

# ARTIGOS

## Efeito da temperatura no crescimento micelial e patogenicidade de *Pythium* spp. que ocorrem em alface hidropônica

Liliane De Diana Teixeira<sup>1</sup>, Carmen Lída Amorim Pires Zottarelli<sup>2</sup>, Hiroshi Kimati<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ/USP, CP 9, CEP: 13.418-900, Piracicaba-SP, e-mail: lilianeddteixeira@yahoo.com.br. Bolsista CAPES. <sup>2</sup>Seção de Micologia e Liquenologia, Instituto de Botânica, São Paulo-SP. Parte da Dissertação de Mestrado da primeira autora.

Data de chegada: 29/07/2004. Aceito para publicação em: 27/09/2005

1096

### ABSTRACT

Teixeira, L.D.D.; Zottarelli, C.L.A.P.; Kimati, H. Temperature effects on mycelial growth and pathogenicity of *Pythium* spp. occurring in hydroponic lettuce. *Summa Phytopathologica*, v. 32, n.3, p.221-226, 2006

Twelve *Pythium* isolates were obtained from lettuce roots grown hydroponically in commercial systems, showing or not symptoms of rotting. Three of them were identified as *P. helicoides* (H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> and H<sub>3</sub>), whereas five were shown to belong to group F (F<sub>1</sub>-F<sub>5</sub>) and four to group T (T<sub>1</sub>-T<sub>4</sub>) of *Pythium*. The identification of the species was based on morphological characteristics. The effect of temperature (10, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 37 and 40°C) on the mycelial growth was determined for all isolates. Minimum and maximum temperatures, estimated by the generalized beta function, varied from 3.5 to 10°C and 40 to 40.7°C, respectively.

The optimum temperature ranged from 24 to 37°C for *P. helicoides*, from 25 to 35°C for isolate F<sub>4</sub> and 21 to 30°C for the remaining isolates. Pathogenicity and aggressiveness of the isolates were evaluated by the inoculation of lettuce seeds plated in water-agar, at 21 and 30°C. At 30°C, *P. helicoides* isolates were clearly the most aggressives, determining 100 % seed mortality soon after germination. At 21°C, all isolates reduced seedling growth, associated or not with root tissue necrosis. This is the first report of *P. helicoides* in Brazil and the first world reference of this species in hydroponic systems.

Additional keywords: *Lactuca sativa* L., *Pythium helicoides*, *Pythium* group F, *Pythium* group T

### RESUMO

Teixeira, L.D.D.; Zottarelli, C.L.A.P.; Kimati, H. Efeito da temperatura no crescimento micelial e patogenicidade de *Pythium* spp. que ocorrem em alface hidropônica. *Summa Phytopathologica*, v. 32, n.3, p.221-226, 2006

Doze isolados de *Pythium* foram obtidos de raízes de alface cultivada em sistemas hidropônicos comerciais, apresentando ou não sintomas de apodrecimento. Três desses isolados foram identificados como *Pythium helicoides* Drechsler (H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> e H<sub>3</sub>), cinco como pertencentes ao grupo F (F<sub>1</sub> a F<sub>5</sub>) e quatro ao grupo T (T<sub>1</sub> a T<sub>4</sub>) de *Pythium*. A identificação das espécies foi realizada baseando-se nas características morfológicas. O efeito da temperatura (10, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 37 e 40°C) sobre o crescimento micelial foi determinado para todos os isolados. As temperaturas mínima e máxima, estimadas pela função beta generalizada, variaram de 3,5 a 10°C e de 40 a 40,7°C, respectivamente. A

temperatura ótima foi de 24 a 37°C para *P. helicoides*, de 25 a 35°C para o isolado F<sub>4</sub> e de 21 a 30°C para os demais isolados. A patogenicidade e a agressividade dos isolados foram avaliadas, inoculando-se sementes de alface cv. Verônica, semeadas em água, a 21 e 30°C. A 30°C, os isolados de *P. helicoides* foram notadamente os mais agressivos, ocasionando 100 % de mortalidade das sementes logo após sua germinação. A 21°C, todos os isolados induziram subdesenvolvimento de plântulas, acompanhado ou não de necrose dos tecidos radiculares. Trata-se do primeiro relato de *P. helicoides* para o Brasil e a primeira referência mundial da espécie em hidroponia.

Palavras-chave adicionais: *Lactuca sativa* L., *Pythium helicoides*, *Pythium* grupo F, *Pythium* grupo T

O cultivo hidropônico tem sido mundialmente empregado para produção de vegetais em escala comercial há várias décadas. No Brasil, a cultura preferida por 90 % dos hidroponicultores é a alface (*Lactuca sativa* L.), pois além de apresentar ciclo de vida curto e alta produtividade, é uma hortaliça amplamente aceita no mercado, viabilizando, dessa forma, o rápido retorno do capital investido nas instalações.

