deB
V8	1,11 cB	1,29 aA	0,96 cC	7,20 dB	8,05 cA	6,00 eC	0,091 cA	0,055 dB	0,047 deB
CV (%)	7,44			6,02			7,16		

527 Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si de acordo
 528 com o teste Tukey (P=0,05)

529 ¹Meios - **B.** berinjela; **C.** cenoura; **F.** feijão caupi; **M.** mandioca; **S.** soja; **T.** tomate; **V8.** suco de vegetais;

530 ²TCM. taxa de crescimento micelial entre o terceiro e sexto dia de incubação; ³CM6. crescimento micelial ao
 531 sexto dia de cultivo; ⁴BIOMASSA. Biomassa seca com 15 dias de cultivo; ⁵E. ausência de luz; ⁶LE.
 532 fotoperíodo de 12h; ⁷L. luz constante.

533

534

535

536

537

538

539

540

541

542

543

544

545

546 **Tabela 2** - Produção média de zoósporos ($\times 10^4$) dos isolados 1365 e 1405 de *Phytophthora*
 547 *nicotianae* cultivados por 15 dias em diferentes meios de cultura líquidos, e três regimes de
 luz, à 25±2°C

Meios ¹	Isolado/Fotoperíodo							549
	1365				1405			550
	E ²	LE ³	L ⁴	CV(%)	E	LE	L	CV(%)
		2,0						551
B	0,4 bA	bcA	3,0 bA	17,36	20,8 bA	22,6 aA	10,6 bA	32,23
C	0,0 bC	2,4 bB	4,4 abA	9,59	1,0 cB	2,0 bAB	3,6 bcA	25,11
F	0,0 bA	0,0 cA	0,0 cA	-	0,0 cA	0,0 bA	0,0 cA	-
M	0,0 bB	1,6 bcA	0,0 cA	17,05	0,0 cB	4,2 bA	3,8 bcA	24,53
S	0,0 bA	0,0 cA	0,0 cA	-	0,0 cA	0,0 bA	0,0 cA	-
T	5,2 bA	2,3 bA	4,0 abA	34,32	18,2 bA	12,4 bA	24,6 aA	33,30
V8	172,6 aA	10,6 aB	5,8 aB	18,78	114,2 aA	19,2 aB	7,6 bB	14,40
CV (%)	28,87	21,17	11,41		32,62	26,08	25,62	555

556 Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem
 557 entre si de acordo com o teste Tukey (P=0,05)

558 ¹Meios - **B.** berinjela; **C.** cenoura; **F.** feijão; **M.** mandioca; **S.** soja; **T.** tomate; **V8.** suco de
 559 vegetais; ²E. ausência de luz; ³LE. fotoperíodo de 12h; ⁴L. luz constante.

560

561

562

563

564

565

566

567

568

569

570

571

572

573

574 **Tabela 3** - Coeficientes de correlação linear de Pearson (r_{xy}) e p -valor entre as variáveis esporulação e
 575 biomassa produzida por dois isolados de *Phytophthora nicotianae* (1365 e 1405) em diferentes meios de
 576 cultura e fotoperíodo (E - ausência de luz; LE - fotoperíodo de 12h; L - luz contínua), avaliados aos 10 e 15
 dias, à 25±2°C

Meios ¹	Fotoperíodo/dias de incubação ²												
	E ₁₀		LE ₁₀		L ₁₀		E ₁₅		LE ₁₅		L ₁₅		
	1365	1405	1365	1405	1365	1405	1365	1405	1365	1405	1365	1405	
B	r_{xy}	-	-	-	-	0,250	-0,08	-0,408	-0,655	0,953	-0,757	0,745	0,463
	p-valor	-	-	-	-	0,685	0,898	0,495	0,229	0,012	0,138	0,148	0,431
C	r_{xy}	-	-	-	-	0,562	0,377	-	-0,845	0,612	-0,102	0,230	-0,007
	p-valor	-	-	-	-	0,323	0,530	-	0,071	0,272	0,869	0,708	0,906
F	r_{xy}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	p-valor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M	r_{xy}	-	-	-0,098	-	-0,379	-0,893	-	-	0,268	0,597	-	0,121
	p-valor	-	-	0,874	-	0,528	0,04	-	-	0,662	0,287	-	0,845
S	r_{xy}	-	-	-	-	-0,698	-0,678	-	-	-	-	-	-
	p-valor	-	-	-	-	0,189	0,208	-	-	-	-	-	-
T	r_{xy}	0,408	0,395	0,166	-0,534	0,060	-0,575	0,021	-0,936	-0,133	0,562	-0,243	-0,055
	p-valor	0,495	0,510	0,788	0,353	0,923	0,310	0,973	0,019	0,830	0,323	0,692	-0,929
V8	r_{xy}	-0,838	0,272	-0,971	0,021	0,00	-0,932	-0,310	0,406	0,266	-0,215	-0,343	0,404
	p-valor	0,076	0,657	0,005	0,973	1,00	0,021	-0,610	0,497	0,664	0,727	0,572	0,499

577 **p-valor** - Prob > |r| under H0: Rho=0

578 ¹**Meios** - **B.** berinjela; **C.** cenoura; **F.** feijão; **M.** mandioca; **S.** soja; **T.** tomate; **V8.** suco de vegetais

579 ²**Fotoperíodo/dias de incubação** - **E₁₀**. ausência de luz em 10 dias de incubação; **LE₁₀**. alternância luminosa de
 580 12h em 10 dias de incubação; **L₁₀**. luz constante; **E₁₅**. ausência de luz em 15 dias de incubação; **LE₁₅**.
 581 alternância luminosa de 12h em 15 dias de incubação; **L₁₅**. luz constante em 15 dias de incubação.

582

583

584

585

586

587

588

589

CAPÍTULO III

EFEITO DE ÓLEOS E EXTRATOS VEGETAIS NO CONTROLE DE DOENÇAS
CAUSADAS POR *Phyophthora nicotianae* em tomateiro e berinjela

1 **Efeito de óleos e extratos vegetais no controle de doenças causadas**
2 **por *Phytophthora nicotianae* em tomateiro e berinjela**

3

4 **Antônio A. Pimenta Neto^{1,2}; Edna D. M. N. Luz²; Gláucio D. Gonçalves²; Carolina S.**
5 **Benjamin², Tacila R. Santos & Sônia M. A. Oliveira¹**

6

7 ¹UFRPE - Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n,
8 Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brasil; ²CEPLAC/CEPEC - Sessão de Fitopatologia,
9 Laboratório de Phytophthora, Rodovia Ilhéus-Itabuna, s/n, 45650-000, Ilhéus, BA, Brasil

10

11 Autor para correspondência: Edna D. M. N. Luz, email: ednadora@yahoo.com.br

12

13

14 **RESUMO**

15 Objetivou-se com este trabalho, avaliar o efeito de óleos essenciais (OE) e extratos
16 bruto aquoso (EBA) obtidos de *Syzygium aromaticum* e *Cymbopogon nardus* no controle de
17 doenças causadas por *Phytophthora nicotianae* à tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.),
18 e berinjela (*Solanum melongena* L.). O experimento foi conduzido em duas etapas. Na
19 primeira, foram realizados bioensaios “in vitro” através do método de diluição em ágar de
20 diferentes concentrações dos óleos essenciais (OE’s) (0,1; 0,5; 1,0 µL/mL) e extratos bruto
21 aquoso (EBA’s) (1,0; 10,0; 20,0%), a fim de avaliar o potencial inibitório no crescimento
22 micelial e germinação de zoósporos. A partir das inibições “in vitro”, foram realizados testes
23 em frutos e plântulas sob ambiente controlado de laboratório e casa-de-vegetação
24 respectivamente. As variáveis dependentes avaliadas foram o diâmetro médio das lesões
25 formadas na superfície dos frutos ao longo de seis dias; e a incidência e morte ao longo de 15

26 dias de avaliação. Constatou-se que os produtos que mais inibiram o crescimento micelial e a
27 germinação dos zoósporos, foram obtidos de *S. aromaticum*, a partir das concentrações de 0,5
28 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e 10% do OE e EBA, respectivamente. Enquanto que o tratamento que mais retardou
29 a evolução da doença em frutos e plântulas quando comparado com a testemunha inoculada,
30 foi o OE e EBA de *C. nardus* nas concentrações de 1,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e 20%, respectivamente. Com
31 isso podemos inferir que os produtos obtidos de *S. aromaticum* e *C. nardus*, têm potencial
32 para reduzir o ataque deste patógeno em plantas de tomate e berinjela.

33 **Palavras chave:** controle alternativo de doenças de plantas, pós-colheita, *Phytophthora*
34 *nicotianae*, *Syzygium aromaticum*, *Cymbopogon nardus*.

35

36 **ABSTRACT**

37 **Effect of oils and plant extracts in controlling diseases caused by *Phytophthora*** 38 ***nicotianae* Breda Hann of tomato and eggplant**

39 The objective of this study was to evaluate the effect of essential oils (EO) and crude aqueous
40 extracts (EBA) obtained from *Syzygium aromaticum* and *Cymbopogon nardus* in controlling
41 diseases caused by *Phytophthora nicotianae* on tomato (*Lycopersicon esculentum*) and
42 eggplant (*Solanum melongena*). The experiment was conducted in two stages. In the first,
43 experiments were conducted "in vitro" using the agar dilution method with different
44 concentrations of essential oils (EO's) (0,1; 0,5; 1,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$) and aqueous crude extracts
45 (ACE's) (1,0; 10,0; 20,0%) to evaluate the inhibitory potency mycelial growth of germination
46 of zoospores. From the percentages of inhibition and minimum inhibitory concentrations
47 found, tests were performed on fruits and seedlings under controlled laboratory environment
48 and greenhouse respectively. The dependent variables evaluated were the mean diameter of
49 lesions formed on the surface of the fruit over six days, and the incidence and death over 15
50 days of evaluation. It was found that the products that inhibit the germination of the mycelial

51 growth and zoospores were obtained from *S. aromaticum*, concentrations from 0,5 µL/mL and
52 10% ACE and EO, respectively. While the treatment more delay progression of disease in
53 fruit and seedlings compared to inoculated control was OE and ACE of *C. nardus* at 1,0
54 µL/mL and 20% respectively. We can infer that the products obtained from *S. aromaticum*
55 and *C. nardus*, have the potential to reduce the attack of this pathogen on tomato and
56 eggplant.

