



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE FLORESTAS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

**DANILO REIS GONÇALVES**

**UTILIZAÇÃO DE ISCAS BIOLÓGICAS PARA DETECÇÃO DE *Phytophthora* spp.  
EM CURSO D'ÁGUA**

Prof. Dr. Paulo Sérgio Torres Brioso  
Orientador

Seropédica - RJ  
Janeiro - 2014



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE FLORESTAS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

**DANILO REIS GONÇALVES**

**UTILIZAÇÃO DE ISCAS BIOLÓGICAS PARA DETECÇÃO DE *Phytophthora* spp.  
EM CURSO D'ÁGUA**

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Florestal, como requisito parcial para obtenção do Título de Engenheiro Florestal, Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Prof. Dr. Paulo Sérgio Torres Brioso  
Orientador

Seropédica, RJ  
Janeiro-2014

**UTILIZAÇÃO DE ISCAS BIOLÓGICAS PARA DETECÇÃO DE *Phytophthora* spp.  
EM CURSO D'ÁGUA**

**DANILO REIS GONÇALVES**

Comissão Examinadora

Monografia aprovada em 14 de Janeiro de 2014.

Prof. Dr. Paulo Sérgio Torres Brioso  
UFRRJ/IB/DEnF  
Orientador

Prof. Dr. Rogério Luiz da Silva  
UFRRJ/IF/DS  
Membro

Prof. PhD. Ricardo Luis Louro Berbara  
UFRRJ/IA/DS  
Membro

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por ter me dado condições para que eu chegasse até aqui.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, por ter me proporcionado o título de Engenheiro Florestal e por me possibilitar momentos de alegria e aprendizagem.

Ao Programa Ciência sem Fronteiras pela Bolsa de Graduação Sanduíche e ao Programa de Bolsas de Iniciação Científica pelas bolsas obtidas durante a graduação.

À meu orientador Professor Dr. Paulo Sérgio Torres Brioso pela orientação, pelos ensinamentos, paciência e pelos momentos de descontração vividos no Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário que com certeza ficarão gravados na minha mente.

À Professora Dra. Silvia Regina Goi que me possibilitou o primeiro contato com a pesquisa, pelos conselhos e disciplina ensinados durante a graduação.

À meu orientador e amigo na Universidade de Maryland, Dr. Yilmaz Balci pela orientação, amizade e apoio durante minha jornada nos Estados Unidos.

À todos que de alguma forma contribuíram para a confecção desse trabalho, Prof. Dr. Rogério Luiz da Silva, Dr. Ailton Reis, Hugo Thaner dos Santos e Bianca Ferreira da Silva.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite e pelas contribuições.

Aos meus pais, Valmir Prado Gonçalves e Gracineide Reis Gonçalves por sempre acreditarem e apoiarem minhas decisões.

As minhas irmãs, Marcela e Camila, pelo apoio e amizade.

Aos meus amigos durante minha jornada na Rural, Claire Vieira, Cléssio Gomes, Luís Vieira, Marcelly Silva, Raquel Santos e Pablo Vieira, pelos momentos de alegria, aprendizagem e amizade vividos durante a graduação.



## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar folhas de sete diferentes espécies florestais como iscas biológicas para isolamento de *Phytophthora* sp. em um córrego na cidade de College Park, MD, Estados Unidos. Também foi avaliado se estes microrganismos foram capazes de infectar iscas *in natura* e secas em estufa, além da capacidade de crescimento em meio de cultura contendo o fungicida himexazol. Foram realizados dois ensaios experimentais, sendo um no verão e outro no outono no ano de 2012. Folhas de sete espécies arbóreas foram coletadas, sendo que algumas foram secas em estufa a 60<sup>0</sup>C antes de serem utilizadas como isca. Após a coleta e preparação das iscas *in natura* e secas, estas foram organizadas em bolsas de coleta permeável sendo posteriormente depositadas no córrego. Após cinco dias no córrego, as bolsas foram coletadas sendo as folhas lavadas em água corrente. Posteriormente, sete seções foram cortadas de cada folha e depositadas em meio de cultura com e sem himexazol. Após 3 dias de crescimento, as colônias de *Phytophthora* sp. foram contabilizadas. As diferentes composições dos meios de cultura utilizados para isolamento não influenciaram nas taxas de crescimento de *Phytophthora* spp., sugerindo que os organismos isolados são tolerantes ao fungicida himexazol. Para algumas espécies, iscas *in natura* e secas em estufa resultaram em taxas de isolamento iguais, sugerindo que *Phytophthora* spp. também podem agir como saprófitas em ambientes aquáticos. *Pinus strobus* L. (White Pine) e *T. canadensis* L. (Hemlock), resultaram nas menores taxas de isolamento em ambos os períodos de coleta. *Acer rubrum* L. (Red Maple) e *Ulmus americana* L. (American Elm) foram as espécies que resultaram nas maiores taxas de isolamento.

**Palavras-chave:** patologia florestal, água, bioindicador.

## ABSTRACT

This work aimed to evaluate leaves of seven different forest species as baits to isolate *Phytophthora* sp. from a stream in College Park, MD, USA. Also, we evaluate if this microorganisms can infect baits *in natura* and dried, and if they can grow in media with and without the fungicide himexazol. The experiment had two sample periods, one during the summer and other during the fall in 2012. Leaves of seven different species were collected, and some of them was dried in an oven before use as baits. After collecting the leaves, they were placed in a mesh bag and then deployed in the stream. After five days, mesh bags including baits were collected and leaves were washed under tap water. Posteriorly, seven sections were chosen randomly and were cut of each leaf and placed on media with and without the fungicide hymexazol. After three days growing, the colonies of *Phytophthora* sp. were counted. The different compositions of the media used for isolation did not influenced the growing rates of *Phytophthora* sp. isolated, suggesting that the organisms isolated are tolerant to the hymexazol fungicide. For some species, *in natura* and dried baits resulted in the same isolation rates, suggesting that *Phytophthora* spp. from the stream sampled can act as saprophyte in aquatic ecosystems. *Pinus strobus* L. (White Pine) and *T. canadensis* L. (Hemlock) yielded the lower isolation rates during summer and fall. *Acer rubrum* L. (Red Maple) and *Ulmus americana* L. (American Elm) were the species that yielded the higher isolation rates in both sampling periods, and for *in natura* and dried baits.

**Keywords:** forest pathology, water, bioindicator.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE QUADROS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. O gênero <i>Phytophthora</i> .....	2
2.2. Utilização de iscas biológicas para isolamento de <i>Phytophthora</i> sp. ....	6
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
3.1. Área de estudo.....	7
3.2. Ensaio experimentais.....	7
3.3. Iscas biológicas e técnica de isolamento.....	8
3.4. Análise estatística.....	10
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	10
5. CONCLUSÃO.....	17
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Classificação dos fungos, pseudofungos e organismos plasmodiais publicada em 2008 (KIRK et al., 2008). (Fonte: MOREIRA & SCHOENLEIN-CRUSIUS, 2010).....2
- Figura 2. Zoosporângio: estrutura de reprodução assexuada de *Phytophthora* sp. (A e B). Liberação de zoósporos pelo zoosporângio (C e D).....3
- Figura 3. Diversidade de *Phytophthora* spp. em córregos no Alaska, Estados Unidos. Fonte: HANSEN et al. (2012).....4
- Figura 4. Sintomas em árvores de Coast Live Oak (*Quercus agrifolia* Née) em Marin County, CA, EUA (A). Sangria em birch (*Betula pendula*) causada por *P. ramorum* (B). Fonte: California Oak Mortality Task Force website.....5
- Figura 5. Localização da área de estudo.....7
- Figura 6. Folhas de diferentes espécies arbóreas utilizadas como isca: *P. strobus* L. (A); *T. canadensis* L. (B); *I. opaca* Aiton (C); *R. maximum* L. (D); *Q. rubra* L. (E); *A. rubrum* L. (F) e *U. americana* L. (G).....8
- Figura 7. Procedimentos realizados na coleta. Bolsa de coleta (A); Disposição da bolsa de coleta no córrego (B); Seções foliares dispostas no meio de cultura seletivo (C) e Colônias de *Phytophthora* spp. (D).....9
- Figura 8. Número de colônias de *Phytophthora* sp. isolados a partir das diferentes iscas biológicas no verão. Dados transformados em  $(x+1)^{1/2}$ . Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....11
- Figura 9. Número de colônias de *Phytophthora* sp. isolados a partir das diferentes iscas biológicas no outono. Dados transformados em  $(x+1)^{1/2}$ . Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....11
- Figura 10. Número de colônias de *Phytophthora* sp. isolados a partir de diferentes iscas *in natura* durante o verão. Dados transformados em  $(x+1)^{1/2}$ . Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....12
- Figura 11. Número de colônias de *Phytophthora* sp. isolados a partir de diferentes iscas secas em estufa durante o verão. Dados transformados em  $(x+1)^{1/2}$ . Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....13
- Figura 12. Número de colônias de *Phytophthora* sp. isolados a partir de diferentes iscas *in natura* durante o outono. Dados transformados em  $(x+1)^{1/2}$ . Médias seguidas de

letras diferentes diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	13
Figura 13. Número de colônias de <i>Phytophthora</i> sp. isolados a partir de diferentes iscas secas em estufa durante o outono. Dados transformados em $(x + 1)^{1/2}$ . Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	14
Figura 14. Iscas após cinco dias de deposição no córrego: Folhas <i>in natura</i> e desidratadas de <i>R. maximum</i> (Rhododendron) (A); Isca <i>in natura</i> de <i>A. rubrum</i> (Red Maple) (B). Isca desidratada de <i>U. americana</i> (Elm) aparentemente degradada (C).....	16
Figura 15. Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) da água registrada em cada uma das 8 semanas de coleta. A temperatura foi registrada no momento de retirada das iscas do córrego.....	17

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1. Análise de Variância de acordo com o esquema fatorial 7 x 2 x 2 para comparação de iscas biológicas utilizadas para isolamento de *Phytophthora* spp. em curso d'água em ensaio experimental realizado no verão.....10
- Quadro 2. Análise de Variância de acordo com o esquema fatorial 7 x 2 x 2 para comparação de iscas biológicas utilizadas para isolamento de *Phytophthora* spp. em curso d'água em ensaio experimental realizado no outono.....11
- Quadro 3. Análise de variância para estudo do efeito da espécie na presença de iscas *in natura* e iscas secas no ensaio experimental realizado no verão.....11
- Quadro 4. Análise de variância para estudo do efeito da espécie na presença de iscas *in natura* e iscas secas no ensaio experimental realizado no outono.....12
- Quadro 5. Análise de variância para estudo do efeito da condição da folha (*in natura* e seca) dentro de cada espécie no ensaio experimental realizado no verão.....12
- Quadro 6. Análise de variância para estudo do efeito da condição da folha (*in natura* e seca) dentro de cada espécie no ensaio experimental realizado no outono.....13

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fungicidas presentes no meio de cultura seletivo utilizado para isolamento de <i>Phytophthora</i> sp.....	9
---	---

## 1. INTRODUÇÃO

Os oomicetos formam um grupo diverso de microrganismos, sendo também chamados de fungos zoospóricos, com características semelhantes aos fungos. Variam desde saprófitas a patógenos de plantas, insetos, crustáceos, peixes, vertebrados e vários microrganismos (MARGULIS & SCHWARTZ, 2000).