Uma grande diversidade de espécies de *Pythium* constitui fator limitante ao desenvolvimento de alface em todo o mundo, tanto em cultivo convencional como hidropônico (20, 21). Dentre as espécies mais frequentes em hidroponia, estão *P. aphanidermatum* (Edson) Fitzp., *P. debaryanum* Hesse, *P. dissotocum* Drechsler, *P. intermedium* de Bary, *P. irregulare* Buisman, *P. myriotylum* Drechsler e *P. sylvaticum* Campbell & Hendrix (21). Consultas atendidas na Clínica Fitopatológica da ESALQ/USP revelam a constante preocupação dos produtores com a doença, principalmente nos meses mais quentes do ano. Apesar de Tateishi et al. (22) terem constatado *Pythium* sp. ocasionando severos sintomas de podridão radicular e subdesenvolvimento em alface convencional, na região de Atibaia, São Paulo, não se procedeu a identificação ao nível de espécie e, desde então, poucos estudos etiológicos sobre problemas radiculares causados por *Pythium* spp. em alface têm sido realizados no Brasil.

Apesar das espécies patogênicas de *Pythium* serem constantemente isoladas de raízes necróticas, Stanghellini & Kronland (20) descobriram em cultivo hidropônico de alface, que *P. dissotocum* causava prejuízos superiores a 50%, mesmo na ausência de sintomas de podridão radicular, em decorrência do que chamaram de infecção subclínica. Assim, os produtores podem estar perdendo metade de sua produção potencial, mesmo quando produzem uma cultura aparentemente sadia, com raízes brancas, sem sintomas.

A temperatura é considerada um dos principais fatores para o desenvolvimento de doenças radiculares ocasionadas por *Pythium* spp. (4, 5, 6, 19, 20, 23). De acordo com Bates & Stanghellini (2), a temperatura da solução nutritiva influenciou a ocorrência cíclica de duas espécies de *Pythium* em cultivo hidropônico de espinafre (*Spinacea oleracea* L.). *P. aphanidermatum* foi o patógeno predominante nos meses de verão, quando a temperatura da solução nutritiva foi igual ou superior a 23°C e *P. dissotocum* foi a espécie mais agressiva quando a temperatura variou entre 17 e 22°C.

Face à carência de informações sobre o patossistema alface hidropônica – *Pythium* spp. no Brasil, os objetivos do presente trabalho foram: o isolamento e a identificação de *Pythium* spp. de cultura hidropônica de alface, e a avaliação da influência da temperatura sobre o crescimento micelial e patogenicidade desses isolados.

## MATERIALE MÉTODOS

### Isolamento e identificação de *Pythium* spp.

O isolamento de *Pythium* spp. foi realizado a partir de raízes necróticas ou assintomáticas de plantas de alface provenientes de sistemas hidropônicos comerciais, em meio de cultura ágar-água com posterior repicagem para BDA (batata dextrose ágar). A identificação dos isolados foi realizada por meio de literatura específica (9, 13, 15, 16, 24), baseando-se nas suas características morfológicas. Os isolados foram cultivados nos seguintes meios de cultura: CMA + p.p.e. (17 g de “corn meal agar”; 0,2 g

de penicilina G sódica; 0,1 g de sulfato de estreptomicina; 0,02 g de pimaricina e 1000 mL de água destilada), BCA (batata cenoura ágar), meio de suco de tomate (200 mL de suco de tomate, 3 g de CaCO<sub>3</sub>, 15 g de ágar e 800 mL de água destilada) e BDA, para avaliação da morfologia das colônias, como subsídio para a identificação e indução e/ou análise das estruturas assexuais e sexuais.

A forma de zoosporângios, células anteridiais e oogônios, a condição plerótica ou aplerótica de oósporos, a origem do ramo anteridial e o número de anterídios atracados em cada oogônio, foram examinados. Dos isolados que apresentaram zoosporângio esférico e reprodução sexuada, foram registradas as dimensões de aproximadamente 40 zoosporângios, 40 oogônios, 40 oósporos, 20 paredes de oósporos, 20 zoósporos e 20 hifas, através de microscópio óptico e lâmina graduada.

A taxa de crescimento diário dos isolados em BCA, a 25°C, no escuro, foi determinada, por tratar-se de um parâmetro de auxílio à taxonomia (16). O ensaio contou com três repetições, cada repetição sendo representada por uma placa de Petri. A avaliação foi realizada registrando-se o diâmetro das colônias, em dois sentidos perpendiculares entre si, em dois intervalos de 24 horas. Empregou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado e para a análise dos resultados, foram considerados os diâmetros médios das duas avaliações.