57 **Keywords:** alternative control of plant diseases, post-harvest, *Phytophthora nicotinae*,
58 *Syzygium aromaticum*, *Cymbopogon nardus*.

59

60

INTRODUÇÃO

61

62 Existem três espécies de *Phytophthora* que se destacam como patógenos de hortaliças,
63 *P. infestans* (Mont.) de Bary, *P. capsici* Leonian e *P. nicotianae* Breda de Hann, ocasionando
64 murcha, requeima e podridões em frutos (Laureano & Reis, 2006). No Brasil, *Phytophthora*
65 *nicotianae* é relatada como a espécie que possui a maior gama de hospedeiros, sendo
66 patogênica a mais de 31 espécies vegetais (Luz 2006), desde cultivos agrícolas perenes e
67 anuais de grande importância econômica, à plantas aromáticas, ornamentais, medicinais e
68 espécies florestais.

69 Dentre as olerícolas, Solanaceae é a família botânica mais afetada por problemas
70 fitossanitários (Filgueira, 2000), e devido à alta vulnerabilidade destas culturas a doenças, é
71 grande a quantidade de agrotóxicos empregada para o controle delas (Lopes & Santos, 1994;
72 Kurozawa & Pavan, 1997).

73 O controle de doenças de plantas ainda é largamente realizado por meio de
74 agroquímicos, os quais através do uso racional poderão apresentar em curto prazo, um efeito
75 positivo para o produtor. Entretanto, além do surgimento de isolados dos fitopatógenos

76 resistentes às substâncias químicas utilizadas, a exemplo de isolados de *Guignardia citricarpa*
77 Kiely resistentes a carbendazim (Rodrigues et al., 2007) e isolados de *Phytophthora*
78 *nicotianae* Breda de Hann resistentes à metalaxyl (Timmer et al., 1998), os resultados para a
79 sociedade como um todo e para o meio ambiente podem se tornar negativos devido à poluição
80 causada pelos resíduos. Nesse contexto, termos como agricultura alternativa ou sustentável
81 estimulam a busca de novas medidas de proteção das plantas contra as doenças (Zadocks,
82 1992), Um dos enfoques deste tipo de agricultura é o controle alternativo de doenças de
83 plantas através o uso de óleos e extratos vegetais ou de metabólitos secundários (Schwan-
84 Estrada et al., 2000; Bosenbecker et al., 2006; Bernardo & Bettiol, 2010).

85 À medida que o consumidor se conscientiza sobre o efeito dos alimentos que consome,
86 na manutenção da saúde, tornam-se mais exigentes por produtos de qualidade, especialmente
87 para o consumo *in natura*, em que a relação produto/consumidor é bastante estreita (Fortes &
88 Osório, 2003). Em razão de vários fatores, vem se verificando uma crescente procura por
89 defensivos alternativos para o efetivo controle de doenças e pragas, oferecendo maior
90 segurança, seletividade, biodegradabilidade, viabilidade econômica, aplicabilidade em
91 programas de manejo integrado de pragas e baixo impacto ambiental.

92 Várias plantas por possuírem substâncias comprovadamente antimicrobianas, vêm
93 sendo bastante utilizadas no controle alternativo de doenças de plantas, tanto isoladamente
94 quanto em conjunto com outras espécies vegetais. Tais compostos podem ser aplicados
95 através da atomização na parte aérea, ou incorporados ao solo, a fim de controlar a densidade
96 populacional principalmente de patógenos habitantes do solo como *Phytophthora* spp.
97 (Bowers & Locke, 2004).

98 Wang e colaboradores (2001) avaliaram a eficiência de extratos de 88 espécies de
99 plantas e 19 deles inibiram a formação de zoósporos e o crescimento *in vitro* de *P. infestans*.
100 Óleos essenciais de *Piper aduncun* L., *Piper callosum* Ruiz & Pav, e *Cymbopogon nardus* L.

101 inibiram o crescimento micelial e germinação de zoósporos de oito espécies de *Phytophthora*,
102 *P. heveae* Thomps, *P. idaei* Kenn, *P. boehmeriae* Sawada, *P. palmivora* Butler, *P. capsici*, *P.*
103 *nicotiana*, *P. drechsleri* *P. citrophthora* R.E. Sm. & E.H.Sm. (Lima, 2008; Valiense, 2009).
104 O extrato de alho (*Allium sativum* L.) inibiu completamente a formação de zoósporos (Ke-
105 Qiang & Van Bruggen, 2001; Wang et al., 2001) e a formação de colônias de *P. infestans*
106 (Ke-Qiang & Van Bruggen, 2001). O extrato de pimenta longa (*Piper longum* L.) reduziu em
107 60% a mortalidade de tomateiros inoculados com *P. infestans* (Lee et al., 2001), Em outro
108 experimento semelhante, todos os tomateiros tratados com curcumina, produto derivado do
109 rizoma de açafrão-da-índia (*Curcuma longa* L.), sobreviveram depois de inoculados com *P.*
110 *infestans*, apresentando resultado similar ao obtido com o fungicida clorotalonil (Kim et al.,
111 2003), O óleo de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr & L.M. Perry) foi capaz de
112 inibir o crescimento micelial e a germinação dos zoósporos de *P. palmivora* e *P. citrophthora*
113 (Silva, 2010).

114 A adoção de técnicas alternativas de manejo tem sido mais acentuada em pequenas
115 propriedades destinadas a agricultura familiar e em áreas de assentamentos rurais que estão
116 em expansão em função dos programas governamentais. Estes agricultores muitas vezes não
117 têm acesso ao diagnóstico de doenças e necessitam também de métodos de controle das
118 mesmas, que sejam acessíveis ao tipo de agricultura a que se dedicam, não podendo usar
119 produtos químicos em função do custo e também para não inviabilizar a produção orgânica
120 que normalmente praticam.

121 Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de óleos e extratos
122 vegetais de *S. aromaticum* e *C. nardus* no controle das doenças causadas por *P. nicotianae* em
123 tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) e berinjela (*Solanum melongena* L.).

124

125

MATERIAL E MÉTODOS

126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de *Phytophthora* e de Heveicultura da Seção de Fitopatologia do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), situada na Superintendência Estadual da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) e no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), em Ilhéus, Bahia, Brasil.

Seleção dos isolados

Dezesseis isolados de *P. nicotianae* obtidos de material vegetal e solos cultivados com hospedeiros, pertencentes a Coleção Brasileira de *Phytophthora* “Arnaldo Gomes Medeiros”, foram revitalizados e diferenciados quanto à patogenicidade e agressividade a frutos de berinjela (*Solanum melongena* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) e pimentão (*Capsicum annum* L.), através da inoculação com discos de meio de cultura contendo estruturas fúngicas na superfície intacta. Foram realizadas avaliações aos três, cinco e seis dias após a inoculação (DAI) através da mensuração longitudinal e transversal das lesões para cálculo do diâmetro médio da lesão (DML). O crescimento micelial foi avaliado para a diferenciação dos isolados de acordo com as médias obtidas a partir de medidas diametralmente opostas das colônias aos 3, 5, e 6 (DAI).

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em dois ensaios, com cinco repetições/isolado. No 1º ensaio foram testados 16 isolados em frutos de berinjela e tomate, e no segundo, oito, os que mais se destacaram no primeiro, foram inoculados em frutos de berinjela, tomate e pimentão, e feita aferição das lesões apenas aos 6 DAI.

151 **Obtenção de óleos e extratos vegetais**

152 Para a avaliação da atividade antimicrobiana e/ou potencial de inibição sobre o
153 desenvolvimento de *P. nicotianae* em tomate e berinjela foram obtidos o extrato bruto aquoso
154 (EBA) e óleo essencial (OE) a partir de folhas de *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle (citronela)
155 e capítulos florais de *Syzigium aromaticum* (L.) Merr & L.M. Perry (cravo-da-índia).

156 A coleta das folhas de *C. nardus* foi feita no Horto Medicinal da Universidade
157 Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus-BA, no período da manhã, cortando-as a uma altura
158 de 20 a 30 cm a partir do solo (Costa et al., 2005). Os capítulos florais de *S. aromaticum*
159 foram obtidos em casas comerciais do Centro de Abastecimento do município de Itabuna-BA.

160 Os EBA's foram obtidos através da trituração de folhas frescas e de capítulos florais
161 com ADE em liquidificador, na proporção de 100:200, 24h antes da sua utilização. As folhas
162 foram sanitizadas antes do preparo do extrato, sendo imersas em hipoclorito de sódio a 2%
163 por 30s e lavadas em ADE e os capítulos florais foram previamente fragmentados em frações
164 menores com mixer. Posteriormente, os EBA's foram filtrados em camada dupla de gaze,
165 acondicionados em frascos de vidro âmbar e mantidos à temperatura de aproximadamente 25
166 °C, A solução estoque do extrato de *S. aromaticum* foi posteriormente autoclavada (Venturoso
167 et al., 2010), enquanto que a de *C. nardus* por possuir compostos antimicrobianos
168 termolábeis, foi suplementada pela adição dos componentes utilizados no meio seletivo
169 PARPH (Kanwischer; Mitchel, 1979).

170 O processo de obtenção do OE foi realizado no Centro de Microscopia Eletrônica –
171 UESC, entre os dias 12 e 18 de maio de 2011, seguindo o método direto por hidrodestilação
172 com arraste de vapor em sistema tipo Clevenger (Rozwalka et al., 2008). Para a extração do
173 OE de *S. aromaticum* foram utilizadas 100g dos capítulos florais para 1500 ml de água
174 destilada, em duas baterias com quatro balões de 3,000 mL por 36h, Enquanto que para *C.*
175 *nardus*, um total de 7,5Kg de folhas frescas e picadas, foram distribuídos em baterias com

176 quatro balões contendo 200g de folhas para 1500 mL de água, e submetidas ao processo de
177 extração por 1h. O óleo foi separado dos hidrolatos por partição gravimétrica utilizando funil
178 de separação, transferido para frascos de vidro âmbar e acondicionados em geladeira (5°C). O
179 rendimento dos OE's foi calculado dividindo a massa obtida após a extração pela massa
180 inicial dos órgãos vegetais e multiplicando por 100.