Esses organismos apesar de apresentarem algumas semelhanças morfológicas com os fungos, são biologicamente distintos destes, pois apresentam parede celular composta de celulose, micélio diplóide na maior parte do ciclo de vida, presença de centríolos, produção de esporos biflagelados, diferenças nas sequências de DNA, entre outras características, sendo assim classificados no Reino *Straminipila* e Filo *Oomycota* (ALEXOPOULOS et al., 1996).

O gênero *Phytophthora* se destaca entre os oomicetos devido a sua grande importância como fitopatógenos em todo o mundo (ERWIN & RIBEIRO, 1996). Entre os patógenos de maior importância, destaca-se o oomiceto *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, causador da doença conhecida como mela, ou requeima, responsável por perdas significativas na produção de tomates e batatinha (GOMES, 2011). Este patógeno ficou mundialmente conhecido por causar a escassez alimentar na Irlanda no ano de 1845, devido a destruição de plantações de batata, resultando na fome e migração de grande parte da população irlandesa daquela época (TRENTIN, 2006).

*Phytophthora* spp. já foram relatados, causando requeima em seringueira, gomose em citros e também podridão parda em cacau (KURACHEK & MITCHELL, 2000; LUZ et al., 2001) e mais recentemente *Phytophthora ramorum* foi relatada como agente causal da morte súbita de *Quercus* spp. na Califórnia e Oregon, nos Estados Unidos (RIZZO et al., 2002).

Como organismos zoospóricos, *Phytophthora* spp. necessitam de água para disseminação de seus esporos, denominados zoósporos. Consequentemente, devido a essa necessidade, estes organismos estão presentes em grandes quantidades em ambientes aquáticos, tornando esses locais verdadeiros reservatórios de esporos.

Para estudos de diversidade e flutuação populacional de microrganismos presentes em ambientes aquáticos se faz necessário à utilização de estratégias de isolamento desses microrganismos. A utilização de iscas biológicas, portanto, se torna essencial sendo a eficiência do método utilizado preponderante para a obtenção de resultados coerentes e confiáveis. Segundo TSAO (1983) uma grande variedade de folhas pode ser utilizadas como isca para isolamento, porém nem todos os tipos são igualmente atrativas devido a diversidade de *Phytophthora* spp.

Diversas espécies tem sido citadas como isca para isolamento de *Phytophthora* spp. de córregos, sendo que dentre estas se destacam as folhas de *Rhododendron* spp. e *Quercus* spp. (MARTIN et al. 2012).

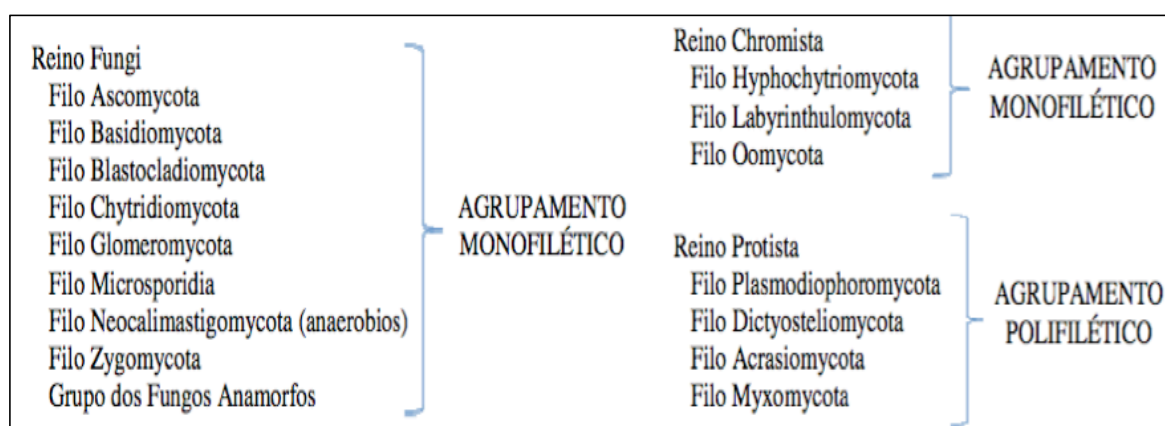
Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar a eficiência de folhas de sete espécies florestais como isca biológica para isolamento de *Phytophthora* em um córrego no Estado de Maryland, Estados Unidos. Além disso, avaliou-se se estes microrganismos são capazes de infectar iscas *in natura* e secas em estufa, bem como, se podem se desenvolver em meio de cultura contendo o fungicida himexazol.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O gênero *Phytophthora*

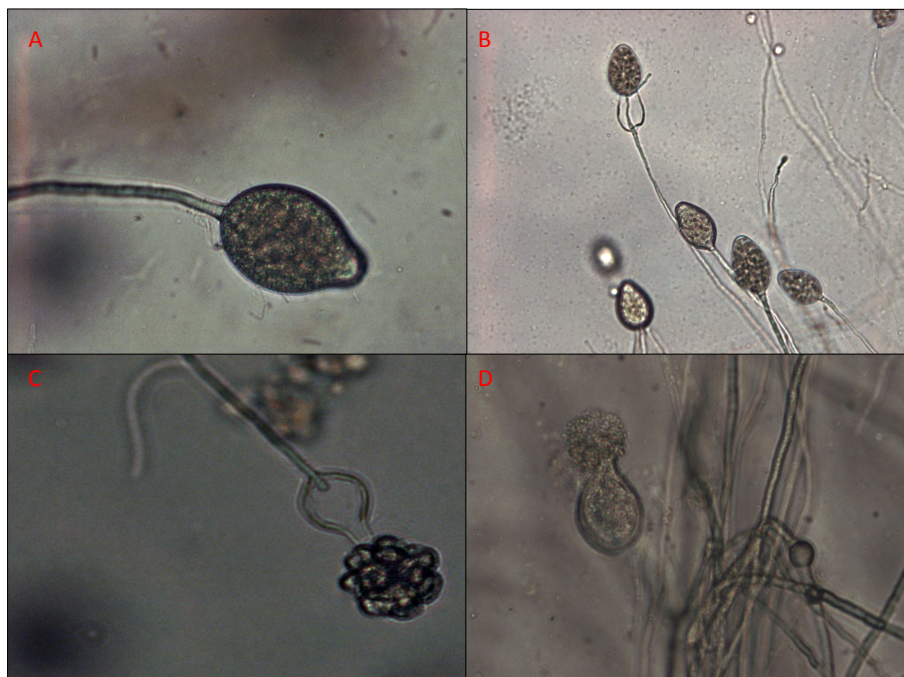
O gênero *Phytophthora* atualmente é classificado no Reino *Straminipila* (ou Chromista), Filo *Oomycota*, Classe *Oomycetes*, Subclasse *Peronosporomycetidae*, Ordem *Pythiales* e Família *Pythiaceae* (Figura 1). As espécies pertencentes a este gênero são conhecidas como pseudofungos por possuírem características que os distinguem dos fungos verdadeiros como parede celular composta de celulose, micélio diplóide na maior parte do ciclo de vida, presença de centríolos, produção de esporos biflagelados tendo pêlos em um dos flagelos, diferenças nas seqüências de DNA, entre outras. Apesar disso, a semelhança com os fungos verdadeiros se deve principalmente ao crescimento filamentosos e por se reproduzirem através de esporos assexuais e sexuais (ALEXOPOULOS et al., 1996; SCHUMANN et al., 2006).



**Figura 1:** Classificação dos fungos, pseudofungos e organismos plasmodiais publicada em 2008. KIRK et al. (2008). (Fonte: MOREIRA & SCHOENLEIN-CRUSIUS, 2010).

Os organismos deste gênero, caracterizam-se em termos biológicos por possuírem micélio cenocítico (alguns septos podem estar presentes em culturas mais velhas), as hifas são hialinas podendo ter uma aparência lisa, nodosa ou botriosa e as ramificações laterais apresentam geralmente uma constrição na base (GOUVEIA, 2004; MARTINS, 2010).

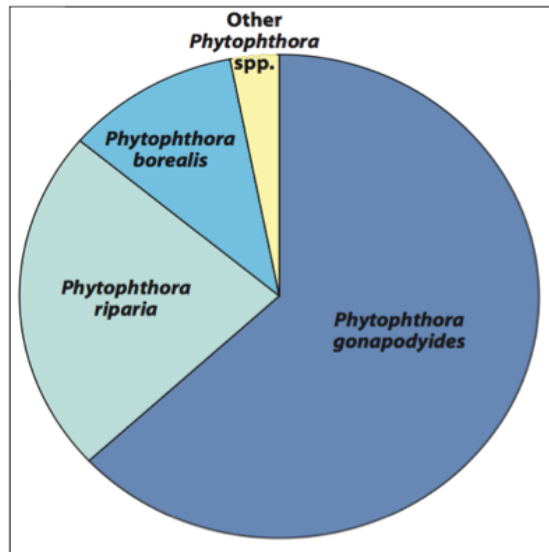
A maioria das espécies de oomicetos, incluindo o gênero *Phytophthora*, podem se reproduzir sexuadamente ou assexuadamente. A reprodução sexuada é oogâmica e envolve um oogônio que contém de uma até muitas oosferas e um anterídio contendo núcleos masculinos. A fecundação resulta na formação de um zigoto com parede espessa, o oósporo, que funciona como um esporo de resistência. A reprodução assexuada é feita por zoósporos que tem dois flagelos, um penado e outro liso (RAVEN, 2007). Estes zoósporos são produzidos em estruturas assexuadas de reprodução denominadas zoosporângios (Figura 2).



**Figura 2:** Zoosporângio: estrutura de reprodução assexuada de *Phytophthora* sp. (A e B). Liberação de zoósporos pelo zoosporângio (C e D). Fonte: Autor.

Devido a uma crescente atenção dada ao gênero *Phytophthora* na última década em consequência do impacto ecológico e econômico causado por várias espécies invasivas como *P. ramorum*, *P. kernoviae* e *P. alni*, o número de espécies pertencentes a este gênero tem crescido ultimamente. Parte disso é consequência de pesquisas e levantamentos feitos em ecossistemas historicamente nunca explorados, como ecossistemas florestais e aquáticos (MARTIN et al., 2012). ERSEK & RIBEIRO (2010) recentemente atualizaram a lista de espécies descritas para cem espécies, porém recentemente novas espécies tem sido descritas.