### Influência da temperatura sobre o crescimento micelial dos isolados

O efeito da temperatura sobre a taxa de crescimento micelial diária dos isolados obtidos foi avaliado colocando-se discos de micélio de cada isolado no centro de placas de Petri contendo o meio de cultura CMA + p.p.e. As placas foram mantidas em estufas, no escuro, nas temperaturas de 10, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 37 e 40°C. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com três repetições, cada repetição representada por uma placa de Petri. As avaliações foram realizadas em intervalos de 24 horas, durante dois dias, medindo-se o crescimento diametral médio das colônias. Para a análise dos resultados considerou-se a média das duas avaliações. Os dados foram estatisticamente analisados através do programa STATÍSTICA (StatSoft, Tulsa, OK), por meio de regressões não-lineares. Os diâmetros médios foram representados graficamente em função da temperatura, para cada isolado, utilizando-se a função beta generalizada [ $Y = B1 ((X-B2)^{B4}) ((B3-X)^{B5})$ ] (9) como modelo de ajuste.

### Efeito da temperatura sobre o potencial patogênico dos isolados

O potencial patogênico dos isolados foi avaliado em laboratório e sob duas temperaturas, utilizando metodologia similar a Stanghellini & Kronland (20). Sete sementes de alface, cultivar Verônica, após desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio (três partes de água destilada: uma parte de água sanitária – 0,625 % de cloro ativo) foram colocadas na superfície do meio de cultura ágar-água, contido em placa de Petri. Um disco de micélio de cada isolado foi disposto no centro de cada placa. O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições. Placas contendo apenas as sementes de alface serviram como controle. A incubação foi realizada durante 10 dias, com fotoperíodo de 12 horas, a 21°C (± 2°C) em câmara de crescimento e a 30°C (± 1°C) em câmara de

germinação. Avaliou-se massa e altura médias de plântulas de cada parcela e a porcentagem de plântulas sobreviventes.

Todos os ensaios do presente trabalho foram repetidos pelo menos duas vezes.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Isolamento e identificação de *Pythium* spp.

Doze isolados de *Pythium* spp. foram obtidos a partir das raízes analisadas (Tabela 1). Os espécimes H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> e H<sub>3</sub> apresentaram crescimento mais rápido, vigoroso e presença de micélio aéreo em todos os meios de cultura testados. Apresentaram reprodução assexuada, com zoosporângios esféricos, papilados e com proliferação interna e reprodução sexuada, o que permitiu sua identificação como *P. helicoides* (Tabela 1). As características morfológicas e taxa de crescimento dos espécimes são mostrados na Tabela 2. É a primeira citação da espécie para o Brasil e, a primeira menção da mesma em cultivo hidropônico ao nível mundial.

**Tabela 1.** Isolados de *Pythium* spp. obtidos de alface hidropônica (*Lactuca sativa* L.), local de procedência e presença ou ausência de sintomas de podridão radicular.

Isolado	Identificação	Procedência	Raízes exibindo sintomas
H <sub>1</sub>	<i>Pythium helicoides</i>	Limeira – SP	Sim
H <sub>2</sub>		Valinhos – SP	Sim
H <sub>3</sub>		Araraquara – SP	Sim
F <sub>1</sub>	<i>Pythium</i> grupo F	Piracicaba – SP	Não
F <sub>2</sub>		Piracicaba – SP	Não
F <sub>3</sub>		Capivari – SP	Sim
F <sub>4</sub>		Salvador – BA	Sim
F <sub>5</sub>		Capivari – SP	Não
T <sub>1</sub>	<i>Pythium</i> grupo T	Piracicaba – SP	Não
T <sub>2</sub>		Charqueada – SP	Sim
T <sub>3</sub>		Jundiaí – SP	Sim
T <sub>4</sub>		Limeira – SP	Não

**Tabela 2.** Características morfológicas e fisiológicas dos isolados de *Pythium helicoides*.

Característica	H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>3</sub>
Crescimento radial diário (BCA / 25°C) (mm / dia)	32	31	32
Temperatura ótima (°C)	24 – 37	24 – 37	24 – 37
Diâmetro da hifa (µm)	8 – 9	8 – 9,5	8 – 9
Zoosporângio (µm)	22-33 x 17-25	21-33 x 17-25	28-40 x 21-28
Zoósporo (µm)	10 – 13	10 – 11	10 – 12
Oogônio (µm)	28 – 36	27 – 37	27 – 37
Oósporo (µm)	25 – 29	25 – 31	24 – 33
Espessura da parede do oósporo (µm)	4,8 – 6	4,4 – 5,8	4,8 – 6

Os isolados F<sub>1</sub> a F<sub>5</sub> e T<sub>1</sub> a T<sub>4</sub> apresentaram crescimento um pouco mais lento, submerso nos meios de cultura e ausência de micélio aéreo. Como não apresentaram reprodução sexuada, foram classificados em grupos, como proposto por Plaats-Niterink (15, 16). Assim, com base na morfologia dos zoosporângios, os isolados F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub> e F<sub>5</sub>, apresentando zoosporângios filamentosos não inflados, foram classificados no grupo F e, os isolados T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> no grupo T, pela presença de zoosporângios filamentosos inflados. Diversos meios de cultura e incubação a várias temperaturas foram empregados no intuito de estimular a formação de estruturas reprodutivas sexuais desses espécimes, entretanto, sem sucesso.