181

182 **Efeito dos óleos e extratos vegetais no crescimento micelial e germinação de zoósporos**

183 **“in vitro”**

184 O método utilizado foi o bioanalítico “in vitro” observando o desenvolvimento ou
185 inibição dos isolados em diferentes concentrações de OE's e EBA's (Pereira et al., 2006). Em
186 câmara de fluxo laminar, foram obtidas as concentrações 0,1; 0,5; 1,0 µL/mL, e 1; 10 e 20%
187 através da incorporação das soluções estoque dos OE's, e EBA's em meio CA fundente (45-
188 50 °C), previamente esterilizados usando método de diluição em ágar, sendo posteriormente
189 vertido em placas de Petri. Além dos OE's e EBA's, metalaxyl+mancozeb foi adicionado
190 como tratamento nas mesmas concentrações dos OE's. A cada concentração dos OE's foi
191 adicionado surfactante Tween 80 em igual proporção. Discos de colônias dos dois isolados
192 testados com sete dias de incubação foram invertidos e depositados no centro das placas com
193 os tratamentos, e somente com o meio CA e o surfactante. As placas foram criteriosamente
194 lacradas, identificadas e incubadas a 25-27°C por sete dias na ausência de luz. O experimento
195 foi conduzido em DIC com arranjo fatorial 5x5+1, representados por produtos e
196 concentrações, totalizando 26 tratamentos, incluindo a testemunha, com cinco repetições por
197 tratamento.

198 A avaliação do experimento teve início 24h após sua instalação, realizando-se
199 medições ortogonais do diâmetro das colônias diariamente, sendo que cada medição
200 corresponderá à média de duas medidas diametralmente opostas da colônia fúngica, tendo

201 como referência as placas das testemunhas, visto que cada isolado apresenta diferenças quanto
202 à velocidade de crescimento. A partir das médias dos diâmetros das colônias dos isolados,
203 foram calculadas as porcentagens de inibição do crescimento micelial.

204 A inibição do crescimento micelial foi avaliada através da porcentagem de inibição do
205 crescimento (PIC) dos isolados para cada tratamento em relação a testemunha, através da
206 fórmula: $PIC = [(diâmetro da testemunha - diâmetro do tratamento) / diâmetro da$
207 $testemunha] \times 100$. Nos tratamentos que houve 100% de inibição, o disco das colônias foram
208 transferidos para placas contendo meio CA e incubados sob luz constante, à 25-27°C, por
209 cinco dias, para avaliar o seu potencial fungistático e/ou fungicida.

210 Para avaliar o efeito dos produtos alternativos sobre a germinação dos zoósporos de
211 *P. nicotianae*, utilizou-se as soluções estoque dos óleos e extratos vegetais, para obter as
212 mesmas concentrações testadas para inibição do crescimento micelial, incorporando-as em
213 meio ágar-água (AA) fundente, e vertendo em placas de Petri de 5 cm de diâmetro. As
214 testemunhas consistiram em placas contendo apenas AA com surfactante. Logo em seguida,
215 foi adicionado às placas contendo meios + tratamentos, 300 µL da suspensão de esporos na
216 concentração de 3×10^5 zoósporos/mL, e incubadas a 25-27°C na ausência de luz, por 4, 8, e
217 12h. As suspensões foram obtidas através do cultivo dos isolados testados em meio V8
218 líquido por 15 dias. Após o 14º dia de incubação, foi retirado o excesso do meio de cultura, o
219 micélio lavado com ADE e incubado novamente sob as mesmas condições que se encontrava.
220 A suspensão de zoósporos foi obtida segundo Luz e colaboradores (2008), induzindo a
221 liberação através de choque térmico.

222 O experimento foi montado em DIC, com fatorial 4x3, correspondendo a quatro
223 produtos e três concentrações, além da testemunha. Duas placas foram divididas em
224 quadrantes e, cada quadrante constituiu uma repetição, totalizando oito repetições/tratamento,
225 A avaliação do ensaio foi realizada 12 h após o início da incubação, através da contagem do

226 número de esporos totais e germinados, no campo de visão da objetiva de 40X do
227 microscópio óptico, em três pontos distintos de cada quadrante. Avaliou-se o número de
228 esporos em cada repetição que apresentavam tubo germinativo independente do tamanho dos
229 mesmos, e calculado a porcentagem de inibição.

230

231 **Efeito de óleo e extratos vegetais no controle da podridão algodão em frutos de tomate e** 232 **berinjela**

233 Frutos verdoengos de tomate, berinjela e pimentão obtidos em casas comerciais do
234 Centro de Abastecimento de Itabuna-BA, foram lavados, desinfestados com hipoclorito de
235 sódio (NaClO) 2%, secos à temperatura do ambiente laboratorial (25-27°C) e submetidos à
236 imersão em solução dos OE's de *S. aromaticum* e *C. nardus*, nas concentrações de 0,5 e 1,0
237 µL/mL, e EBA's de 10 e 20% respectivamente, além do oxiclureto de cobre (fungicida
238 protetor) na concentração de 100 µL/mL por um período de três minutos. Foi adicionado aos
239 tratamentos o espalhante adesivo Wil fix 2%. Testemunhas inoculadas e absolutas foram
240 avaliadas.

241 Os frutos foram acondicionados em caixas plásticas, contendo espuma umedecida para
242 simular um ambiente de câmara úmida, e sobre placas de Petri, para não haver o contato com
243 a espuma. Após 24 horas foram realizadas inoculações na superfície intacta, na região
244 equatorial, com a deposição de discos de meio de cultura com estruturas do isolado 1405 de
245 *P. nicotianae*, e montadas câmaras úmidas localizadas sobrepondo-os com chumaços de
246 algodão umedecidos. Após a inoculação, os frutos foram mantidos a 25-27°C em câmara
247 úmida até o último dia de avaliação. As testemunhas consistiram de frutas imersas em ADE
248 com surfactante. O desenho experimental foi em 4 blocos casualizados, com cinco repetições
249 cada. As avaliações foram realizadas do 3º ao 6º DAI, pela análise da severidade da doença

250 em cada ponto inoculado, determinando-se a área lesionada externa pela mensuração do
251 comprimento da lesão em dois sentidos diametralmente opostos.

252 Curvas de progresso da doença foram plotadas, utilizando-se os valores de severidade
253 da doença (tamanho de lesão) no tempo. Os dados de severidade em proporção (y),
254 linearizados pela transformação logística [$y = \ln[y/(1-y)]$] (Campbell & Madden, 1990), foram
255 ajustados a modelo de regressão linear simples, tendo tempo dias após a inoculação (DAI)
256 como variável independente. A transformação logística foi executada porque propiciou o
257 melhor ajuste dos dados de progresso na maioria das situações. A taxa de progresso da doença
258 (TPD) foi estimada pelo parâmetro b da equação de regressão. Adicionalmente, com os dados
259 de tamanho de lesão foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença padronizada
260 (AACPD) (Campbell & Madden, 1990). Considerando as curvas de progresso, as epidemias
261 foram comparadas em relação à severidade máxima da doença (y_{\max}), taxa estimada de
262 progresso da doença (TPD) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Os
263 dados obtidos foram submetidos à análise de variância, sendo a separação de médias efetuada
264 pelo teste de Tukey, ao nível de probabilidade de 5%.

265

266 Experimentos utilizando plântulas

267 Para estes ensaios, plântulas de tomateiro e berinjela foram obtidas a partir da
268 semeadura em sacos para mudas (1º experimento), e copos plásticos de polietileno (2º
269 experimento) contendo a mistura de 50 % substrato comercial (Plantimax) + 50 % solo
270 esterilizado. Foram plantadas três sementes/saco e copo a aproximadamente 1 cm de
271 profundidade, realizando o desbaste após a germinação. As plântulas foram mantidas em
272 casa-de-vegetação sob sistema de irrigação por aspersão, com turno de rega de 6h na primeira
273 semana e 12h a partir da segunda semana após a semeadura.

274 Transcorrido quatorze dias após a semeadura, as plântulas apresentando 2 a 3 folhas
275 definitivas, foram transportadas para câmaras de inoculação e mantidas sob condições
276 controladas de umidade relativa, temperatura e alternância luminosa de 12h. Os dados de
277 variações climáticas foram monitorados com aparelhos data logger HOBO[®]. Momentos antes
278 da inoculação, o substrato em que as plântulas se desenvolviam foi saturado com água, de
279 modo a proporcionar as condições ótimas para a infecção através dos zoósporos.

280

281 **1º experimento - Seleção da melhor concentração de inóculo para infecção em plântulas** 282 **de tomateiro e berinjela em casa-de-vegetação**

283 Visando selecionar a melhor concentração de zoósporos de *P. nicotianae* para a
284 expressão dos sintomas em plântulas de tomateiro e berinjela, estas foram inoculadas através
285 da deposição de 1 mL de uma das seguintes concentrações: C1 – 1×10^4 ; C2 – 5×10^4 ; C3 –
286 1×10^5 , ao redor do coleto de plântulas aos 15 dias após a semeadura. A suspensão de
287 zoósporos foi obtida através da metodologia proposta por Luz e colaboradores (2008), a partir
288 de colônias do isolado de *P. nicotianae* com 15 dias, cultivadas em meio V8 líquido na
289 ausência de luz. O desenho experimental foi delineado através da casualização de cinco
290 blocos com 10 plântulas por repetição.

