

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, UNICENTRO-PR

**PRODUTOS ALTERNATIVOS NO CONTROLE DA REQUEIMA (*Phytophthora
infestans*) EM BATATA ORGÂNICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MONICA DO ROCIO ANDRADE

GUARAPUAVA-PR

2022

MONICA DO ROCIO ANDRADE

PRODUTOS ALTERNATIVOS NO CONTROLE DA REQUEIMA (*Phytophthora infestans*) EM BATATA ORGÂNICA

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Jackson Kawakami

Orientador

Profa. Dra. Cacilda Márcia Duarte Rios Faria

Co-orientadora

GUARAPUAVA-PR

2022

MONICA DO ROCIO ANDRADE

PRODUTOS ALTERNATIVOS NO CONTROLE DA REQUEIMA (*Phytophthora infestans*) EM BATATA ORGÂNICA

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 23 de fevereiro de 2022.

Dr. Nilceu Ricetti Xavier Nazareno – IDR - PR

Prof. Dr. Henrique da Silva Silveira Duarte – UFPR

Prof. Dr. Jackson Kawakami – UNICENTRO

GUARAPUAVA-PR

2022

Catálogo na Publicação
Rede de Bibliotecas da Unicentro

A553p Andrade, Monica do Rocio
Produtos alternativos no controle da requeima (*Phytophthora infestans*) em batata orgânica / Monica do Rocio Andrade. -- Guarapuava, 2022.
x, 78 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Área de Concentração: Produção Vegetal, 2022.

Orientador: Jackson Kawakami

Coorientadora: Cacilda Márcia Duarte Rios Faria

Banca examinadora: Nilceu Ricetti Xavier Nazareno, Henrique da Silva Silveira Duarte

Bibliografia

1. Agroecologia. 2. Controle. 3. Fitopatologia. 4. Manejo. 5. *Solanum tuberosum* L. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

CDD 630

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	5
2. OBJETIVOS	7
2.1 Objetivo geral	7
2.2 Objetivos específicos	7
3. REFERÊNCIAL TEÓRICO	8
3.1 Agricultura orgânica	8
3.2 Requeima da batata (<i>Phytophthora infestans</i>)	8
3.3 Manejo de <i>P. infestans</i>	11
3.4 Controle alternativo de <i>P. infestans</i>	12
3.5 Referências bibliográficas	14
4. TÉCNICA PARA ISOLAMENTO E MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE REQUEIMA DA BATATA (<i>Phytophthora infestans</i>)	25
4.1 Resumo	25
4.2 Abstract	26
4.3 Introdução	27
4.4 Técnicas de isolamento	28
4.5 Meio de cultura	30
4.6 Armazenamento e repicagem	31
4.7 Potencial de produção e multiplicação	31
4.8 Preparo para inoculação em plantas	32
4.9 Inoculação em casa de vegetação	33
4.10 Conclusão	34
4.11 Referências bibliográficas	34
5. INIBIÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Phytophthora infestans</i> POR SUBSTÂNCIAS ALTERNATIVAS	37
5.1 Resumo	37
5.2 Abstract	38
5.3 Introdução	38
5.4 Material e Métodos	39
5.4.1 Local e período de execução dos experimentos	39
5.4.2 Obtenção do patógenos	40

5.4.3 Substâncias testadas.....	40
5.4.4 Testes realizados <i>in vitro</i>	40
5.5 Resultados.....	42
5.5.1 Teste de doses.....	42
5.5.2 Diluentes das substâncias.....	48
5.5.3 Comparação do melhor resultado de cada tratamento.....	48
5.6 Discussão.....	52
5.7 Conclusão.....	54
5.8 Referências bibliográficas.....	54
6. POTENCIAL DE CONTROLE <i>IN VIVO</i> DE <i>Phytophthora infestans</i> POR SUBSTÂNCIAS ALTERNATIVAS EM CULTIVO ORGÂNICO DE BATATA.....	58
6.1 Resumo.....	58
6.2 Abstract.....	59
6.3 Introdução.....	59
6.4 Material e Métodos.....	61
6.4.1. Experimento em casa de vegetação.....	61
6.4.2. Experimento de campo.....	63
6.4.3. Análises estatísticas.....	64
6.5 Resultados.....	64
6.5.1 Casa de vegetação.....	64
6.5.2 Campo.....	68
6.6 Discussão.....	72
6.7 Conclusão.....	74
6.8 Referências bibliográficas.....	74
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78