*Phytophthora* spp. são relativamente abundantes em córregos presentes em ecossistemas florestais. Este fato pode ser devido ao fato de a água ser considerada um centro de reserva e dispersão de zoósporos, e não necessariamente o habitat destes microrganismos (REESER et al., 2011). As espécies de *Phytophthora* presentes em córregos são patógenos oportunistas, sendo, na maioria das vezes encontrados em situações ecológicas onde não causam doenças nas vegetações ao redor destes ambientes. Em alguns estudos (HWANG et al., 2008; REESER et al. 2011;) de diversidade de *Phytophthora* spp. em córregos nos Estados Unidos, *P. gonapodyides* foi a espécie mais frequente (Figura 3), entretanto não se sabe o porquê *P. gonapodyides* está tão bem adaptada nestes ambientes (HANSEN et al., 2012)



**Figura 3:** Diversidade de *Phytophthora* spp. em córregos no Alaska, Estados Unidos. Fonte: HANSEN et al. (2012).

Segundo RAVEN (2007) a espécie mais conhecida do gênero *Phytophthora* é *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary. *P. infestans* é responsável pela requeima da batata, que ocasionou a quase total falta de batatas em 1846-1847 na Irlanda. A população da Irlanda, que se elevou de 4,5 milhões de habitantes em 1800 para cerca de 8,5 milhões em 1845, decresceu, como resultado dessa escassez, para 6,5 milhões de habitantes em 1851. Ao redor de 800 mil pessoas morreram de fome e um grande número emigrou, principalmente para os Estados Unidos. A produção inteira de batata irlandesa foi virtualmente destruída numa única semana do verão de 1846. Isto foi um desastre para os camponeses irlandeses, que dependiam quase que inteiramente da batata para sua alimentação, cada adulto consumindo entre 4 a 6 Kg por dia.

No Brasil, diversas são as culturas agrônomicas e florestais que podem ser afetadas por este oomiceto. Dentre as principais doenças causadas por *Phytophthora* spp. em culturas florestais destacam-se: podridão-parda do cacauieiro, requeima e queda das folhas em seringueira e a gomose do citros.

Segundo OLIVEIRA et al. (2005), são três as espécies de *Phytophthora* que causam a podridão-parda do cacauieiro no Brasil: *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler, *Phytophthora capsici* Leonian., e *Phytophthora citrophthora* (Smith & Smith) Leonian. A podridão-parda é a mais importante doença do cacauieiro em termos mundiais sendo que no Brasil, as perdas de frutos com podridão-parda em cacau variam de ano para ano e podem reduzir a produção em até 80% (LUZ et al., 2001).

De acordo com ALVARENGA & CARMO (2008), as espécies *Phytophthora capsici* Leonian, *P. palmivora* Butler e *P. citrophthora* (Smith & Smith) Leonian são os responsáveis pela requeima e queda das folhas em seringueira, podendo ocorrer em todos os órgãos da seringueira, causando requeima, queda anormal das folhas, podridão dos frutos, cancras em painéis de sangria e cancro basal do enxerto em mudas de viveiros. Este grupo de doenças tem grande importância no Brasil, principalmente no sudeste da Bahia, onde ocorre na forma de requeima e queda anormal das folhas, causando grandes prejuízos em seringais com enxertia de copa com híbridos de *Hevea benthamiana*. Os sintomas de requeima são observados nas fases de viveiro, jardim clonal e plantio definitivo, atingindo folhas, inflorescências e frutos.

A gomose de *Phytophthora*, uma das mais antigas doenças dos citros, ocorre no Brasil há mais de cem anos. As espécies *Phytophthora parasitica* Dastur e *P. citrophthora* (R. e E. Sm.) Leonian são as principais causadoras da doença. *P. parasitica* ataca mais de quatrocentos hospedeiros e *P. citrophthora*, mais de oitenta (ERWIN & RIBEIRO, 1996). No Brasil, *P. parasitica* ocorre em mais de 90% dos casos de viveiros e pomares de citros atingidos pela doença. Os principais sintomas da gomose no campo são o escurecimento e morte da casca e do lenho, exsudação de goma, seca e fendilhamento da casca, podridão do pé e das raízes, amarelecimento e queda de folhas, baixo desenvolvimento, murcha, queda de folhas e morte da planta (SIVIERO et al., 2002).

Nos Estados Unidos, o gênero *Phytophthora* ficou conhecido mundialmente como o responsável pela doença denominada “Sudden Oak Death”, ou morte súbita do carvalho. Desde a década de noventa, *Phytophthora ramorum* (agente causal da morte súbita do carvalho) tem destruído milhões de árvores de carvalho, principalmente as espécies *Quercus agrifolia* Née (Coast Live Oak), *Quercus Kelloggii* Newb. (California Black Oak), *Quercus parvula* E. Greene (Shreve Oak) e *Quercus chrysolepis* Liebm (Canyon Live Oak), além de causar doenças foliares em diversas outras espécies (Figura 4). Apesar do primeiro registro da presença de *P. ramorum* infectando plantas de rododendron (*Rhododendron maximum* L.) ter sido identificado em 2001 em Santa Cruz, Califórnia, os viveiros florestais industriais nos Estados Unidos não foram largamente afetados até o ano de 2004, quando um grande número de viveiros enviaram acidentalmente mais de um milhão de plantas de rododendron e camélia potencialmente infectadas para diversos estados. Após isso, o patógeno foi detectado em 176 viveiros em 21 diferentes estados (CALIFORNIA OAK MORTALITY TASK FORCE, 2013).



**Figura 4:** (A) Sintomas em árvores de Coast Live Oak (*Quercus agrifolia* Née) em Marin County, CA, EUA. (B) Sangria em birch (*Betula pendula*) causada por *P. ramorum*. Fonte: California Oak Mortality Task Force website, 2013.

O patógeno *P. ramorum* também foi descoberto em viveiros na Europa na década de noventa e desde sua descoberta, tem se espalhado por todo o continente, mais notadamente no Reino Unido, onde *Larix kaempferi* (syn. *L. leptolepis*) mais conhecida como japanese larch, está sendo destruída em altos índices (CALIFORNIA OAK MORTALITY TASK FORCE, 2013).



## 2.2 Utilização de Iscas Biológicas para isolamento de *Phytophthora* sp.

Para se conhecer a diversidade de *Phytophthora* spp. presente em um determinado local, bem como conhecer o estado sanitário de poços artesianos ou açudes de onde se utiliza água para irrigação, por exemplo, são necessários métodos de detecção e isolamento desses microrganismos.

Além disso, com a devastação causada por duas espécies exóticas de *Phytophthora*, *P. alni* e *P. ramorum* na Europa e na costa oeste dos Estados Unidos, elevou-se a importância da detecção destes microrganismos e de outras *Phytophthora* spp. em plantas, solos e ambientes aquáticos, se fazendo necessário a utilização de iscas biológicas. Levantamentos e monitoramento de *Phytophthora* spp. em córregos tem se popularizado pelo mundo, particularmente em regiões onde a detecção precoce de áreas infestadas é importante para o sucesso de medidas de erradicação. Nos estados de Oregon, Washington e Califórnia, o USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos), conduz levantamentos anuais de *Phytophthora* spp. de solos e córregos para verificar a presença de *P. ramorum* em ecossistemas nativos (HUBERLI et al., 2013).

A maioria dos métodos de biodetecção da presença de *Phytophthora* spp. em ambientes aquáticos se baseiam na patogenicidade seletiva das espécies de *Phytophthora* para o tecido utilizado como armadilha biológica (ECKERT & TSAO, 1962) e os meios de cultura seletivos permitem o isolamento e o crescimento das espécies de *Phytophthora* (TSAO, 1990; GOUVEIA et al., 2009). As técnicas de biodetecção utilizam determinados órgãos de plantas suscetíveis, ou mesmo toda a planta, como meio privilegiado de desenvolvimento dos propágulos de resistência dos parasitas (SHEW et al., 1979; ERWIN & RIBEIRO, 1996). A eficiência destas técnicas dependem em grande medida da suscetibilidade do material utilizado como armadilha, do desenvolvimento de sintomas característicos nesses tecidos vegetais e das condições de incubação que maximizem as hipóteses de formação e libertação dos zoósporos, os propágulos primários no processo de infecção (GOUVEIA et al., 2009).

GOUVEIA et al. (2009) descreve que para a detecção de *Phytophthora cinnamomi*, por exemplo, uma espécie com capacidade de causar infecção em muitas espécies vegetais e invadir ecossistemas, estão descritos um elevado número de protocolos utilizando os mais variados tecidos vegetais como radículas de tremoço (*Lupinus angustifolius* L.), cotilédones de eucalipto, frutos como o abacate, maçãs e peras, assim como discos de folhas de abacateiro, azaléa e ananás. GRESLEBIN et al. (2005) estudando a diversidade de espécies de *Phytophthora* em córregos e rios localizados em florestas dominadas por *Austrocedrus chilensis* (D. Don) Pic. Serm. & Bizzarri, na Patagonia, Argentina, utilizaram maçãs e peras como iscas para isolamento do microrganismo. Tanto peras quanto maçãs resultaram em altas taxas de isolamento, entretanto não foi feita nenhuma comparação quanto a eficiência dos dois diferentes tipos de iscas. Segundo MARTIN et al. (2012), folhas são a melhor alternativa de isca biológica para isolamento de *Phytophthora* spp. de ambientes aquáticos.

Para estudos de monitoramento da presença de *P. ramorum* em florestas de tanoak (*Lithocarpus densiflorus* (Hook. & Arn.) Rehder) no estado de Oregon, nos Estados Unidos, SUTTON et al. (2009) fizeram um monitoramento dos córregos presentes na área durante o ano de 2008. Folhas de rododendron (*Rhododendron macrophyllum* D.) e tanoak (*L. densiflorus*) foram as iscas utilizadas sendo que *P. ramorum* foi regularmente isolado a partir dos dois tipos de iscas, porém não foi feita nenhuma comparação quantitativa quanto a eficiência das diferentes folhas como isca para o isolamento.