291

292 **2º experimento - Efeito de óleo e extratos vegetais no controle de “damping off” em** 293 **plântulas de tomateiro e berinjela em casa-de-vegetação**

294 Para este experimento as plântulas foram cultivadas em copos plásticos, sob as
295 mesmas condições do 1º experimento. Os OE's e EBA's de *S. aromaticum* e *C. nardus*, nas
296 concentrações de 0,5 e 1,0 $\mu\text{L/mL}$, e EBA's de 10 e 20% respectivamente, foram pulverizadas
297 no limbo foliar até o ponto de escorrimento, e aplicados ao redor do coleto 48h antes da
298 inoculação. Além dos OE's e EBA's foi adicionado como tratamento o fungicida metalaxyl +

299 mancozeb, conforme recomendação do fabricante (3g/L) para as culturas testadas, uma
300 testemunha inoculada e um controle absoluto. As plântulas de tomateiro e berinjela foram
301 inoculadas com a melhor concentração e metodologia utilizada no experimento 1.

302 Os experimentos 1 e 2 foram conduzidos em blocos casualizados, sendo o primeiro
303 com quatro, e o segundo com sete tratamentos, ambos com cinco repetições e 10 plântulas
304 incluindo as testemunhas.

305 Avaliações diárias foram realizadas através da análise dos componentes
306 epidemiológicos, identificando o período de incubação (P_i) em plantas tratadas e não tratadas,
307 determinado pelo número de dias entre a inoculação e o surgimento dos sintomas da doença; e
308 a incidência (INC) número de plantas doentes e mortas em relação ao total de plantas
309 inoculadas.

310 Assim como no experimento em frutos, curvas de progresso da doença foram plotadas,
311 no entanto foram utilizando os valores de incidência (aparecimento de sintomas) e morte no
312 tempo. Os dados de incidência e morte em proporção (y), linearizados pela transformação
313 logística [$y = \ln[y/(1-y)]$] (Campbell & Madden, 1990), foram ajustados a modelo de
314 regressão linear simples, tendo tempo dias após a inoculação (DAI) como variável
315 independente. Os dados de progresso também foram transformados para o modelo logístico
316 por proporcionar o melhor ajuste dos na maioria das situações. A taxa de progresso da doença
317 (TPD) foi estimada pelo parâmetro b da equação de regressão, e a área abaixo da curva de
318 progresso da doença padronizada (AACPD) (Campbell & Madden, 1990) calculada a partir
319 dos dados de incidência e morte. Considerando as curvas de progresso, as epidemias foram
320 comparadas em relação à incidência final, número de plantas mortas, taxa estimada de
321 progresso da doença (TPD) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD).

322

323

324 **Análises dos dados**

325 Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade e submetidos à análise de
326 variância pelo teste F a 1% de probabilidade, sendo a separação de médias efetuada pelo teste
327 de Tukey, ao nível de probabilidade de 5%. Todas as análises estatísticas foram realizadas
328 utilizando-se a versão 9 do software SAS[®] (Statistical Analysis System).

329

330

RESULTADOS

331

332 **Seleção dos isolados**

333 Os isolados testados no ensaio 1 promoveram lesões no terceiro DAI apenas nos frutos
334 de berinjela, com destaque para o 1405 e 1177 por apresentarem 100% de infecção. A partir
335 do quinto DAI formaram-se lesões nos frutos de tomate, e todos os 16 isolados infectaram os
336 frutos de berinjela (Tabela 1).

337 As lesões nos frutos de berinjela variaram de 9,10 (isolado 1375) a 15,48 cm (1399) e
338 a porcentagem de infecção de 60 (1187, 1359) a 100% (maioria dos isolados). Todos os
339 isolados foram patogênicos aos frutos de tomate com seis DAI, provocando lesões que
340 variaram de 2,15 (1360) a 7,97 cm (1406), com 20 (1360 e 1176) a 100% (1399) de infecção.
341 A partir destes resultados, foram selecionados 50% dos isolados inicialmente testados (1178,
342 1358, 1365, 1405, 1406, 1399, 1381, 1177), pela agressividade aos dois hospedeiros.

343 O diâmetro médio das lesões (DML) provocadas pelos oito isolados testados no ensaio
344 2 em frutos de berinjela variou de 6,75 (1177) a 16,81 cm (1405) com 20 (1177) a 100%
345 (1381) de infecção; em frutos de tomate de 6,40 (1358) a 8,49 cm (1406) com apenas os
346 isolados 1178 (60%) e 1177 (90%) não apresentando 100% de infecção(Tabela 2). Somente o
347 isolado 1365 causou lesão nos frutos de pimentão com seis DAI. Neste segundo ensaio, foram

348 selecionados os isolados 1365 e 1405 para os experimentos seguintes, com base na
349 patogenicidade e agressividade à frutos de berinjela, tomate e pimentão.

350

351 **Obtenção de óleos e extratos vegetais**

352 Após a extração de 800g de capítulos florais de *S. aromaticum* por 36h, foram obtidos
353 99,27g de óleo, apresentando rendimento de 12,41% (m/m). Enquanto que para *C. nardus*, foi
354 obtido um rendimento de 0,56% (m/m). O óleo de *S. aromaticum* apresentou coloração
355 levemente amarelada, e densidade maior do que o hidrolato, já o de *C. nardus* foi menos
356 denso e translúcido.

357

358 **Efeito dos óleos e extratos vegetais no crescimento micelial e germinação de zoósporos**

359 **“in vitro”**

360 Os resultados referentes à inibição do crescimento micelial e germinação dos
361 zoósporos pouco diferiram para os dois isolados de *P. nicotianae* analisados.

362 Os produtos que mais inibiram o crescimento micelial foram obtidos de capítulos
363 florais de *S. aromaticum*. O EBA e OE deste material vegetal, a partir da concentração de 10
364 % e 0,5 µL/mL respectivamente, inibiram 100% o crescimento micelial dos dois isolados de
365 *P. nicotianae* (Tabela 3), não havendo crescimento dos dois isolados quando os discos das
366 colônias colocados nas placas de CA contendo os tratamentos por sete dias foram removidos e
367 transferidos para meio CA. A menor concentração do EBA de *S. aromaticum* testada (10%)
368 inibiu 100% o crescimento do isolado 1365 durante os três primeiros dias de incubação, mas
369 as colônias começaram a desenvolver a partir do quarto dia.

370 A maior concentração do OE obtido de folhas frescas de *C. nardus*, apesar de impedir
371 o crescimento do isolado 1405 até 3 dias de incubação, não apresentou potencial fungicida,
372 porém inibiu acima de 90% o crescimento dos dois isolados. Ao contrário do EBA obtido de

373 *S. aromaticum*, o de *C. nardus* apresentou menor efeito do que o OE, com a sua maior
374 concentração inibindo cerca de 65% do crescimento micelial dos dois isolados.

375 O percentual máximo de inibição proporcionado pela maior concentração (1,0 µL/mL)
376 do fungicida (metalaxyl+mancozeb) foi de 48,1 para o isolado 1405, e 40,2% para o 1365,
377 havendo um decréscimo da inibição na medida em que decresciam as concentrações.

378 Com relação a inibição da germinação dos zoósporos de *P. nicotianae*, os produtos
379 obtidos de *S. aromaticum* também se mostraram mais efetivos que os de *C. nardus* (Tabela 4),
380 O EBA e OE de *S. aromaticum* tiveram efeito semelhante, causando inibição total da
381 germinação a partir de 10% e 0,5 µL/mL para os dois isolados. A concentração de 1% e 0,1
382 µL/mL destes produtos, mesmo não impedindo a germinação de todos os zoósporos
383 visualizados, apresentaram um percentual de inibição médio superior a 90%. O OE de *C.*
384 *nardus* inibiu 100% a germinação dos zoósporos dos isolados apenas na maior concentração,
385 enquanto que o EBA na sua maior concentração inibiu apenas em torno de 55% a germinação.

386 Apesar de todas as concentrações dos OE's e EBA's das espécies vegetais analisadas
387 exercerem diferentes percentuais de inibição do crescimento micelial e germinação dos
388 isolados de *P. nicotianae* em relação às testemunhas, foram selecionadas as concentrações de
389 0,5 µL/mL do OE e 10% do EBA de *S. aromaticum*; e de 1,0 µL/mL do OE e 20% do EBA
390 de *C. nardus*, para os testes "in vivo" por serem as concentrações mínimas que apresentaram
391 o maior potencial inibitório de cada produto.

392

393 **Efeito de óleo e extratos vegetais no controle da podridão algodão em frutos de berinjela** 394 **e tomateiro**

395 Nenhum dos frutos de berinjela e tomate da testemunha absoluta apresentou lesão até
396 o sétimo dia de avaliação, enquanto que para todos os demais tratamentos ocorreram lesões
397 nos frutos a partir do terceiro dia.

398 Não foram observadas diferenças estatísticas entre os seis tratamentos até o quinto
399 DAI, embora as lesões do tratamento com fungicida, visualmente, parecessem menores tanto
400 em tomate quanto em berinjela. Seis DAI, embora o efeito dos tratamentos em frutos de
401 tomate continuasse igual estatisticamente, para a berinjela, as menores lesões foram
402 observadas no EBA de *S. aromaticum*, seguido do fungicida (Tabela 4). Os DML's em frutos
403 de berinjela com seis DAI variaram de 14,66 (EBA de *S. aromaticum*) a 22,0 (testemunha
404 inoculada). As TPD's não diferiram quanto aos tratamentos nos dois hospedeiros, assim como
405 a AACPD para os frutos de tomateiro. Mesmo havendo diferença entre a AACPD do controle
406 e dos tratamentos nos frutos de berinjela, as lesões evoluíram progressivamente com o tempo,
407 não havendo controle efetivo.

408 O fungicida (oxicloreto de cobre) na dosagem de 100 µg/mL, não diferenciou dos
409 demais tratamentos aplicados em frutos de tomate, mostrando-se ineficiente no controle desta
410 enfermidade quando utilizado nestas concentrações; em frutos de berinjela, apenas no 6º DAI,
411 este tratamento teve efeito similar ao EBA de *S. aromaticum*, sendo estes os tratamentos que
412 reduziram as lesões em relação à testemunha.