Os isolados de *P. helicoides* H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> e H<sub>3</sub> apresentaram maior crescimento, seguidos pelos isolados F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub> e T<sub>3</sub> e por F<sub>4</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e T<sub>4</sub> que cresceram mais lentamente. Assim, percebe-se uma separação dos isolados em três grupos, de acordo com sua taxa de crescimento micelial diária em BCA (Tabela 3). A classificação dos isolados assexuais em grupos foi feita baseada na morfologia dos zoosporângios, de acordo com Plaats-Niterink (15, 16).

**Tabela 3.** Crescimento micelial diário de doze isolados de *Pythium* spp. de alface hidropônica em meio BCA, a 25°C.

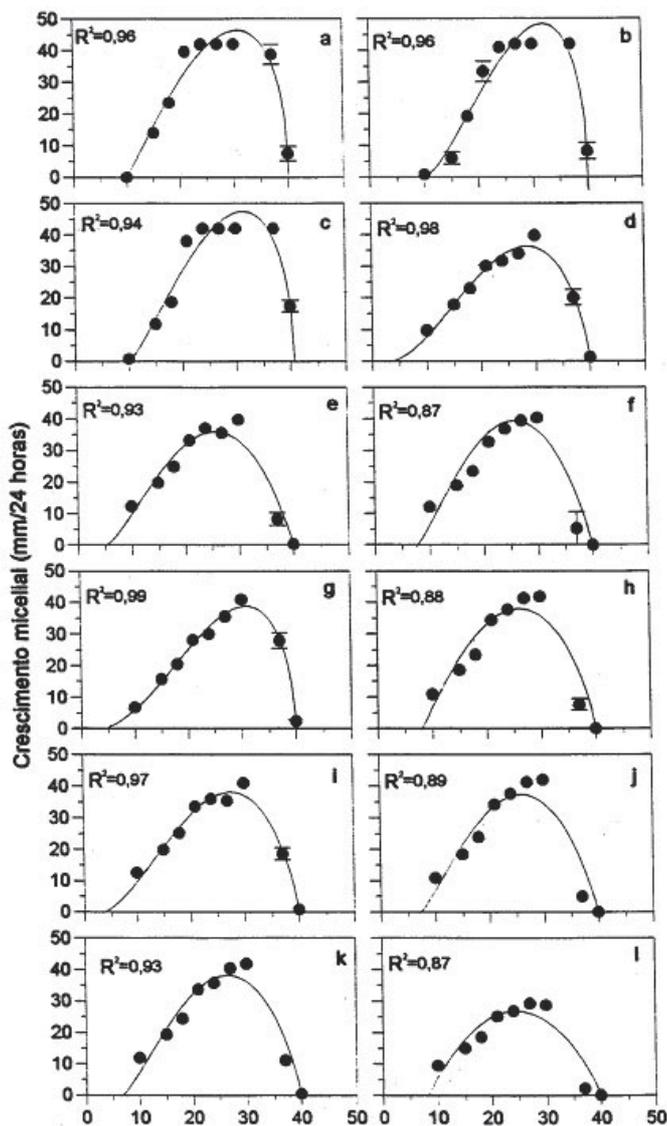
Isolado	Diâmetro da colônia (mm)*	
H <sub>1</sub>	63,7	a
H <sub>2</sub>	62,7	a
H <sub>3</sub>	63,7	a
F <sub>1</sub>	51,3	b
F <sub>2</sub>	50,0	b
F <sub>3</sub>	49,7	b
F <sub>4</sub>	43,9	c
F <sub>5</sub>	50,3	b
T <sub>1</sub>	45,5	c
T <sub>2</sub>	44,7	c
T <sub>3</sub>	50,2	b
T <sub>4</sub>	42,5	c

\*Média de 3 repetições, cada uma representada por uma placa de Petri. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 (DMS = 3,866; CV = 2,55 %).

A identificação de isolados que não produzem estruturas sexuadas é bastante difícil, por isso, Plaats-Niterink (15) classificou-os apenas em grupos. Essa classificação, porém, não apresenta rigidez, uma vez que espécies heterotáticas podem acabar sendo incluídas nesses grupos, como no caso do grupo HS de *Pythium* (15), que posteriormente foi relatado como uma linhagem assexual de *P. ultimum* Trow (18). Assim, técnicas moleculares (10, 11) e imunológicas (12, 25) são importantes ferramentas nos estudos morfológicos para identificação de espécies de *Pythium*.