PEREIRA (2008) estudando a diversidade de *Phytophthora* spp. e outros oomicetos em água utilizada para irrigação no estado do Piauí, descreve a metodologia modificada de

MILANEZ (1970) de isolamento por iscagem múltipla. Amostras de água do local de interesse são coletadas e em laboratório estas amostras são colocadas em placas de petri esterilizadas. Posteriormente coloca-se nas placas de petri iscas constituídas de substratos celulósicos: sementes de sorgo, palha de milho clarificada, papel de filtro, celofane e epiderme de bulbo de cebola, além de outras iscas constituídas de substratos queratinosos e quitinosos. Após a montagem das placas de petri, as amostras devem ser incubadas a temperatura ambiente (25-32<sup>0</sup>C). A partir do terceiro dia de incubação as iscas passam a ser examinadas diariamente, a lupa e em microscópio ótico, para a observação da colonização e produção das estruturas características dos straminipilas. Os substratos colonizados são então transferidos para novas placas de petri, contendo água destilada esterilizada e novas iscas, para a incubação e desenvolvimento do isolado obtido.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Área de Estudo

As coletas foram realizadas na cidade de College Park, estado de Maryland, Estados Unidos. Foi selecionado um córrego no *Campus* da University of Maryland (UMD), localizado nas seguintes coordenadas geográficas: N 38°59'36" e W 76°56'28".



**Figura 5:** Localização do curso d'água no estado de Maryland (EUA) onde foi realizado o estudo.

#### 3.2. Ensaios Experimentais

Foram realizados dois ensaios experimentais no ano de 2012 delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial de 7 x 2 x 2, ou seja, sete espécies florestais, dois tipos de folhas (folhas *in natura* e seca em estufa) e dois tipos de meio de cultura (presença/ausência de himexazol). O primeiro ensaio foi executado no verão entre 13/08 a 17/09. O segundo ensaio foi realizado no outono no período de 12/10 a 16/11. Em cada estação foram realizadas quatro coletas.

As iscas eram folhas de sete espécies arbóreas (Figura 6) presentes no *Campus* da UMD. As espécies selecionadas foram as mais representativas e presentes no *Campus*, incluindo *Acer rubrum* L. (Red maple), *Quercus rubra* L. (Red oak), *Ulmus americana* L.

(American elm), *Rhododendron maximum* L. (Rododendron), *Ilex opaca* Aiton (American holly), *Pinus strobus* L. (White pine) e *Tsuga canadensis* (L.) Carriere (Eastern hemlock).



**Figura 6:** Folhas de diferentes espécies arbóreas utilizadas como isca: (A) *P. strobus* L.; (B) *T. canadensis* L.; (C) *I. opaca* Aiton; (D) *R. maximum* L.; (E) *Q. rubra* L.; (F) *A. rubrum* L. e (G) *U. americana* L.

### 3.3. Iscas biológicas e técnica de isolamento

Para cada espécie, quatro folhas foram utilizadas *in natura* e outras quatro foram secas em estufa sem ventilação forçada a 60<sup>0</sup>C por 24 horas. A amostragem foi feita em uma bolsa de coleta (0,20 x 0,40 m) de material permeável (Figura 7A). A bolsa foi dividida em quatro seções, sendo uma folha colocada em cada seção conforme OAK & TRACK (2006). Logo para cada espécie, foi utilizada duas bolsas, uma com quatro folhas *in natura* e outra com quatro folhas secas.

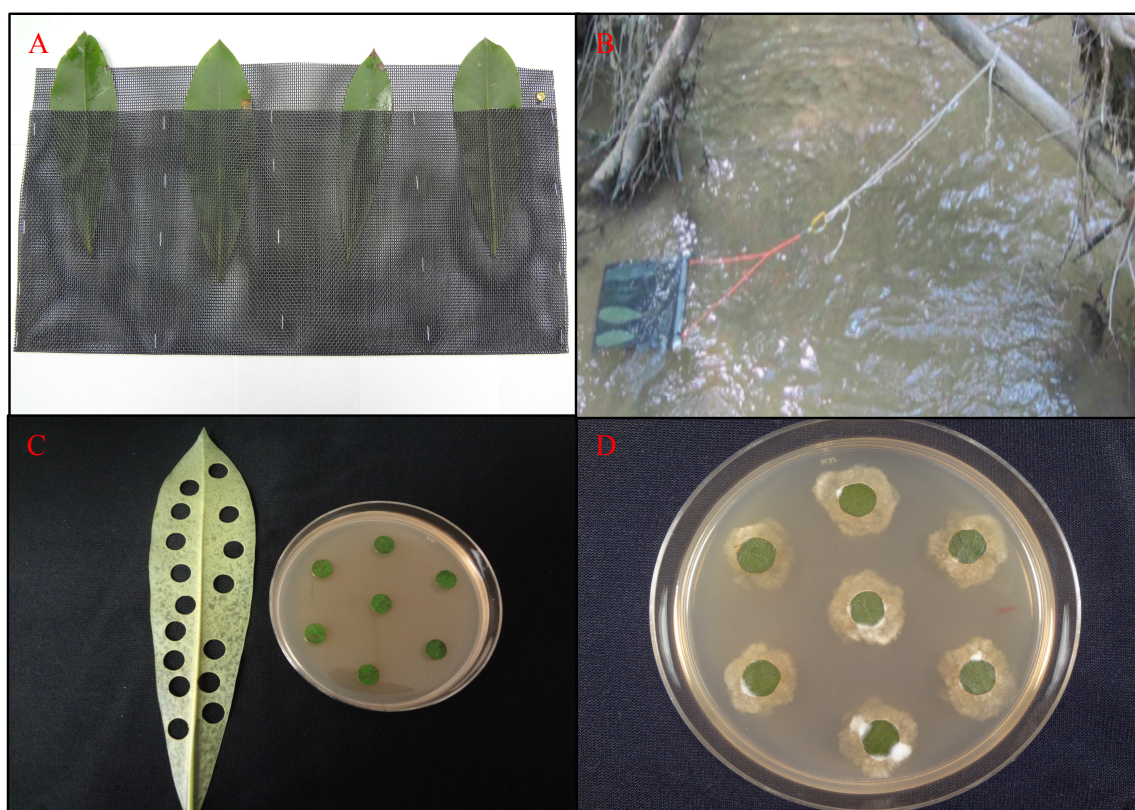
Durante cada semana de coleta, as bolsas contendo as iscas foram depositadas no córrego sempre as segundas-feiras e retiradas nas sextas-feiras (Figura 7B). Após o período de imersão, as iscas foram coletadas e transportadas em uma caixa térmica para o Laboratório de Patologia Florestal da UMD para serem analisadas. No momento da coleta, foi registrada a temperatura da água do córrego.

Antes do isolamento em meio de cultura, as folhas foram lavadas em água potável para remoção da matéria orgânica presente no limbo e verificação da presença de áreas necróticas. Aleatoriamente, sete seções foram cortadas em áreas infectadas utilizando-se estilete cirúrgico e foram secas em papel toalha para posteriormente serem transferidas para placas de petri contendo o meio de cultura seletivo (Figura 7C) composto por fungicidas descritos na Tabela 1.



**Tabela 1:** Composição dos meios de cultura seletivos utilizados para isolamento de *Phytophthora* spp.

<i>Fungicida</i>	<i>Meio seletivo 1</i>	<i>Meio seletivo 2</i>
	<i>Quantidade (g L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Quantidade (g L<sup>-1</sup>)</i>
Pimaricina	10	10
Ampicilina	200	200
Rifampicina	10	10
PCNB	25	25
Nistatina	50	50
Himexazol	50	-



**Figura 7:** Procedimentos realizados para avaliação. (A) Bolsa de coleta; (B) Disposição da bolsa de coleta no córrego; (C) Seções foliares dispostas no meio de cultura seletivo e (D) Colônias de *Phytophthora* spp.

Para as espécies perenifólias e decíduas, as sete seções foliares foram obtidas de uma única folha. No caso das coníferas, sete acículas foram selecionadas aleatoriamente e de cada acícula foi obtida uma seção que apresentasse área necrótica. Para cada espécie, o isolamento foi reaplicado oito vezes para as folhas *in natura* e secas.

O isolamento de *Phytophthora* sp., foi feito em meio de cultura seletivo denominados V8 JUICE AGAR - PARPN e V8 JUICE AGAR - PARPNH. Após o isolamento, as placas foram mantidas em 20 °C por 3 dias e posteriormente seguiu-se a contabilização das colônias conforme BALCI et al. (2007).



### 3.4. Análise Estatística

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) em fatorial composto por sete espécies vegetais, dois tipos de folhas e dois tipos de meio de cultura. Posteriormente aplicou-se o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade para comparação das médias das iscas biológicas, tipos de folha e meio de cultura seletivo conforme BANZATTO & KRONKA (1995).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ensaio experimental realizado no verão foi observado por meio da ANOVA que o fator espécie ( $p < 0,001$ ) e a interação espécie/condição da folha ( $p < 0,001$ ) apresentaram diferenças significativas (Quadro 1). No outono, foi observado que o fator espécie ( $p < 0,001$ ) e condição da folha ( $p = 0,0155$ ), juntamente com a interação espécie/condição da folha ( $p < 0,001$ ) também resultaram em diferenças significativas (Quadro 2). Como a interação entre as espécies e a condição da folha também foi significativa, não se pode tirar conclusões para os efeitos principais e independentes de espécie e condição da isca (*in natura* ou seca em estufa), pois estes são dependentes. Logo, procedeu-se os desdobramentos das interações.

**Quadro 1:** Análise de Variância de acordo com o esquema fatorial  $7 \times 2 \times 2$  para comparação de iscas biológicas utilizadas para isolamento de *Phytophthora* spp. em curso d'água em ensaio experimental realizado no verão.

Tabela de Análise de Variância					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ESPECIE	6	87.820596	14.636766	111.222	0.0000
VIVAOMORT	1	0.044914	0.044914	0.341	0.5594
FUNGICIDA	1	0.265765	0.265765	2.019	0.1560
ESPECIE*VIVAOMORT*F	6	0.355577	0.059263	0.450	0.8447
ESPECIE*VIVAOMORT	6	6.434001	1.072334	8.148	0.0000
ESPECIE*FUNGICIDA	6	0.490814	0.081802	0.622	0.7131
VIVAOMORT*FUNGICIDA	1	0.002737	0.002737	0.021	0.8854
erro	420	55.271864	0.131600		
Total corrigido	447	150.686267			
CV (%) =	15.22				
Média geral:	2.3835905		Número de observações:	448	

**Quadro 2:** Análise de Variância de acordo com o esquema fatorial 7 x 2 x 2 para comparação de iscas biológicas utilizadas para isolamento de *Phytophthora* spp. em curso d'água em ensaio experimental realizado no outono.

Tabela de Análise de Variância					
FV		GL	SQ	QM	Fc Pr>Fc
ESPECIE		6	97.946348	16.324391	117.411 0.0000
VIVAOMORT		1	0.821551	0.821551	5.909 0.0155
FUNGICIDA		1	0.502560	0.502560	3.615 0.0580
ESPECIE*VIVAOMORT*F		6	0.195756	0.032626	0.235 0.9651
ESPECIE*VIVAOMORT		6	5.317618	0.886270	6.374 0.0000
ESPECIE*FUNGICIDA		6	0.732501	0.122084	0.878 0.5109
VIVAOMORT*FUNGICIDA		1	0.000248	0.000248	0.002 0.9664
erro		420	58.395125	0.139036	
Total corrigido		447	163.911707		
CV (%) =		15.72			
Média geral:		2.3726907	Número de observações:	448	

Após os desdobramentos do fator espécie dentro de cada nível de condição da folha (*in natura* e seca), pode-se perceber que tanto no ensaio experimental realizado no verão (Quadro 3) quanto no ensaio realizado no outono (Quadro 4) houve diferenças entre as espécies utilizadas dentro de cada tipo de isca (*in natura* e secas).