413

414 **Efeito de óleo e extratos vegetais no controle de “damping off” em plântulas de** 415 **tomateiro e berinjela em casa-de-vegetação**

416 Foi realizado um total de 13 avaliações diárias, devido a estabilização do aparecimento
417 de plântulas de tomateiro e berinjela com sintomas ou morte nos dois experimentos. Nenhuma
418 plântula das testemunhas de tomateiro ou berinjela, que receberam 1 mL de água em vez do
419 inóculo de *P. nicotianae* apresentou sintomas.

420 Não houve diferença estatística entre as porcentagens de plantas mortas e com
421 sintomas, inoculadas com as três concentrações de zoósporos testadas, no entanto, houve
422 maior porcentagem de plântulas de berinjela mortas para a concentração de 5×10^4

423 zoósporos/mL; enquanto que as de tomate foram mais sensíveis à concentração de 1×10^5 ,
424 Estas concentrações foram responsáveis pela morte de 98 e 84% das plântulas de berinjela e
425 tomateiro, respectivamente, no último dia de avaliação (15 DAI).

426 As plântulas de berinjela permaneceram sem apresentarem sintomas de podridão do
427 coleto e tombamento (“damping off”) somente até o 3-4º dia de avaliação, o que corresponde
428 à 6-7 DAI com as concentrações de 1×10^4 e 1×10^5 . A concentração de 5×10^4 zoósporos/mL
429 proporcionou um aparecimento dos sintomas nas plântulas de berinjela mais precoce, sendo
430 identificados entre quatro e cinco DAI (Figura 1-A), correspondendo de um a dois dias de
431 avaliação sem sintomas. A evolução do quadro sintomatológico, levando a maioria das
432 plântulas sintomáticas à óbito, ocorreu de 1-2 dias para todas as concentrações testadas,
433 porém em relação à morte houve variação de uma concentração para outra. As plântulas
434 inoculadas com a concentração de 1×10^4 zoósporos/mL morreram em média entre o 5º e o 6º
435 de avaliação, ou seja, entre o oito e nove DAI, com 1×10^5 zoósporos/mL entre de sete e oito
436 DAI; e com a suspensão de 5×10^4 zoósporos/mL, a partir do quinto DAI (Figura 1-B).

437 O número de plântulas de tomateiro com sintomas e mortas, cresceu com o aumento
438 da concentração de zoósporos utilizada na inoculação. A maior concentração utilizada (5×10^5)
439 ocasionou a morte das plântulas de tomateiro entre 5º e o 6º dia de avaliação,
440 aproximadamente (Figura 1-D).

441 Como nenhuma das concentrações dos produtos alternativos utilizados, provocou
442 100% de plântulas com sintomas durante o período avaliado (15 dias), possivelmente uma
443 concentração mais elevada fosse necessária para causar 100% de infecção.

444 A eficiência de produtos alternativos no controle do tombamento de plântulas de
445 berinjela e tomate foi avaliada no segundo ensaio usando para a inoculação a concentração de
446 5×10^4 zoósporos/mL, por não haver diferenças estatísticas entre os tratamentos do ensaio 1.

447 O fungicida impediu o aparecimento dos sintomas nos dois hospedeiros, observando
448 cerca 100% de plântulas assintomáticas durante 15 DAI (Tabela 5). O EBA de *S. aromaticum*
449 mostrou-se como o mais efetivo dentre os tratamentos alternativos testados em plântulas de
450 tomateiro, por proporcionar a menor AACPD, e não haver diferença entre o PI, IF e NPM das
451 plântulas tratadas com este produto e com o fungicida. Os efeitos dos tratamentos com
452 produtos obtidos de *S. aromaticum* e o OE de *C. nardus* em plântulas de berinjela, não
453 diferiram em relação à testemunha inoculada, estando a maioria das plântulas, mortas a partir
454 de 9 DAI. O EBA de *C. nardus* foi o único tratamento entre os produtos alternativos testados,
455 que apresentou potencial controlador, apresentando após o fungicida, a menor AACPD,
456 permitindo que 64 % das plântulas de berinjelas inoculadas permanecessem assintomáticas.

457

458

DISCUSSÃO

459

460 A suscetibilidade dos frutos de pimentão à apenas um isolado de *P. nicotianae* após
461 sete dias de incubação, indica que possivelmente os frutos foram tratados com dosagens
462 excessivas de fungicidas, tendo em vista que estes não foram cultivados organicamente e
463 apresentavam quantidade significativa de pó esbranquiçado na superfície.

464 A necessidade de promoção do aumento do consumo de hortaliças, frutas e verduras,
465 gera um preocupante quadro de contaminação de hortaliças no Brasil (Almeida et al., 2009).
466 O pimentão encontra-se no topo das culturas que mais absorvem e utilizam agrotóxicos,
467 conforme apresenta o relatório de atividades de 2010 do Programa de Avaliação de Resíduos
468 de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), da Agencia Nacional de Vigilância Sanitária –
469 ANVISA (ANVISA, 2011).

470 Como na utilização de qualquer medida de controle é importante considerar a
471 variabilidade do patógeno e a estabilidade da medida em função da variabilidade existente

472 (Brown, 1998), apesar da seleção de dois isolados quanto à agressividade e patogenicidade a
473 três hospedeiros, os baixos níveis de variação apresentados pelos OE's e EBA's em relação
474 aos diferentes isolados de *P. nicotianae* são relevantes, pois indicam um maior potencial de
475 estabilidade do controle sob diferentes populações do patógeno.

476 O potencial fungitóxico de óleo e extratos obtidos de *S. aromaticum* corroboraram
477 com os vários relatos da literatura atual. Rozwalka e colaboradores (2008) obtiveram
478 resultados semelhantes aos apresentados neste trabalho, onde extrato aquoso na concentração
479 de 10% apresentou efeito fungitóxico inibindo 100% do crescimento micelial de *Glomerella*
480 *cingulata* (Stonemam) Spauld & Schrenk e *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig)
481 Saccardo. A capacidade do OE de *S. aromaticum* em inibir o crescimento “in vitro” de
482 *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium corylophilum*, *Eurotium amstelodami*
483 (Guynot et al., 2003), como de *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* (Santos et al., 2007)
484 “in vitro” também foi observada. Apesar dos produtos a base de folhas de *C. nardus*
485 apresentarem inibição total do crescimento somente para um dos isolados e na maior
486 concentração testada (1,0 µL/mL), vários trabalhos tem revelado que tais produtos têm
487 potencial para utilização no controle de doenças de plantas. A utilização deste óleo em testes
488 *in vitro* proporcionou 100% de inibição da germinação de urediniósporos de *Phakopsora*
489 *pachyrhizi* Sidow isolado da soja, na concentração de 0,5 mL (Medice et al., 2007), como
490 também provocou 100% de inibição no crescimento micelial de *M. pernicioso* na
491 concentração de 100 ppm, e na concentração de 500 ppm, 100% da germinação dos
492 basidiósporos deste patógeno (Bastos, 2007).

493 Os resultados podem ter sido influenciados pela presença de vários compostos com
494 ação antimicrobiana. O componente majoritário do óleo essencial de *S. aromaticum* é o
495 eugenol (Brown & Morra, 1995; Raina et al., 2001), que provavelmente, é o responsável por
496 sua ação fungitóxica. Outros pesquisadores comprovaram que o eugenol apresenta uma ação

497 tóxica sobre *Saccharomyces cerevisiae* Gasperini, indicando por meio de microscopia que o
498 eugenol causou alterações na membrana e na parede celular do fungo determinando liberação
499 do conteúdo celular (Bennis et al., 2004). O *Cymbopogon nardus* possui uma composição de
500 óleo essencial com alto teor de geraniol e citronelal (Castro et al., 2007). O citronelal é
501 utilizado como material básico para a síntese de importantes compostos químicos
502 denominados iononas e para a síntese de vitamina A. O geraniol possui atividade anti-séptica,
503 inibindo o crescimento de fungos e bactérias (Pereira, 2009).

504 Os produtos obtidos de *S. aromaticum* apesar de proporcionarem a inibição total do
505 crescimento micelial e germinação de zoósporos “in vitro”, apresentaram variações em
506 relação á sua aplicação em frutos e plântulas. Quando testados no controle da podridão em
507 frutos de berinjela e tomate, não apresentaram efeito controlador satisfatório, sendo observado
508 apenas uma pequena redução no tamanho das lesões em frutos de berinjela através da
509 aplicação do EBA. Assim como o OE e EBA de *S. aromaticum*, apesar do baixo potencial
510 inibitório demonstrado pelos produtos obtidos de *C. nardus* na inibição do crescimento
511 micelial e germinação de zoósporos de *P. nicotianae* “in vitro”, quando testados em frutos e
512 plântulas, atuaram de forma diferente. Moura (2007), quando estudou a utilização de produtos
513 biológicos e alternativos no controle de doenças pós- colheita em melão Cantaloupe, concluiu
514 que a utilização de 2 mL/L de OE de *C. nardus* não se mostrou efetivo no controle de doenças
515 pós- colheita. Já Medici e colaboradores (2007), relataram que o OE de *C. nardus* teve efeito
516 direto na germinação de urediniósporos de *P. pachyrhizi*, e foram capazes de reduzir a
517 severidade da ferrugem da soja em plantas em casa-de-vegetação.

518 Vários testes têm sido realizados para determinar o efeito de produtos alternativos “in
519 vitro”, porém, ensaios “in vivo” precisam ser feitos para validar tais resultados, que nem
520 sempre são análogos. A redução do potencial de inibição pode ser atribuída à volatilização

521 dos constituintes dos óleos e/ou à instabilidade na presença de ar, luz, calor, umidade e metais
522 (Simões & Spitzer, 2000).

523 No presente estudo foi avaliado o efeito do OE's e EBA's em bioensaios "in vitro" e
524 "in vivo", no entanto, os metabólitos responsáveis por esta supressão não foram ainda
525 investigados. A utilização de compostos bioativos no controle de pestes e doenças apresenta
526 inegáveis vantagens em relação aos pesticidas sintéticos, já que são facilmente decompostos,
527 não poluem o meio ambiente e não possuem propriedades residuais ou fitotóxicas. É
528 importante ressaltar, contudo, que os OE's e EBA's apresentam algumas limitações, como a
529 baixa estabilidade dos compostos orgânicos presentes nas soluções e o não monitoramento de
530 possíveis substâncias tóxicas presentes nas plantas ou resultantes da decomposição dos
531 produtos durante sua manipulação (Silva et al., 2005). Limitações como essas fazem com que
532 seja necessária a investigação mais aprofundada dos óleos de plantas, bem como o
533 desenvolvimento de produtos com maior nível tecnológico, para que tanto produtores quanto
534 consumidores possam ter segurança na utilização de óleos brutos.