### Influência da temperatura sobre o crescimento micelial dos isolados

A influência da temperatura sobre a taxa de crescimento micelial diária foi significativa para os doze isolados estudados e descrita pela função beta generalizada (Figura 1, Tabela 4). Hou-



**Figura 1.** Taxa de crescimento micelial diária em função da temperatura dos seguintes isolados de *Pythium* de alface hidropônica: H<sub>1</sub> (a), H<sub>2</sub> (b), H<sub>3</sub> (c), F<sub>1</sub> (d), F<sub>2</sub> (e), F<sub>3</sub> (f), F<sub>4</sub> (g), F<sub>5</sub> (h), T<sub>1</sub> (i), T<sub>2</sub> (j), T<sub>3</sub> (k) e T<sub>4</sub> (l).

R<sup>2</sup> = coeficiente de determinação

ve incremento no desenvolvimento de todos os isolados até aproximadamente a temperatura de 30°C. Para H<sub>2</sub> e H<sub>3</sub>, esse aumento ocorreu até cerca de 37°C. Para os demais isolados, a partir de 30°C, a taxa de crescimento decresceu, e de maneira mais acentuada para F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>5</sub>, T<sub>2</sub> e T<sub>4</sub>.

Apesar dos valores de temperatura máxima estimados pelo modelo situarem-se em torno de 40°C para todos os isolados (parâmetro B<sub>3</sub> - Tabela 4), nessa temperatura, houve significativo crescimento de H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> e H<sub>3</sub>, especialmente de H<sub>3</sub>; os isolados F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>5</sub>, T<sub>2</sub> e T<sub>4</sub> não cresceram e F<sub>1</sub>, F<sub>4</sub>, T<sub>1</sub> e T<sub>3</sub> exibiram traços de crescimento (Figura 1). A temperatura mínima de crescimento micelial estimada variou entre 3,5 e 10°C (parâmetro B<sub>2</sub> - Tabela 4).

**Tabela 4.** Coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) e parâmetros (B<sub>1</sub> a B<sub>5</sub>) estimados pela função beta generalizada:  $Y = B_1 / ((X - B_2)^{B_4} + (B_3 - X)^{B_5})$ , onde Y é a taxa de crescimento micelial diária, X é a temperatura, B<sub>1</sub>, B<sub>4</sub> e B<sub>5</sub> são parâmetros da equação e B<sub>2</sub> e B<sub>3</sub> representam respectivamente as temperaturas mínima e máxima para o crescimento micelial de doze isolados de *Pythium* de alface hidropônica.

Isolado	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	B <sub>4</sub>	B <sub>5</sub>	R <sup>2</sup>	F*
H <sub>1</sub>	0,6066	10,00	40,10	1,07	0,48	0,96	25,23
H <sub>2</sub>	0,1901	10,00	40,13	1,43	0,53	0,96	22,00
H <sub>3</sub>	0,3256	10,00	40,71	1,24	0,53	0,94	16,44
F <sub>1</sub>	0,0254	3,50	40,05	1,67	0,76	0,98	63,88
F <sub>2</sub>	0,0441	5,22	40,00	1,38	0,96	0,93	13,21
F <sub>3</sub>	0,0889	7,77	40,00	1,22	0,96	0,87	7,34
F <sub>4</sub>	0,0254	3,50	40,04	1,81	0,61	0,99	113,93
F <sub>5</sub>	0,2225	8,10	40,00	1,04	0,81	0,88	7,70
T <sub>1</sub>	0,0282	3,50	40,03	1,60	0,83	0,97	43,93
T <sub>2</sub>	0,0882	7,29	40,00	1,23	0,92	0,89	7,53
T <sub>3</sub>	0,0873	6,80	40,00	1,27	0,88	0,93	12,96
T <sub>4</sub>	0,1491	8,27	40,00	0,96	0,92	0,87	6,47

\*(P < 0,05).

Os isolados de *P. helicoides* (H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> e H<sub>3</sub>) mostraram comportamento semelhante perante as temperaturas testadas (Figura 1) e apresentaram temperaturas mínimas para o crescimento micelial mais altas que os demais (parâmetros B<sub>2</sub> e B<sub>3</sub> - Tabela 4).

A importância da temperatura no desenvolvimento de *Pythium* spp. foi ressaltada por Favrin et al. (4) e Funck-Jensen & Hockenhull (5). Schrandt et al. (19), ao investigarem a faixa de temperatura ideal para o crescimento micelial de *P. violae* Chester & Hickman, encontraram que o patógeno desenvolve-se melhor em temperaturas entre 16 e 22°C. Neste trabalho, a faixa de temperatura ótima para o crescimento micelial abrangeu desde 24 a 37°C para os isolados de *P. helicoides* e de 21 a 30°C para os isolados de *Pythium* pertencentes aos grupos F e T, com exceção de F<sub>4</sub>, que exibiu ótimo de temperatura entre 25 e 35°C. Para *P. helicoides*, a faixa ótima foi mais ampla que as relatadas por Plaats-Niterink (16), situada entre 30 e 37°C e por Middleton (13), compreendida entre 28 e 37°C.