**Quadro 3:** Análise de variância para estudo do efeito da espécie na presença de iscas *in natura* e iscas secas no ensaio experimental realizado no verão.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV		GL	SQ	QM	Fc Pr>Fc
ESPECIE	seca	6	60.774700	10.129117	76.969 0.0000
ESPECIE	natu	6	33.479898	5.579983	42.401 0.0000
Erro		420	55.271864	0.131600	

**Quadro 4:** Análise de variância para estudo do efeito da espécie na presença de iscas *in natura* e iscas secas no ensaio experimental realizado no outono.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA						
FV		GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ESPECIE	seca	6	34.131539	5.688590	40.915	0.0000
ESPECIE	natu	6	69.132427	11.522071	82.871	0.0000
Erro		420	58.395125	0.139036		

Procedeu-se o desdobramento do fator condição da isca (*in natura* e seca) dentro de cada nível de espécie. Estes desdobramentos podem ser observados no Quadro 5 para o ensaio experimental realizado no verão e no Quadro 6 para o ensaio experimental realizado no outono. A partir dessa análise foi possível perceber que para algumas espécies, como por exemplo *Acer rubrum*, não houve diferença entre as taxas de colonização em iscas *in natura* e secas, tanto no verão quanto no outono.

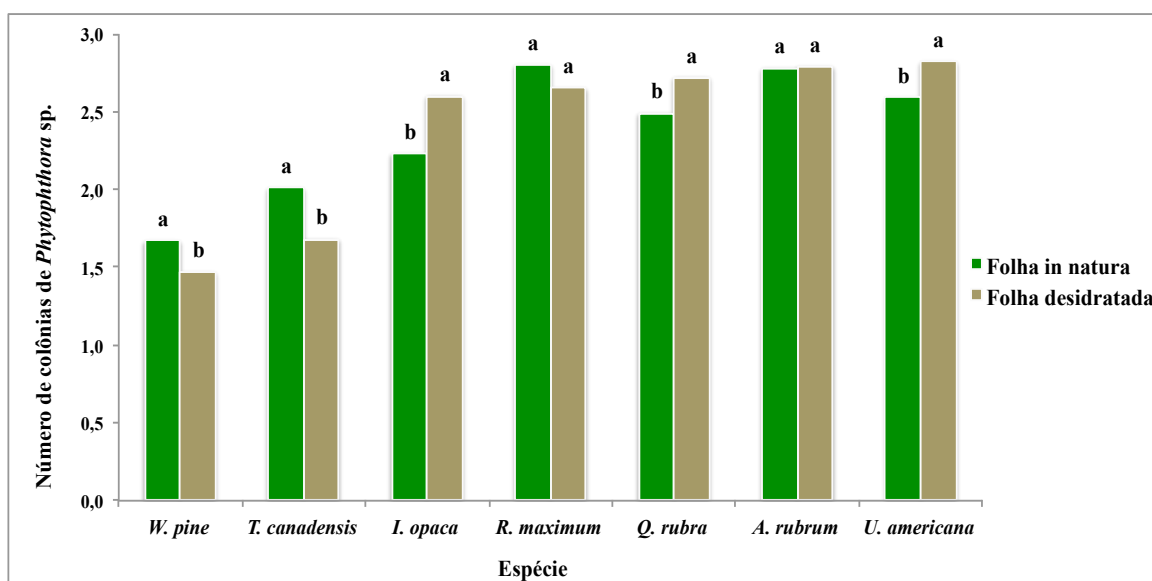
**Quadro 5:** Análise de variância para estudo do efeito da condição da folha (*in natura* e seca) dentro de cada espécie no ensaio experimental realizado no verão.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA						
FV		GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VIVAUMORT	/1	1	0.636652	0.636652	4.838	0.0284
VIVAUMORT	/2	1	1.760329	1.760329	13.376	0.0003
VIVAUMORT	/3	1	2.083050	2.083050	15.829	0.0001
VIVAUMORT	/4	1	0.374070	0.374070	2.842	0.0925
VIVAUMORT	/5	1	0.805082	0.805082	6.118	0.0138
VIVAUMORT	/6	1	0.002767	0.002767	0.021	0.8848
VIVAUMORT	/7	1	0.816966	0.816966	6.208	0.0131
Erro		420	55.271864	0.131600		

**Quadro 6:** Análise de variância para estudo do efeito da condição da folha (*in natura* e seca) dentro de cada espécie no ensaio experimental realizado no outono.

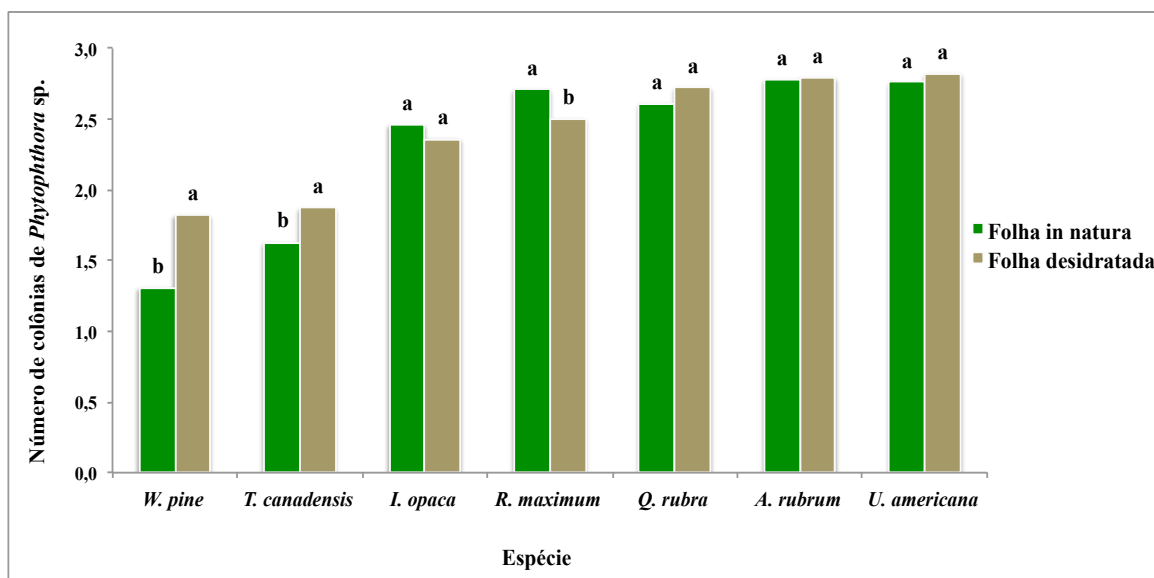
TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA						
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc	
VIVAUMORT	/1	1	4.175177	4.175177	30.029	0.0000
VIVAUMORT	/2	1	0.849087	0.849087	6.107	0.0139
VIVAUMORT	/3	1	0.175544	0.175544	1.263	0.2618
VIVAUMORT	/4	1	0.698187	0.698187	5.022	0.0256
VIVAUMORT	/5	1	0.184424	0.184424	1.326	0.2501
VIVAUMORT	/6	1	0.000447	0.000447	0.003	0.9548
VIVAUMORT	/7	1	0.056303	0.056303	0.405	0.5249
Erro		420	58.395125	0.139036		

Após os desdobramentos das interações entre espécie e condição da isca, tanto no verão quanto no outono, procedeu-se o Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) para comparação das médias. Especificamente para as coletas realizadas durante o verão, observou-se através do Teste de Tukey que, para as espécies *W. pine* e *T. canadensis* as maiores taxas de isolamento foram a partir de folhas *in natura*. Por outro lado, as espécies *I. opaca*, *Q. rubra* e *U. americana* apresentaram maiores taxas de isolamento a partir de iscas desidratadas. Já as espécies *R. maximum* e *A. rubrum*, não apresentaram diferenças significativas entre as iscas *in natura* e secas (Figura 8).



**Figura 8:** Número de colônias de *Phytophthora* sp. isolados a partir das diferentes iscas biológicas no verão. Dados transformados em  $(x+1)^{1/2}$ . Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Diferentemente das coletas realizadas no verão, os resultados encontrados durante as coletas no outono mostram que para as espécies *U. americana*, *A. rubrum*, *Q. rubra* e *I. opaca* não houve diferenças significativas entre iscas *in natura* ou seca. Além disso, diferentemente do que foi encontrado durante as coletas no verão, as coníferas *W. pine* e *T. canadensis* resultaram em maiores taxas de isolamento a partir de folhas desidratadas. Para *R. maximum*, houve uma diferença significativa entre iscas durante as coletas na estação outono, sendo que iscas *in natura* resultaram em maiores taxas de isolamento (Figura 9).



**Figura 9:** Número de colônias de *Phytophthora* sp. isolados a partir das diferentes iscas biológicas no outono. Dados transformados em  $(x+1)^{1/2}$ . Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Sabe-se que algumas espécies de *Phytophthora* são saprófitas de solo, como *P. cinamommi*, onde a sua fase saprofítica pode levar a um aumento da população do patógeno (MARTINS, 2010). Além de *P. cinamommi*, HANSEN et al. (2012) citam *P. pinifolia* como uma espécie de *Phytophthora* mais conhecida por sua atividade saprofítica do que fitopatogênica.