535 A determinação da época de colheita de plantas medicinais e aromáticas é essencial
536 para obter maior teor de óleo essencial e melhor qualidade (Carvalho Filho et al., 2006), A
537 colheita de plantas medicinais e aromáticas tem certas particularidades que a torna diferente
538 das outras culturas, uma vez que objetiva conciliar a máxima produção de biomassa com
539 maior (es) teor (es) de princípio(s) ativo(s) (Bezerra et al., 2008).

540 A composição quantitativa e qualitativa dos metabólitos secundários das plantas é
541 alterada acentuadamente durante as fases de crescimento. Sua produção varia de acordo com a
542 idade das plantas, o estado reprodutivo, as opções metabólicas determinadas pelo efeito de
543 hormônios com ciclos de síntese de substâncias influenciada pelas estações ou horas do dia e
544 com as condições de cultivo (Brown Júnior, 1988; Leal et al., 2001; Castro et al., 2004),
545 sendo fundamental a observação de fatores como procedência, identificação botânica, colheita

546 (estágio de desenvolvimento da planta, época e horário de coleta), tratamentos fitossanitários
547 e qualidade (Ming, 1994). Assim, além dos fatores acima citados, a forma de aproveitamento
548 do material vegetal (seco ou fresco), os métodos de extração, bem como as concentrações
549 utilizadas, resultarão em maior eficiência e credibilidade dos resultados.

550 Os OE's e EBA's de cada um dos vegetais utilizados (*C. nardus* e *S. aromaticum*)
551 apresentaram variações na inibição do crescimento micelial e germinação de zoósporos “in
552 vitro” e no controle de doenças causadas por *P. nicotianae* a frutos e plântulas de tomateiro e
553 berinjela, assim como os resultados encontrados por Wilson et al. (1997), que ao utilizarem o
554 extrato bruto de *C. nardus*, não obtiveram efeito antimicrobiano sobre *Botrytis cinerea* Pers.,
555 no entanto, em concentração de 6,25% do óleo essencial, observaram o efeito fungitóxico
556 sobre a germinação de esporos de *B. cinerea*, demonstrando que os compostos antifúngicos
557 sintetizados por *C. nardus* podem concentrar-se no óleo essencial e estar presentes em
558 concentrações muito baixas no hidrolato.

559 Apesar do fungicida (oxicloreto de cobre) ter retardado o desenvolvimento das lesões
560 em frutos de tomate e berinjela, não houve diferença significativa entre os tratamentos com os
561 produtos alternativos. O fungicida deveria apresentar melhor desempenho, já que é
562 recomendado para o controle de *Phytophthora* spp. Porém, pode ter sido utilizado em
563 subdosagem, já que foi assim como os tratamentos alternativos, foi usada a dose inibitória
564 com base em experimento “in vitro”, para inibição de *P. capsici* (dados não apresentados). A
565 aplicação de fungicida nos frutos deveria ser baseada nas doses de recomendação para frutos
566 no campo.

567 Houve variações em relação aos tratamentos mais eficazes para o controle de doenças
568 causadas por *P. nicotianae* em tomateiro e berinjela, entretanto estes poderão ser testados
569 posteriormente em outro experimento em plantas no campo, para que possam ser
570 incorporados no manejo integrado de doenças causadas por este patógeno, através da

571 combinação de vários compostos e microorganismos com diversos modos de ação, como
572 organismos endofíticos consorciadas com a indução de resistência mediadas por
573 rizobactérias promotoras de crescimento, a fim de aumentar as chances de sucesso do
574 controle.

575

576

AGRADECIMENTOS

577

578 À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela
579 concessão de bolsa de estudo. À Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira -
580 CEPLAC, pela estrutura e recurso concedido. Ao CNPq, pela concessão de recursos para a
581 execução deste trabalho. À Dra Edna Dora M, Newman Luz, pela estima, apoio, orientação e
582 ensinamentos passados. À professora Dra, Larissa Corrêa do Bonfim Costa e ao Dr, Givaldo
583 Niella, pelo incentivo e colaboração. À Lindolfo Pereira dos Santos Filho, pelo auxílio nas
584 análises estatísticas. Aos amigos do Laboratório de *Phytophthora* do CEPEC/CEPLAC, pelo
585 convívio e ajuda nos experimentos.

586

587

REFERÊNCIAS

588

589 Almeida VES, Carneiro FF, Vilela NJ (2009) Agrotóxicos em hortaliças: segurança alimentar,
590 riscos socioambientais e políticas públicas para promoção da saúde, Tempus, Actas em Saúde
591 Coletiva 4:84-99.

592

593 ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análise de Resíduos de
594 Agrotóxicos em Alimentos (PARA): Relatório de Atividades de 2010, Gerência Geral de
595 Toxicologia, 2011.

596 [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/55b8fb80495486cdaecbff4ed75891ae/Relat%C3%](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/55b8fb80495486cdaecbff4ed75891ae/Relat%C3%92rio+PARA+2010+-+Vers%C3%A3o+Final.pdf?MOD=AJPERES)
597 [%B3rio+PARA+2010+-+Vers%C3%A3o+Final.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/55b8fb80495486cdaecbff4ed75891ae/Relat%C3%92rio+PARA+2010+-+Vers%C3%A3o+Final.pdf?MOD=AJPERES)

598

599 Bernardo ERA, Bettiol W (2010) Controle da pinta preta dos frutos cítricos em cultivo
600 orgânico com agentes de biocontrole e produtos alternativos. *Tropical Plant Pathology* 35:
601 037-042.

602

603 Bennis S, Chami F, Chami N, Bouchikhi T, Remmal A (2004) Surface alteration of
604 *Saccaromyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. *Letters in Applied Microbiology*
605 38:454-458.

606

607 Bezerra AME, Filho Medeiros S, Oliveira de LDM, Silveira ER (2008) Produção e
608 composição química da macela em função da época de colheita. *Horticultura Brasileira* 26:
609 26-29.

610

611 Bosenbecker VK (2006) Efeitos de óleos essenciais de plantas bioativas no controle de
612 *Phytophthora infestans* e *Meloidogyne javanica* em batata (*Solanum tuberosum* L.). (Tese de
613 Doutorado) Universidade Federal de Pelotas – RS, 65p.

614

615 Bowers JH, Locke JC (2004) Effect of formulated plant extracts and oils on population
616 density of *Phytophthora nicotianae* in soil and control of *Phytophthora* blight in the
617 greenhouse. *Plant Disease* 88: 11-16.

618

619 Brown JKM (1998) Surveys of variation in pathogen populations and their application to
620 disease control. In: Jonews DG, Dordrecht D (Eds.) *The Epidemiology of Plant Diseases*,
621 Kluwer Academic Publishers, pp. 73-102.

622
623 Brown PD, Morra MJ (1995) Glucosinolate-containing plant tissues as bioherbicides. Journal
624 of Agricultural and Food Chemistry 43:3070-3074.

625
626 Brown Junior KS (1988) Engenharia ecológica: novas perspectivas de seleção e manejo de
627 plantas medicinais. Acta Amazônica 18: 291-303.

628
629 Campbell CL, Madden LV (1990) Introduction to plant disease epidemiology. New York:
630 John Wiley. 532p.

631
632 Carvalho Filho JLS, Blank AF, Alves PB, Ehlert PAD, Melo AS, Cavalcanti SCH, Arrigoni-
633 Blank MF, Silva-Mann R (2006) Influence of the harvesting time, temperature and drying
634 period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. Revista Brasileira de Farmacognosia 16:
635 24-30.

636
637 Castro de HG, Casali VWD, Barbosa LCA, Cecon PR (1999) Rendimento de tanino em dois
638 acessos de carqueja (*Baccharis myrioccephala* D.C.), em diferentes épocas de colheita em
639 Viçosa-MG. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais 1:29.

640
641 Castro de HG, Silva da DJH, Oliveira de LO, Ferreira FA, Sakiyama NS, Barbosa LCA,
642 Junior Ribeiro JI (2004) Diversidade genética entre acessos de mentrasto avaliada por
643 características botânico-agronômicas, moleculares e fitoquímicas. Revista Ceres 51: 227-241.

644

645 Costa LCB, Corrêa RM, Cardoso JCW, Pinto JEBP, Bertolucci SKV, Ferri PH (2005)
646 Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de
647 capim-limão. Horticultura Brasileira 23:956-959.

648

649 Leal TCAB, Freitas SP, Silva JF da, Carvalho AJC (2001) Avaliação do efeito da variação
650 estacional e horário de colheita sobre o teor foliar de óleo essencial de capim cidreira
651 (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf). Revista Ceres 48: 445-453.

652

653 Filgueira FAR (2000) Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e
654 comercialização de hortaliças. Viçosa MG. UFV.

655

656 Fortes JF, Osorio VA (2003) Pêssego: fitossanidade. Brasília DF EMBRAPA CLIMA
657 TEMPERADO.

658

659 Guynot ME, Ramos AJ, Setó L, Purroy P, Sanchis V, Marín S (2003) Antifungal activity of
660 volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration
661 of bakery products. Journal of Applied Microbiology 94:893-899.

662

663 Kanwischer ME, Mitchell DJ (1979) The influence of a fungicide on the epidemiology of
664 black shank of tobacco. Phytopathology 68: 1760- 1765.

665

666 Kim MK, Choi GJ, Lee HS (2003) Fungicidal property of *Curcuma longa* L, rhizome-derived
667 curcumin against phytopathogenic fungi in a greenhouse. Journal of Agricultural and Food
668 Chemistry 51:1578-1581.