O parâmetro B<sub>5</sub> da função beta generalizada é relacionado à forma da curva e indica a amplitude do intervalo de temperatura ótima; quanto menor o valor do parâmetro (próximo a zero), mais ampla é a faixa de temperatura ao redor da ótima (1). O valor de B<sub>5</sub> variou entre 0,48 e 0,96 (Tabela 4), revelando que todos os isolados cresceram numa extensa faixa de temperatura.

A função beta generalizada (7) tem sido empregada para representar a resposta de eventos biológicos a variações de temperatura, pois é baseada em curvas que descrevem processos biológicos, uma vez que estima os valores de temperaturas mínima e máxima (parâmetros B<sub>2</sub> e B<sub>3</sub> respectivamente) de desenvolvimento, além de possuir formato de sino. De acordo com os valores dos coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) e de "F"

(Tabela 4), pode-se afirmar que esta função também se mostrou adequada para a representação dos dados obtidos.

#### Efeito da temperatura sobre o potencial patogênico dos isolados

Houve significativo efeito da temperatura sobre a patogenicidade dos isolados. Na temperatura de 21°C, apenas o isolado F<sub>3</sub> foi capaz de reduzir significativamente a massa fresca das plântulas, diferindo estatisticamente da testemunha. Os isolados que mais afetaram a altura média das plântulas foram T<sub>1</sub>, F<sub>3</sub>,

H<sub>1</sub>, F<sub>1</sub> e T<sub>2</sub>. Os isolados de *P. helicoides* (H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> e H<sub>3</sub>) ocasionaram a morte de apenas 3,57 % das plântulas inoculadas (Tabela 5), enquanto os de *Pythium* grupo F de 3,57 % (F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub>) e 7,14 % (F<sub>5</sub>) (Tabela 5) e aqueles pertencentes ao grupo T de 3,57 % (T<sub>1</sub>, T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub>) e 10,71 % (T<sub>2</sub>) (Tabela 5). As plântulas não inoculadas exibiram desenvolvimento normal.

Na temperatura de 30°C, os isolados de *P. helicoides* H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> e H<sub>3</sub> foram claramente os mais agressivos, crescendo rápida e abundantemente, tomando toda a placa de Petri dentro de dois

**Tabela 5.** Efeito da temperatura na patogenicidade *in vitro* de 12 isolados de *Pythium* a plântulas de alface.

Isolado	Massa fresca (mg) <sup>1,2</sup>		Altura (mm) <sup>1,2</sup>		Plântulas sobreviventes (%) <sup>1,3</sup>	
	21°C	30°C	21°C	30°C	21°C	30°C
Test	23,9 a	15,2 abc	87,0 a	32,2 ab	100,0 a	100,0 a
T <sub>4</sub>	23,8 a	16,7 ab	63,5 b	35,9 a	96,4 a	100,0 a
F <sub>2</sub>	20,5 ab	17,2 a	51,6 bcd	26,3 bc	96,4 a	100,0 a
F <sub>4</sub>	22,9 a	14,9 abc	62,8 b	20,6 cd	100,0 a	100,0 a
T <sub>1</sub>	19,8 ab	12,2 abcd	36,1 g	20,0 cd	96,4 a	96,4 a
T <sub>2</sub>	20,9 ab	16,3 abc	42,1 defg	16,8 d	89,3 a	100,0 a
F <sub>1</sub>	21,4 ab	14,4 abc	40,7 efg	15,7 d	96,4 a	100,0 a
F <sub>5</sub>	20,4 ab	13,6 bcd	47,7 cdef	15,8 d	92,8 a	96,4 a
F <sub>3</sub>	20,6 ab	13,3 cd	49,7 cdef	17,7 d	96,4 a	100,0 a
T <sub>3</sub>	17,4 b	11,1 d	36,7 g	18,1 d	96,4 a	100,0 a
H <sub>1</sub>	19,9 ab	0,0 e	39,5 fg	0,0 e	96,4 a	0,0 b
H <sub>2</sub>	22,1 ab	0,0 e	50,2 cde	0,0 e	96,4 a	0,0 b
H <sub>3</sub>	0,569	0,420	0,780	0,596	0,472	0,182
DMS	4,9	5,4	4,4	6,4	12,8	6,0
CV (%)						

<sup>1</sup>Média de 4 repetições, cada uma representada por uma placa de Petri com 7 plântulas de alface. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05.