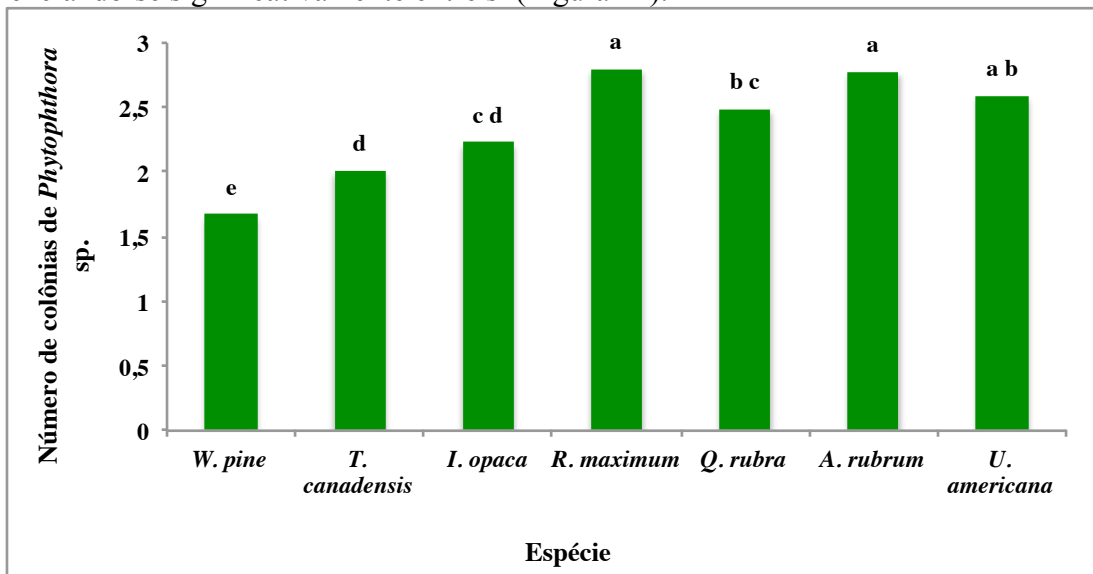
Entretanto, *Phytophthora* spp. na sua maioria tem sua capacidade saprofítica limitada, o que significa que apresentam baixo crescimento e baixa capacidade competitiva em relação a presença de outros microrganismos (CAHILL, 1993). A grande variação entre as taxas de infecção de *Phytophthora* spp. entre as iscas *in natura* e desidratadas mostra que a capacidade saprofítica desses microrganismos pode variar a partir das condições impostas, sejam estas relacionadas a fatores abióticos ou aos diferentes substratos disponíveis para infecção.

MARANO et al. (2011) estudando o papel no processo de decomposição de diferentes grupos de microrganismos associados a folhas submersas em córregos, na Argentina, relata que *Phytophthora* spp. foram registradas em folhas de diferentes espécies em processo de decomposição. Entretanto, *Phytophthora* spp., foram isoladas quase que exclusivamente de folhas em estágio inicial de decomposição.

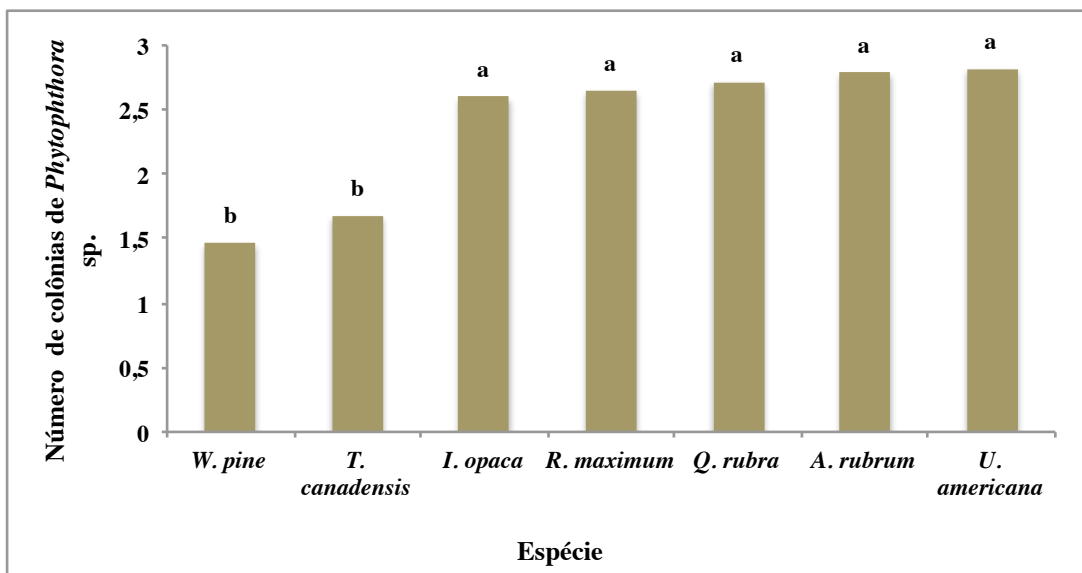
Apesar de estudos citarem que o gênero *Phytophthora* apresenta baixa capacidade saprofítica, este trabalho mostra que estes microrganismos podem se comportar eficientemente durante sua fase saprofítica.

Das iscas *in natura* depositadas no córrego durante a estação verão, percebe-se que as espécies *R. maximum*, *A. rubrum* e *U. americana* foram as que apresentaram as maiores taxas

de isolamento, não apresentando diferenças significativas entre si (Figura 10). No mesmo período, quando utilizou-se iscas secas em estufa, *U. americana*, *A. rubrum*, *Q. rubra*, *R. maximum* e *I. opaca* foram as iscas que apresentaram maiores taxas de isolamento, não diferenciando-se significativamente entre si (Figura 11).



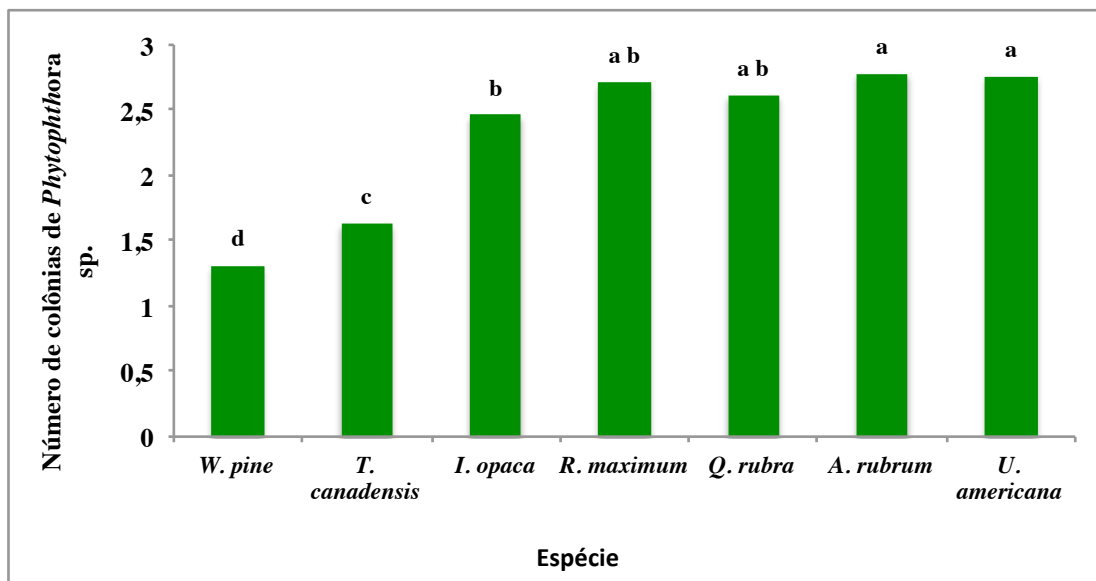
**Figura 10:** Número de colônias de *Phytophthora* sp. isolados a partir de diferentes iscas *in natura* durante o verão. Dados transformados em  $(x+1)^{1/2}$ . Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



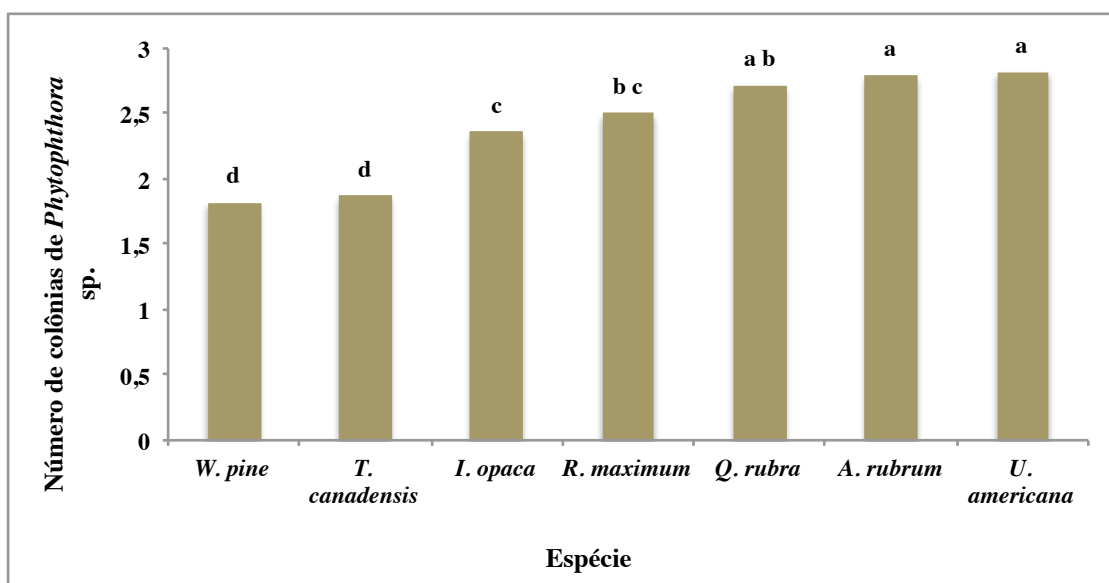
**Figura 11:** Número de colônias de *Phytophthora* sp. isolados a partir de diferentes iscas secas em estufa durante o verão. Dados transformados em  $(x+1)^{1/2}$ . Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Analisando separadamente as diferentes iscas *in natura* depositadas no córrego durante o outono, percebe-se que o comportamento é basicamente parecido com o encontrado nas coletas anteriores, sendo as espécies *R. maximum*, *Q. rubra*, *A. rubrum* e *U. americana* as

que apresentaram as maiores taxas de isolamento (Figura 12). Para as iscas secas em estufa, *U. americana*, *A. rubrum* e *Q. rubra* foram as que resultaram em maiores taxas de isolamento, não diferenciando significativamente entre si (Figura 13).



**Figura 12:** Número de colônias de *Phytophthora* sp. isolados a partir de diferentes iscas *in natura* durante o outono. Dados transformados em  $(x+1)^{1/2}$ . Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Figura 13:** Número de colônias de *Phytophthora* sp. isolados a partir de diferentes iscas secas em estufa durante o outono. Dados transformados em  $(x+1)^{1/2}$ . Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Em ambos os períodos de coleta, as espécies *W. pine* e *T. canadensis* (ambas coníferas) foram as que resultaram nas menores taxas de isolamento. Este fato pode ser evidenciado tanto quando observamos iscas *in natura* quanto iscas desidratadas. Diversos fatores podem ter contribuído para o ocorrido, como por exemplo, a preferência de

*Phytophthora* spp. por outros tipos de isca. Segundo HUBERLI et al. (2013), estudos em que mais de uma espécie é utilizada como isca, mostram que *Phytophthora* spp. variam de isca para isca e essa característica pode ser devido a morfologia da folha utilizada ou simplesmente devido a preferência de *Phytophthora* spp. por determinadas iscas. Especialmente em estudos de diversidade, recomenda-se a utilização de diversas espécies como isca biológica devido a essa preferência.