669

- 670 Kurozawa C, Pavan MA (2005) Doenças das cucurbitáceas, In: Kimati H, Amorim L,
671 Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA (Eds.). Manual de Fitopatologia. Vol. 2.
672 Doenças das Plantas Cultivadas. 4^a. Ed. São Paulo SP. Ceres.
673
- 674 Laureano IB, Reis A (2006) Caracterização de isolados de *Phytophthora nicotianae* obtidos
675 de tomate, berinjela e jiló. Brasília DF. EMBRAPA HORTALIÇAS.
676
- 677 Lee SE, Park BS, Kim MK, Choi WS, Kim HT, Cho KY, Lee SG, Lee HS (2001) Fungicidal
678 activity of piperonaline, a piperidine alkaloid derived from long pepper, *Piper longum* L.,
679 against phytopathogenic fungi. Crop Protection 20:523-528.
680
- 681 Lopes CA, Santos JRM (1994) Doenças do tomateiro. Brasília DF. EMBRAPA SPI.
682
- 683 Luz EDMN (2006) O gênero *Phytophthora* no Brasil. Fitopatologia Brasileira 31:80-81.
684
- 685 Lima C (2008) Controle genético e biológico de doenças causadas por *Phytophthora* spp em
686 Cacaueiro e outras culturas de importância econômica. (Trabalho de conclusão de curso).
687 Universidade Estadual de Santa Cruz-UESC.
688
- 689 Luz EDMN, Silva SDVM, Bezerra JL, Souza JT, Santos AF (2008) Glossário ilustrado de
690 *Phytophthora*: técnicas especiais para o estudo de Oomicetos. Itabuna BA.
691 FAPESB/CEPLAC 204 p.
692
- 693 Ming LC (1994) Estudo e pesquisa de plantas medicinais na agronomia. Horticultura
694 Brasileira 12:2-9.

- 695
- 696 Raina VK, Srivastava SK, Aggarwal KK, Syamasundar KV, Kumar S (2001) Essential oil
697 composition of *Syzygium aromaticum* leaf from Little Andaman. Flavour Fragrance Journal
698 16:334-336.
- 699
- 700 Rodrigues MBC, Andreote FD, Spósito MB, Aguillar-Vildoso CI, Araújo WL, Pizzirani-
701 Kleiner AA (2007) Resistência a benzimidazóis por *Guignardia citricarpa*. Pesquisa
702 Agropecuária Brasileira 42:323-327.
- 703
- 704 Rozwalka LC, Lima MLRC, Mio de LLM, Nakashima T (2008) Extratos, decoctos e óleos
705 essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e
706 *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. Ciência Rural 38: 301-307.
- 707
- 708 Santos LGM, Cardoso MG, Lima RK, Souza PE, Guimarães LGL, Andrade MA (2007)
709 Avaliação do potencial fungitóxico do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr &
710 Perry (cravo-da-índia). Tecno-Lógica 11:11-14.
- 711
- 712 Schwan- Esstrada KRF, Stangarlin JR, Cruz MES (2000) Uso de extratos vegetais no controle
713 de fungos fitopatogênicos. Revista Floresta 30: 129-137.
- 714
- 715 Silva AR, Leite MT, Ferreira MC (2008) Estimativa da área foliar e capacidade de retenção
716 de calda fitossanitária em cafeeiro. Bioscience 24:66-73.
- 717
- 718 Silva MB, Rosa MB, Brasileiro BG, Almeida V, Silva CA (2005) Desenvolvimento de
719 produtos à base de extratos de plantas para o controle de doenças de plantas. In: Venezon TJ,

720 Paula Junior PA (Eds.). Controle alternativo de pragas e doenças. Viçosa MG.
721 EPAMIG/CTZM. pp. 221-246.

722

723 Silva MN (2010) Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica dos óleos essenciais de aroeira
724 (*schinus terebinthifolius*) e cravo-da-índia (*syzygium aromaticum*) sobre as principais espécies
725 de *Phytophthora* causadoras da podridão-parda do cacaueteiro no Brasil. Universidade Estadual
726 de Santa Cruz- UESC.

727

728 Simões CMO, Spitzer V (2000) Óleos voláteis. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann
729 GM, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (Eds.). Farmacognosia: da planta ao medicamento,
730 UFSC/UFGRS. Porto Alegre RS. pp. 821.

731

732 Valiense ML (2009) Avaliação *in vitro* da germinação de zoósporos de *Phytophthora* spp sob
733 a ação dos óleos essenciais. (Trabalho de conclusão de curso) Universidade Estadual de Santa
734 Cruz- UESC.

735

736 Venturoso LR, Bacchi LMA, Gavassoni WL, Pontim BCA, Conus LA (2010) Influência de
737 diferentes metodologias de esterilização sobre a atividade antifúngica de extratos aquosos de
738 plantas medicinais. Revista Brasileira de Plantas Medicinais 12:4.

739

740 Wang S, Wang X, Liu J, Cao K (2001) Screening of Chinese herbs for the fungitoxicity
741 against *Phytophthora infestans*. Journal of Agricultural University of Hebei 24:101-107.

742

743 Zadoks JC (1992) The costs of change in plant protection. Journal of Plant Protection
744 9:151-159.

745 **Tabela 1** - Porcentagem de “berinjela” e “tomate” infectados e diâmetro médio das lesões, três, cinco e seis dias após a inoculação com dezesseis isolados de *Phytophthora nicotianae*

Isol, (n°)	Berinjela						Tomate					
	3 DAI ¹		5 DAI		6 DAI		3 DAI		5 DAI		6 DAI	
	DML ²	%INF ³	DML	%INF	DML	%INF	DML	%INF	DML	%INF	DML	%INF
1366	0,00	0	7,79	80	11,05	80	0,00	0	3,35	40	4,75	40
1187	0,00	0	7,15	60	10,70	60	0,00	0	5,40	20	4,65	40
1375	2,76	80	6,93	80	9,10	80	0,00	0	4,00	60	5,12	60
1405	5,17	100	9,69	100	14,50	100	0,00	0	3,45	40	4,75	60
1406	3,55	20	7,51	80	11,53	80	0,00	0	4,55	60	7,97	80
1399	4,93	80	9,34	100	15,48	100	0,00	0	4,85	60	5,47	100
1359	3,93	40	7,42	60	10,47	60	0,00	0	3,45	40	4,33	40
1365	3,40	80	7,69	100	11,28	100	0,00	0	5,60	60	6,38	80
1362	2,13	40	6,66	80	9,56	80	0,00	0	4,90	20	4,48	40
1358	4,15	60	8,87	100	11,43	100	0,00	0	5,38	60	6,87	60
1176	3,44	80	8,34	80	10,25	100	0,00	0	0,00	0	3,80	20
1177	3,90	100	9,47	100	11,75	100	0,00	0	0,00	0	2,38	40
1178	4,33	80	9,91	80	13,45	80	0,00	0	4,93	60	7,43	60
1360	3,80	40	7,16	80	11,08	80	0,00	0	0,00	0	2,15	20
1364	3,70	80	7,42	100	10,36	100	0,00	0	3,23	40	4,73	40
1381	5,35	80	8,39	100	10,62	100	0,00	0	5,08	60	7,02	60

746 ¹Dias após a inoculação; ²Diâmetro médio da lesão; ³percentual de infecção.

747

748

749

750

751

752

753

754

755

756

757

758

759

760 **Tabela 2** - Porcentagem de “berinjela”, “tomate”, e “pimentão” infectados e diâmetro médio das lesões, seis dias após a inoculação com oito isolados de *Phytophthora nicotianae*

Isolados		Berinjela		Tomate		Pimentão	
nº	Origem	DML ¹	% INF ²	DML	% INF	DML	% INF
1178	raiz/berinjela	8,27	40	7,70	60	0,00	0
1358	solo/agrião	11,16	60	6,40	100	0,00	0
1365	haste/hortelã	11,51	80	7,50	100	5,00	40
1405	solo/jiló	16,81	80	7,92	100	0,00	0
1406	solo/jiló	16,05	80	8,49	100	0,00	0
1399	solo/alecrim	14,05	80	8,07	100	0,00	0
1381	solo/alecrim	14,03	100	7,19	100	0,00	0
1177	raiz,/berinjela	6,75	20	7,15	90	0,00	0

767 ¹Diâmetro médio da lesão; ² percentual de infecção.

768

769

770

771

772

773

774

775

776

777

778

779

780

781

782

783

784

785 **Tabela 3** - Percentual da inibição do crescimento micelial
 786 (ICM) e germinação de zoósporos (IGZ) de dois isolados
 787 de *Phytophthora nicotianae*, em relação a testemunhas
 788 quando cultivados em meio cenoura-ágar com adição de
 789 diferentes concentrações de óleos, extratos vegetais e
 790 fungicida (metalaxyl + mancozeb), por sete dias, na
 ausência de luz, à 25±2°C

ICM¹			
Tratamentos	Concentrações³ (µL/mL)		
	C1	C2	C3
Extrato citronela	2,42 cC	36,9 cB	63,52 cA
Extrato cravo	50,96 aB	100,00 aA	100,00 aA
Óleo citronela	27,89 bC	76,92 bB	93,57 bA
Óleo cravo	47,78 aB	100,00 aA	100,00 aA
Fungicida	6,91 cC	29,85 dB	41,96 dA
CV	6,64		
IGZ² (1365)			
Extrato citronela	5,38 cC	24,50 cB	54,12 bA
Extrato cravo	91,37 bB	100,00 aA	100,00 aA
Óleo citronela	2,50 cC	69,88 bB	100,00 aA
Óleo cravo	99,25 aA	100,00 aA	100,00 aA
CV	2,83		
IGZ (1405)			
Extrato citronela	10,75 cC	29,75 cB	58,00 bA
Extrato cravo	54,88 bB	100,00 aA	100,00 aA
Óleo citronela	14,88 cC	64,63 bB	100,00 aA
Óleo cravo	86,63 aB	99,62 aA	100,00 aA
CV	4,67		

791 Médias seguidas da mesma letra, minúsculas nas colunas e
 792 maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste Tukey
 793 (P=0,05).