<sup>2</sup>Dados originais. Para efeito de análise estatística, os dados foram transformados em raiz quadrada de  $x + 0,5$ .

<sup>3</sup>Dados originais. Para efeito de análise estatística, os dados foram transformados em arco seno da raiz de  $x + 1/100$ .

dias, colonizando e causando a morte de todas as plântulas, logo após a germinação das sementes inoculadas (Tabela 5). Com relação ao efeito dos demais isolados sobre a massa fresca das plântulas, apenas F<sub>3</sub> causou considerável redução. A altura média das plântulas foi afetada por um maior número de isolados, sendo consistentemente reduzida por T<sub>2</sub>, F<sub>1</sub>, F<sub>5</sub>, T<sub>3</sub>, e F<sub>3</sub>. Dentre os isolados de *Pythium* pertencentes aos grupos F e T, apenas F<sub>5</sub> e T<sub>1</sub> ocasionaram a morte de 3,57 % das plântulas inoculadas (Tabela 5). As plântulas não inoculadas apresentaram bom desenvolvimento, porém, menor que aquelas cultivadas a 21°C (Tabela 5), além de uma menor quantidade de raízes laterais. A massa fresca das plântulas inoculadas não foi uma variável adequada para a avaliação da patogenicidade *in vitro*, evidenciando pouquíssimas diferenças entre os tratamentos.

Stanghellini & Kronland (20) avaliaram a patogenicidade *in vitro* de *Pythium* spp. isoladas de raízes assintomáticas de plantas de alface, cultivadas pelo sistema convencional, e observaram que houve morte de sementes e/ou plântulas quando inoculadas com *P. irregulare* e *P. sylvaticum*, enquanto apenas

necrose da ponta da raiz e inibição da formação de raízes laterais ocorreram em plântulas inoculadas com *P. dissotocum*, *P. uncinulatum* Van der Plaats-Niterink & Blok e *P. violae*. *P. catenulatum* Matthews e *P. rostratum* Butler não provocaram óbvios sintomas em alface. Os mesmos autores comprovaram o efeito da temperatura sobre a patogenicidade de *P. dissotocum* a alface em condições de hidroponia. Evidenciaram, mesmo na ausência de sintomas visíveis, diminuições significativas na produção (35-54% de redução à 18°C e 12-17% à 28°C). Thinggaard & Middelboe (23) ao inocular uma suspensão de zoósporos de *Pythium* grupo F em sementes de alface dispostas sobre papel de filtro, em placas de Petri, à 25°C, constataram 99 a 100 % de morte. Neste estudo, à 30°C, apenas isolados de *P. helicoides* ocasionaram morte de 100 % de sementes inoculadas, logo após sua germinação. À 21°C, todos os isolados induziram subdesenvolvimento de plântulas acompanhado ou não de sintomas de necrose e pouco afetaram a sobrevivência das plântulas inoculadas (Tabela 5).

Fatores como concentração de oxigênio, pH e condutividade

de elétrica da solução nutritiva são importantes elementos para o adequado desenvolvimento de culturas hidropônicas (3, 14). Segundo Rey et al. (17), plantas estressadas são mais afetadas por patógenos, pois seus mecanismos de defesa encontram-se enfraquecidos. Nessa situação, organismos considerados patógenos fracos tornam-se potencialmente perigosos, a exemplo de *Pythium* grupo F. Dessa forma, na presente pesquisa, a ocorrência de fatores ambientais adequados ou não para o desenvolvimento das plantas de alface empregadas para obtenção dos isolados, em suas instalações hidropônicas de origem, pode ter determinado a presença ou ausência de sintomas radiculares (Tabela 1).