Quanto a morfologia, sabe-se que as folhas de *W. pine* e *T. canadensis* se apresentam muito mais coreáceas quando comparadas as outras utilizadas no estudo. Este fato pode servir como barreira, dificultando o processo de infecção por microrganismos e assim contribuindo para menores taxas de infecção.

Além de características morfológicas das folhas e da preferência de *Phytophthora* sp. por determinadas iscas, algumas características químicas intrínsecas das folhas de coníferas, podem estar influenciando nas taxas de infecção. MARTIN et al. (2012) ressalta que folhas de determinadas espécies quando utilizadas como iscas, podem resultar em baixas taxas de colonização devido a determinadas substâncias produzidas pelas espécies como compostos fenólicos produzidos por espécies de *Alnus* sp., por exemplo. Em geral, o teor de lignina encontrado em coníferas é superior à aquele encontrado em folhosas (CARVALHO et al., 2009). Segundo SILVA et al. (2005) esta substância é considerada resistente aos fitopatógenos dificultando o processo de colonização. Além da lignina, outros compostos como resinas, látex, tanino e gomas podem dificultar o processo de infecção. Estas substâncias são depositadas nos espaços intercelulares e no interior das células, formando uma barreira impenetrável que envolve completamente o patógeno (AGRIOS, 1997).

Segundo DAS et al. (2008) algumas diferenças biológicas entre diferentes folhas são importantes podendo afetar a atividade de infecção por microrganismos bem como o processo de decomposição. Dentre essas diferenças estão o teor de nitrogênio presente, concentração de lignina, espessura da cutícula e concentração de componentes secundários, podendo estes fatores, influenciar nas taxas de decomposição e de atividade microbiológica.

Folhas de Camélia, Rhododendron e *Quercus* spp. têm sido as mais utilizadas recentemente em diversos estudos para isolamento de *Phytophthora* spp. de ambientes aquáticos (JUNG et al., 2000; THEMANN et al., 2002; BALCI et al., 2007; FICHTNER et al., 2007; GUIMIRE et al., 2009; SUTTON et al., 2009; MARTIN et al., 2012). Outras espécies não muito comuns também já foram relatadas como isca. REESER et al. (2011) estudando a diversidade de *Phytophthora* spp. em córregos no Oregon e Alaska nos Estados Unidos, utilizaram *Chamaecyparis thyoides* (L.) Britton Sterns & Poggenb (Atlantic White Cedar) e *Lithocarpus densiflorus* (Hook. & Arn.) Rehder (Tanoak) como iscas biológicas. Não foram registradas diferenças significativas nas taxas de infecção entre as duas iscas.

No presente estudo, foi observado que as folhas de *R. maximum*, seja *in natura* ou não, resultaram em altas taxas de isolamento de *Phytophthora* sp. O resultado encontrado corrobora com os obtidos por GHIMIRE et al. (2009). Os autores americanos estudaram a diversidade de *Phytophthora* spp. em água utilizada para irrigação nos Estados Unidos e constataram que folhas de *R. maximum* apresentaram as maiores taxas de colonização. SHRESTHA et al. (2013) estudando a diversidade de *Phytophthora* spp. em córregos no estado do Tennessee (EUA) durante os anos de 2010 a 2012, também obtiveram altas taxas de isolamento a partir de folhas de *R. maximum*, resultando em um total de seis espécies de *Phytophthora* isoladas.

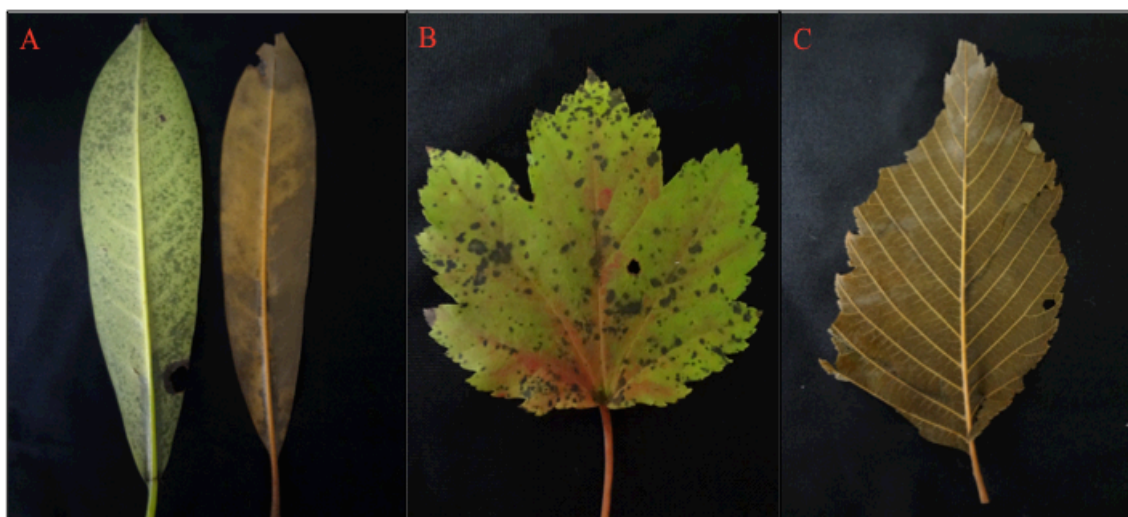
MARTIN et al. (2012) ressalta que a utilização de folhas com pouco ou nenhum tricoma como iscas biológicas para isolamento de *Phytophthora* sp., deve ser priorizada pois estes podem dificultar o contato da água com a isca, podendo ocorrer uma diminuição das



taxas de colonização, por exemplo. Além disso, a utilização de folhas jovens e mais finas é recomendada pois torna mais viável a visualização de estruturas de reprodução no microscópio óptico. Entretanto, a utilização de folhas mais finas apresenta a desvantagem de tornar mais rápida a colonização microbiana. Sendo assim, folhas de plantas “evergreen” como *R. maximum* e *I. opaca*, que se apresentam mais espessas, são mais apropriadas para utilização como iscas biológicas.

Outra característica importante quando da seleção de folhas de espécies vegetais para serem utilizadas como isca diz respeito a durabilidade das folhas quando depositadas no ambiente de coleta. HÜBERLI et al. (2013) relatam que algumas espécies comumente utilizadas como isca podem se degradar rapidamente, comprometendo o trabalho de isolamento. Entre essas espécies, destacam-se folhas de “oak”. Ao contrário do relatado por HÜBERLI et al. (2013), no presente estudo as folhas de *Q. rubra* (Red Oak) não se degradaram rapidamente. Devido a variedade de *Quercus* spp., determinadas folhas podem ser mais resistentes que outras.

No presente estudo foi observado que dentre as folhas utilizadas, a maioria apresentou baixo estado de degradação, com exceção de *U. americana*. No geral, iscas desidratadas foram as que se degradaram mais rapidamente quando comparadas as iscas *in natura* (Figura 14).



**Figura 14:** Iscas após cinco dias de deposição no córrego: (A) Folhas *in natura* e desidratadas de *R. maximum* (Rhododendron); (B) Isca *in natura* de *A. rubrum* (Red Maple); Isca (C) desidratada de *U. americana* (Elm) aparentemente degradada.

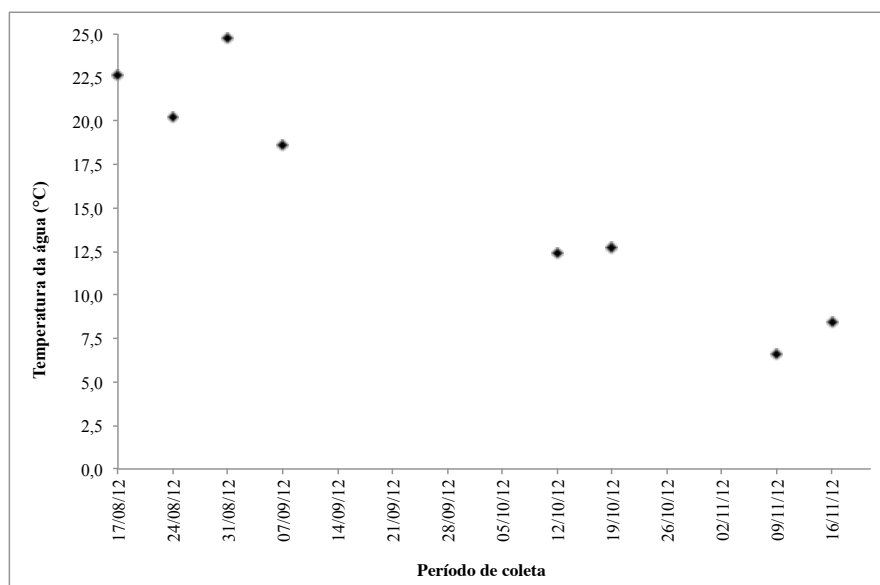
Segundo HWANG et al. (2008), para isolamento de *Phytophthora* spp. de ambientes aquáticos, o tempo de deposição das iscas nos córregos depende da temperatura local. Geralmente em locais onde as temperaturas permanecem acima de 15°C, o processo de infecção das iscas é mais rápido (3 a 7 dias).

Para os meios de cultura utilizados observou-se que tanto no verão ( $p=0,1560$ ) quanto no outono ( $p=0,060$ ) não houve diferenças significativas.

O fato de a presença ou ausência do fungicida himexazol nos meios de cultura utilizados não ter influenciado nas taxas de isolamento, sugere que *Phytophthora* spp. presentes no córrego estudado parecem ser tolerantes a este composto. Algumas espécies de *Phytophthora* como *P. frigida*, já foram citadas como tolerantes ao fungicida himexazol (SULLIVAN et al., 2010). Este estudo sugere que *P. gonapodyides*, espécie amplamente

presente em ambientes aquáticos e possivelmente a mais isolada no córrego estudado (YILMAZ BALCI, comunicação pessoal) são tolerantes a este fungicida.

Apesar de haver uma diferença de temperatura registrada na água do córrego no momento da coleta entre as duas estações (Figura 15), parece que este fator não afetou a dinâmica do processo de infecção de *Phytophthora* spp. nas diferentes iscas. Os resultados obtidos mostram que as taxas de colonização das iscas se mantiveram próximas quando comparamos os dois ensaios experimentais. Entretanto, HWANG et al. (2009) e REESER et al. (2011) estudando a diversidade de *Phytophthora* spp. em córregos nos estados da Carolina do Sul e Oregon, respectivamente, concluíram que estes microrganismos são isolados mais frequentemente nos meses mais quentes do ano.



**Figura 15:** Temperatura (°C) da água registrada em cada uma das 8 semanas de coleta. A temperatura foi registrada no momento de retirada das iscas do córrego.