794

795

796

797

798

799 **Tabela 4** - Severidade inicial (y_0), severidade máxima ($y_{m\acute{a}x}$), taxa de
 800 progresso da doena (TPD), e área abaixo da curva de progresso de lesões
 801 (cm^2) causadas por *Phytophthora nicotianae* a frutos de tomateiro e berinjela
 802 tratados com EBA's e OE's de *Syzygium aromaticum* e *Cymbopogon*
nardus, durante 3, 4, 5, 6 dias após a inoculao (DAI)

		803			
	Tratamentos	y_0 (cm^2)	$y_{m\acute{a}x}$ (cm^2)	TPD ¹ (logit/dia)	AACPD ² 804
Tomate	Extrato citronela	2,21 a	7,20 a	0,275 a	22,217 a
	Extrato cravo	2,96 a	7,70 a	0,328 a	21,049 a
	óleo citronela	3,47 a	7,70 a	0,420 a	19,548 a
	óleo cravo	3,16 a	7,09 a	0,288 a	20,620 a
	Fungicida	2,37 a	5,68 a	0,303 a	15,930 a
	Controle	2,97 a	7,65 a	0,330 a	21,110 a
	C.V. (%)	29,12	38,25	15,60	15,888
Berinjela	Extrato citronela	5,75 a	19,32 a	0,448 a	46,285 ab
	Extrato cravo	4,55 a	14,66 ab	0,425 a	38,970 ab
	óleo citronela	6,04 a	21,94 a	0,448 a	44,288 ab
	óleo cravo	5,48 a	21,12 a	0,500 a	43,825 ab
	Fungicida	5,00 a	17,03 ab	0,493 a	41,390 ab
	Controle	6,03 a	22,00 a	0,485 a	46,710 a
	C.V. (%)	35,70	35,88	8,07	7,56 ⁸¹²

813 ¹Estimada em todos os frutos, pela média de duas medidas diametralmente
 814 opostas. ²Estimada pelo parâmetro *b* da equao de regressão linear simples,
 815 tendo tempo em dias após a inoculao como variável independente e os
 816 dados de severidade em proporo (*y*), linearizados pela transformao
 817 logística [$y = \ln[y/(1-y)]$], como variável dependente. Médias seguidas da
 818 mesma letra nas colunas não apresentaram diferenas significativas entre si
 pelo teste Tukey (P=0,05).

819

820

821

822

823

824 **Tabela 5** - Período de incubação (PI), incidência final (IF), número de plantas mortas
 825 (NPM), taxa de progresso da doença (TPD), e área abaixo da curva de progresso de
 826 “damping off” causados por *Phytophthora nicotianae* a plântulas de tomateiro e
 827 berinjela tratados com EBA's e OE's de *Syzygium aromaticum* e *Cymbopogon*
nardus, durante 3, 4, 5, 6 dias após a inoculação (DAI)

		828				
	Tratamentos	PI	IF (%)	NPM	TPD ¹	AACPD ²
	Extrato citronela	4,2 a	26 ab	2,4 ab	0,052 ab	24,88 ⁸²⁹
	Extrato cravo	3,0 a	14 bc	1,2 bc	0,026 ab	12,3 b
	Óleo citronela	4,2 a	44 a	4,4 a	0,112 a	41,6 ⁸³⁰
	Óleo cravo	3,0 a	28 ab	2,8 ab	0,032 ab	32,3 a
	Fungicida	0,0 b	0 c	0,0 c	0,000 b	0,0 c ⁸³¹
	Controle	3,2 a	24 ab	2,4 ab	0,086 ab	24,2 ⁸³²
Tomate	C.V. (%)	20,13	18,76	18,99	2,14	27,38
	Extrato citronela	2,6 a	36 c	3,4 c	0,062 ab	39,6 ⁸³³
	Extrato cravo	2,4 a	70 a	6,8 a	0,060 ab	78,4 a
	Óleo citronela	2,2 a	46 bc	4,6 bc	0,058 ab	47,2 ⁸³⁴
	Óleo cravo	2,2 a	66 ab	6,4 ab	0,092 a	66,7 ab
	Fungicida	0,8 b	2 d	0,20 d	0,000 b	2,3 d ⁸³⁵
	Controle	2,6 a	62 ab	6,2 ab	0,020 b	74,2 ⁸³⁶
Berinjela	C.V. (%)	14,81	9,33	9,22	1,66	13,32

837 ¹Estimada em todos os frutos, pela média de duas medidas diametralmente opostas.

838 ²Estimada pelo parâmetro *b* da equação de regressão linear simples, tendo tempo em
 839 dias após a inoculação como variável independente e os dados de incidência em
 840 proporção (*y*), linearizados pela transformação logística [$y = \ln[y/(1-y)]$], como
 841 variável dependente. Para efeito de análise estatística, os valores de foram
 842 transformados para $\sqrt{x + 1}$, respectivamente. Médias seguidas da mesma letra na
 843 coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P=0,05).

844

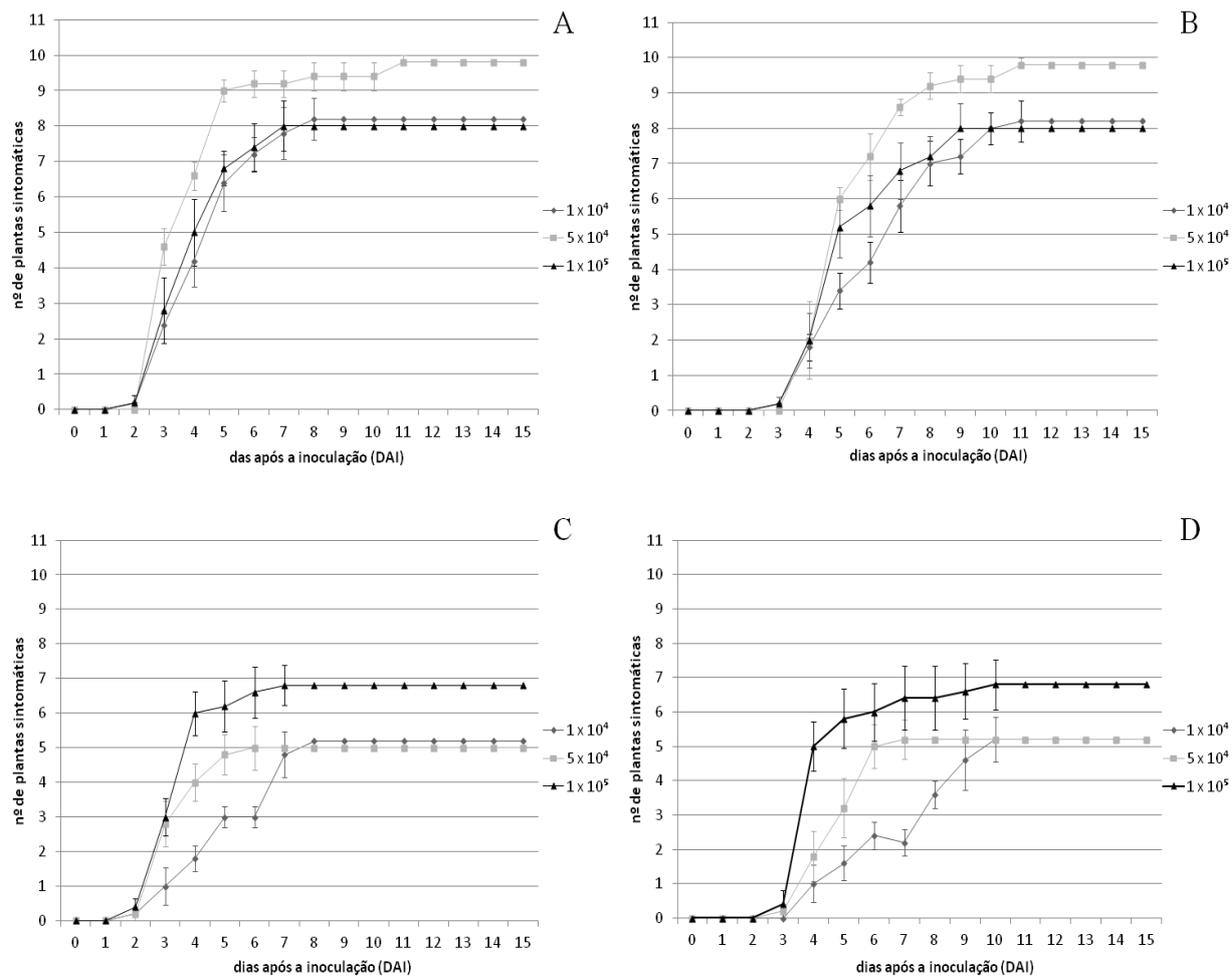
845

846

847

848

849



849 **Figura 1** - Número de plântulas de berinjela e tomateiro, sintomáticas e mortas, após a inoculação com
 850 diferentes concentrações de zoósporos/mL de *Phytophthora nicotinae*, ao longo de 13 dias de
 851 avaliação. **A.** Plântulas de berinjela sintomáticas; **B.** Plântulas de berinjela mortas; **C.** Plântulas de
 852 tomateiro sintomáticas; **D.** Plântulas de tomateiro mortas.

853

854

855

856

857

858

859

860

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

- Os meios que proporcionam os maiores crescimentos nem sempre induzem as maiores esporulações;
- Os meios a base de tomate (suco de tomate e suco de vegetais-V8) apesar de não proporcionarem o maior desenvolvimento das colônias, estimulam a produção de zoósporos;
- A influência da luminosidade na esporulação varia para diferentes meios;
- A idade ideal da cultura para a maior esporulação varia inter e intra-especificamente;
- O potencial hidrogeniônico tem papel essencial na esporulação de *P.nicotianae*, devendo este ser avaliado e corroborado mais aprofundadamente em experimentos posteriores;
- Os produtos obtidos de *Syzygium aromaticum* e *Cymbopogon nardus* apresentam potencial controlador para doenças causadas por *P. nicotianae*, devendo ser testados futuramente através do consórcio com outros agentes biocontroladores, além de técnicas de aplicação.