Assim, os efeitos de infecções ocasionadas por *Pythium* spp. em sistemas hidropônicos recirculantes necessitam ser mais investigados em condições brasileiras, para que a manipulação da temperatura da solução nutritiva possa ser empregada como um método cultural para controle de certas doenças radiculares, desde que o intervalo de temperatura utilizado permita a produção econômica da cultura.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. Bassanezi, R.B.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Hau, B. Effects of bean line pattern mosaic virus on the monocyclic components of rust and angular leaf spot of *Phaseolus* bean at different temperatures. **Plant Pathology**, Edinburgh, v.47, n.3, p.289-298, 1998.
02. Bates, M.L.; Stanghellini, M.E. Root rot of hydroponically grown spinach caused by *Pythium aphanidermatum* and *Pythium dissotocum*. **Plant Disease**, St. Paul, v.68, n.11, p.989-991, 1984.
03. Chérif, M.; Tirilly, Y.; Bélanger, R.R. Effect of oxygen concentration on plant growth, lipidperoxidation, and receptivity of tomato roots to *Pythium* F under hydroponic conditions. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.103, n.3, p.255-264, 1997.
04. Favrin, R.J.; Rahe, J.E.; Mauza, B. *Pythium* spp. associated with crown rot of cucumbers in British Columbia greenhouses. **Plant Disease**, St. Paul, v.72, n.8, p.683-687, 1988.
05. Funck-Jensen, D.; Hockenull, J. The influence of some factors on the severity of *Pythium* root rot of lettuce in soilless (hydroponic) growing systems. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.133, p.129-136, 1983.
06. Gold, S.E.; Stanghellini, M.E. Effects of temperature on *Pythium* root rot of spinach grown under hydroponic conditions. **Phytopathology**, St. Paul, v.75, n.3, p.333-337, 1985.
07. Hau, B.; Kranz, J. Mathematics and statistics for analyzes in epidemiology. In: Kranz, J. (Ed.) **Epidemics of plant diseases: mathematical analyses and modeling**. Berlin: Springer-Verlag, 1990. p.12-52.
08. Hendrix Jr., F.F.; Campbell, W.A. *Pythiums* as plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.11, p.77-98, 1973.
09. Hendrix Jr., F.F.; Papa, K.E. Taxonomy and Genetics of *Pythium*. In: Symposium on the genus *Pythium*. **Proceedings**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1974, p.200-223, v.1.
10. Klassen, G.R.; Balcerzak, M.; de Cock, A.W.A.M. 5 S ribosomal RNA gene spacers as species-specific probes for eight species of *Pythium*. **Phytopathology**, St. Paul, v.86, n.6, p.581-587, 1996.
11. Lèvesque, C.A.; Harlton, C.E.; de Cock, A.W.A.M. Identification of some oomycetes by reverse dot blot hybridization. **Phytopathology**, St. Paul, v.88, n.3, p.213-222, 1998.
12. MacDonald, J.D.; Stites, J.; Kabashima, J. Comparison of serological and culture plate methods for detecting species of *Phytophthora*, *Pythium* and *Rhizoctonia* in ornamental plants. **Plant Disease**, St. Paul, v.74, n.9, p.655-659, 1990.
13. Middleton, J.T. The taxonomy, host range and geographic distribution of the genus *Pythium*. **Memoirs of the Torrey Botanical Club**, Chicago, v.20, p.1-171, 1943.
14. Moulin, F.; Lemanceau, P.; Alabouvette, C. Pathogenicity of *Pythium* species on cucumber in peat-sand, rockwool and hydroponics. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.100, n.1, p.3-17, 1994.
15. Plaats-Niterink, A.J. van der. Species of *Pythium* in Netherlands. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v.81, n.1, p.22-37, 1975.
16. Plaats-Niterink, A.J. van der. Monograph of the genus *Pythium*. **Studies in Mycology**, Baarn, v. 21, p.1-242, 1981.
17. Rey, P.; Benhamou, N.; Tirilly, Y. Ultrastructural and cytochemical investigation of asymptomatic infection by *Pythium* spp. **Phytopathology**, St. Paul, v.88, n.3, p.234-244, 1998.
18. Saunders, G.A.; Hancock, J.G. Self-sterile isolates of *Pythium* mate with self-fertile isolates of *Pythium ultimum*. **Mycologia**, New York, v.86, p.660-666, 1994.
19. Schrandt; J.K.; Davis, R.M.; Nunez, J.J. Host range and influence of nutrition, temperature and pH on growth of *Pythium violae* from carrot. **Plant Disease**, St. Paul, v.78, n.4, p.335-338, 1994.
20. Stanghellini, M.E.; Kronland, W.C. Yield loss in hydroponically grown lettuce attributed to subclinical infection of feeder rootlets by *Pythium dissotocum*. **Plant Disease**, St. Paul, v.70, n.11, p.1053-1056, 1986.
21. Stanghellini, M.E.; Rasmussen, S.L. Hydroponics: a solution for zoosporic pathogens. **Plant Disease**, St. Paul, v.78, p.1129-1138, 1994.
22. Tateishi, N.Y.; Della Vecchia, P.T.; Reifschneider, F.J.B. *Pythium* sp., um patógeno da alface em São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.10, n.2, p.235, 1985. (Resumo).
23. Thinggaard, K.; Middelboe, A.L. *Phytophthora* and *Pythium* in pot plant cultures grown on ebb and flow bench with recirculating nutrient solution. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.125, n.4, p.343-352, 1989.
24. Waterhouse, G. Key to *Pythium* Pringsheim. **Mycological Papers**, Kew, v.109, n.1, p.1-15, 1967.
25. Yuen, G.Y.; Xia, J.Q.; Sutula, C.L. A sensitive ELISA for *Pythium ultimum* using polyclonal and species-specific monoclonal antibodies. **Plant Disease**, St. Paul, v.82, n.9, p.1029-1032, 1998.