## 5. CONCLUSÕES

Foi possível isolar *Phytophthora* sp. tanto de iscas *in natura* quanto de iscas secas em estufa, mostrando que estes organismos podem se comportar como saprófitas no ambiente estudado.

*Acer rubrum* L. (Red Maple) e *Ulmus americana* L. (American Elm) foram as espécies que resultaram nas maiores taxas de isolamento em ambos períodos de coleta, tanto para iscas *in natura* quanto para iscas desidratadas.

*Pinus strobus* L. (White Pine) e *Tsuga canadensis* L. (Hemlock), ambas coníferas, foram as espécies que resultaram nas menos taxas de isolamento, tanto para iscas *in natura* quanto para iscas secas, sugerindo que alguma característica morfológica ou a presença de algum composto químico nessas espécies pode ter afetado as taxas de infecção.

As diferentes composições dos meios de cultura utilizados para isolamento não influenciaram nas taxas de crescimento de *Phytophthora* sp., sugerindo que os organismos isolados são tolerantes ao fungicida himexazol.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 803 p.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4. ed. New York: John Wiley, 1996, 869p.
- ALVARENGA, A. P.; CARMO, C. A. F. S. **Seringueira**. Viçosa, MG: EPAMIG, 2008. p.855-878.
- BALCI, Y.; BALCI, S.; EGGERS, J.; MACDONALD, W. L.; JUZWIK, J.; LONG, R. P.; GOTTSCHALK, K. W. *Phytophthora* spp. associated with forest soils in eastern and north-central U.S. oak ecosystems. **Plant Disease**. 91: 705-710, 2007.
- BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 3 ed. Jaboticabal: FUNEP, 1995. 247p.
- CAHILL, D. M., BENNETT, I. J., MCCOMB, J. A. Mechanisms of resistance to *Phytophthora cinnamomi* in clonal, micropropagated Eucalyptus marginata. **Plant Pathology**. 42 (6): 865– 872, 1993.
- COMTF. **Sudden Oak Death** Disponível em: <[www.suddenoakdeath](http://www.suddenoakdeath)> Acesso em: 01 Out. 2013.
- CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química nova**, vol. 32, n.8, 2191-2195, 2009.
- DAS, M.; ROYER, T. V.; LEFF, L. G. Fungal communities on decaying leaves in streams: a comparison of two leaf species. **Mycology Progress**. v.7:267-275, 2008.
- ECKERT, J. W.; TSAO, P. A selective antibiotic medium for isolation of *Phytophthora* and *Pythium* from plant roots. **Phytopathology**, v.52: 771-777., 1962.
- ERSEK, T.; RIBEIRO, O. K. An annotated list of new *Phytophthora* species described post 1996. **Acta Phytopathol. Entomol. Hungarica**, 45: 251-266, 2010.
- ERWIN, D. C.; RIBEIRO, O.K. **Phytophthora diseases worldwide**. St. Paul MN. APS Press. 1996.
- FICHTNER, E. J.; LYNCH, S. C.; RIZZO, D. M. Detection, distribution, sporulation, and survival of *Phytophthora ramorum* in a California redwood-tanoak forest soil. **Phytopathology** v.97: 1366-1375, 2007.

GOMES, C. N. **Genética da resistência a requeima e seleção de famílias superiores derivadas do cruzamento *Solanum lycopersicum* ‘Santa Clara’ e *Solanum habrochaites* f. *Glabratum* BGH 6902.** 2011. 68p. Tese de Doutorado em Fitotecnia Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG.

GOUVEIA, E.; COELHO, V.; SOUSA, N.; COUTINHO, S.; NUNES, L.; MONTEIRO, M., L. "Um método eficiente para a detecção de *Phytophthora cinnamomi* associada com a Doença da Tinta do Castanheiro na rizosfera de Castanheiro (*Castanea sativa* Mill.).", **Revista de Ciências Agrárias**, 1: 130 – 138, 2009.

GOUVEIA, M, E. **Métodos moleculares na identificação, caracterização e detecção de *Phytophthora cambivora* (Petri) Buisman e *Phytophthora cinnamomi* Rands associadas com a doença da tinta do castanheiro.** 2004. 163p. Tese de Doutorado em Ciências Agronômicas/Protecção de Plantas, UTAD. Vila Real.

GRESLEBIN, A. G.; HANSEN, E. M.; WINTON, L.; RAJCHENBERG, M. *Phytophthora* species from declining *Austrocedrus chilensis* forests in Patagonia, Argentina. **Mycologia** 97: 218–228, 2005.

GUIMIRE, S. R.; RICHARDSON, P. A.; MOORMAN, G. W.; LEA-COX, J. D.; ROSS, D. S.; HONG, C. X. An in-situ baiting bioassay for detecting *Phytophthora* species in irrigation runoff containment basins. **Plant Pathology**. v.58: 577-583, 2009.

HANSEN E. M.; REESER, P. W.; SUTTON W. *Phytophthora* beyond agriculture. **Annual Review of Phytopathology**. v.50:359-378, 2012.

HÜBERLI, D.; HARDY, G.; WHITE, D.; WILLIAMS, N.; BURGESS, T. I. Fishing for *Phytophthora* from Western Australia’s waterways: A distribution and diversity survey. **Australasian Plant Pathology** v42: 251–260, 2013.

HWANG, J.; OAK, S. W.; JEFFERS, S. N. 2008. Detecting *Phytophthora ramorum* and other species of *Phytophthora* in streams in natural ecosystems using baiting and filtration methods. Pages 55-58 in: **Proc. Sudden Oak Death** 3rd. Sci. Symp. Santa Rosa, CA.

JUNG, T.; BLASCHKE, H.; OBWALD, W. Involvement of soilborne *Phytophthora* species in central European oak decline and the effect of site factors on the disease. **Plant Pathology**. v49: 706-718, 2000.

KIRK, P. M.; CANNON, P.F.; MINTER, J.C.; STALPERS, J.A. **Dictionary of the Fungi**. 10th ed. Wallingford: CAB International, 2008.

KURACHEK, T; MITCHELL, D. **Diseases of agronomic and vegetable crops caused by *Pythium***. Florida Plant Pathology Fact Sheet, 53 p., 2000.

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. Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil. Campinas: Livraria e Editora Rural, p. 1-14, 2001.

MARANO, A. V.; PIRES-ZOTTARELLI, C. L. A.; BARRERA, M. D.; STECIOW, M. M.; GLEASON, F. H. Diversity, role in decomposition, and succession of zoosporic fungi and straminipiles on submerged decaying leaves in a woodland stream. **Hydrobiologia** 659:93–109, 2011.

MARGULIS, L.; SCHWARTZ, K. V. **Five kingdoms: and illustrated guide to the phyla of life on earth**. W. H. Freeman and Co., New York, N.Y, 2000.

MARTIN, F. N.; ABAD, Z. G.; BALCI, Y.; IVORS, K. Identification and detection of *Phytophthora*: Reviewing our progress, identifying our needs. **Plant Disease**. Vol.96. n.8. p. 1080-1103, 2012.

MARTINS, M. F. T. **Caracterização do gene gip de *Phytophthora cinnamomi* Rands associado a doença da tinta do castanheiro e pesquisa de novos fitofármacos no controle da doença**. 2010. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia. Instituto Politécnico de Bragança. Bragança. 56p.

MILANEZ, A. I. Contributions to the knowledge of aquatic Phycomycetes of the São Paulo State: Oomycetes from the west region. **Rickia**, v. 5, p. 23-43, 1970.

OAK, S.; TKACZ, B. ***Phytophthora ramorum* detection surveys for forests in the United States**. In: Brasier, Jung and Oswald, eds. Progress in Research on *Phytophthora* Diseases of Forest Trees. Forest Research Alice Holt Lodge, Farnham, Surrey UK, p 28-30, 2006.

OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. **Identificação e manejo das principais doenças do cacaueteiro no Brasil**. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC/SEFIT. 132p., 2005.

PEREIRA, A., A. **Oomicetos (Oomycota) no campo agrícola de Nazária – Piauí: Sustentabilidade na prevenção e controle dos fitopatógenos em agricultura familiar**. 2008. Dissertação de Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente, Universidade Federal do Piauí, Teresina.

RAVEN P. H.; EVERT R. F.; EICHHORN S. E. **Biologia Vegetal**. 7th ed. Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 2007.

REESER, P. W.; SUTTON, W.; HANSEN, E. M.; REMIGI, P.; ADAMS, G. C. *Phytophthora* species in forest streams in Oregon and Alaska. **Mycologia**. 103: 22-35, 2011.

RIZZO, D. M.; GARBELOTTO, M.; DAVIDSON, J. M.; SLAUGTER, G.W. *Phytophthora ramorum* as the cause of extensive mortality of *Quercus* spp. and *Lithocarpus densiflorus* in California. **Plant Disease**. 86: 205-214, 2002.

SCHUMANN, G. L.; D'ARCY, C. J. **Essential Plant Pathology**. St. Paul: APS Press, 2006. 338 p.

SHEW, H. D.; BENSON, D. M.; GRAND, L. F. A comparison of baits for isolating *Phytophthora cinnamomi* from soil. **Phytopathology**, v.69: p.532, 1979.

SHRHESTA, S. K.; ZHOU, Y.; LAMOUR, K. H. Oomycetes baited from streams in Tennessee 2010-2012. **Mycologia**. v.105: p.1516-1523, 2013.

SILVA, L. M.; ALQUINI, Y.; CAVALLET, V., J. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta Botanica Brasilica**. v.19, n.1, p.183-194. 2005.

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

SUTTON, W.; HANSEN, E. M.; REESER, P. W.; KANASKIE, A. Stream monitoring for detection of *Phytophthora ramorum* in Oregon tanoak forests. **Plant Disease**. 93: 1182-1186, 2009.

SULLIVAN, M.; BULLUCK, R. **Phytophthora species in the environment and nursery settings**. New Pest Response Guidelines. USDA. Version 1, October, 2010.

THEMMAN, K.; WERRES, S.; LUTTMANN, R.; DIENER, H. A. Observations of *Phytophthora* spp. in water recirculation systems in commercial hardy ornamental nursery stock. **Eur. J. Plant Pathology**. v.108: p.337-343, 2002.

TRENTIN, G. **Avaliação de sistemas de previsão de ocorrência de Phytophthora infestans em batata**. 100p, 2006. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, Santa Maria.

TSAO, H.P. **Why many Phytophthora root rots and crown rots of tree and horticultural crops remain undetected**. Bulletin OEPP/EPPPO, 20:11-27, 1990.

TSAO, P. H. **Factors affecting isolation and quantification of Phytophthora spp. from soil**. In: *Phytophthora. Its biology, taxonomy, ecology and pathology*. D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, and P. H. Tsao, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN., 1983.