RESUMO

Monica do Rocio Andrade. Produtos alternativos no controle da requeima (*Phytophthora infestans*) em batata orgânica

A batata é o quarto alimento mais consumido no mundo sendo alimento básico para diversas populações devido ao seu alto potencial nutritivo. No sistema orgânico de produção, a cultura é dependente de caldas a base de cobre para controlar a requeima da batateira (*Phytophthora infestans*), patógeno causador de doença de grande potencial destrutivo sob ambiente favorável. O cobre apesar de ser nutriente para as plantas, pode se acumular nos solos e na água tornando-se problema. O objetivo desse trabalho foi isolar o oomiceto de forma fácil e assertiva, avaliar o potencial, e doses ideais de substâncias *in vitro* para, posteriormente, realizar testes em casa de vegetação com as 6 substâncias que se sobressaíram nos testes anteriores, e por fim, levar os 4 tratamentos mais promissores a campo. Em laboratório folhas infectadas foram usadas para isolar *P. infestans* em meio de cultura de centeio. A técnica foi descrita e mostrou potencial de produção de $1,79 \times 10^4$ esporângios mL⁻¹ em aproximadamente 8 dias. Na sequência, realizou-se testes *in vitro* de crescimento micelial, esporulação e germinação de esporângios. Na casa de vegetação, 6 substâncias mais testemunha positiva com calda bordalesa e negativa com água destilada, foram avaliadas na cultivar Ágata. Em seguida no campo foram testados quatro produtos e duas testemunhas em duas cultivares: Ágata e Catucha. Em laboratório os tratamentos quitosana em nanopartículas, sálvia, noz moscada, malva, ácido fosfórico e tomilho foram os mais eficientes no controle do crescimento micelial e na esporulação *in vitro* de *P. infestans*. Para germinação de esporângios os tratamentos que mais inibiram foram quitosana em nanopartículas, manjerição e quitosana. Os resultados da casa de vegetação variaram de acordo com as avaliações, porém os tratamentos: noz moscada, tomilho, quitosana e ácido fosfórico não diferiram da testemunha positiva em certas avaliações. No experimento a campo os resultados não foram conclusivos, devendo-se a baixa incidência da doença nesta safra, porém apesar de não ser o principal objetivo, pode-se observar que a cultivar Catucha foi mais resistente que Ágata à severidade e apresentou maior produtividade. Algumas substâncias, nas avaliações de massa seca da haste e severidade ao longo das horas após inoculação, apresentaram resultados semelhantes à calda bordalesa: tomilho, noz moscada, ácido fosfórico e quitosana. O tratamento com quitosana em nanopartículas, ainda não foi testado em casa de vegetação e

campo, porém apresentou resultados eficientes *in vitro*.

Palavras-Chave: Agroecologia, Controle, Fitopatologia, Manejo, *Solanum tuberosum* L.

ABSTRACT

Monica do Rocio Andrade. Alternative products to control late blight (*Phytophthora infestans*) in organic potato

Potato is the fourth most consumed food in the world and a staple food for several populations due to its high nutritional potential. In the organic production system, the crop depends on copper-based mixture to control late blight (*Phytophthora infestans*), a pathogen that causes a disease of great destructive potential under favorable conditions. Although copper is a nutrient for plants, it can accumulate in soils and water, becoming a problem. The objective of this work was to isolate the oomycete in an easy and assertive way, to evaluate the potential and ideal doses of substances *in vitro* and then to perform tests in the greenhouse with the 6 substances that stood out in the previous tests and finally to take the 4 most promising treatments to the field. In the laboratory infected leaves were used to isolate *P. infestans* in rye culture medium. The technique was described and showed potential production of 1.79×10^4 sporangia mL^{-1} in approximately 8 days. Subsequently, *in vitro* tests for mycelial growth, sporulation and sporangia germination were performed. In the greenhouse, 6 products plus positive and negative controls were evaluated on the Agata cultivar. Then, in the field, 4 substances and 2 controls were tested on 2 cultivars: Agata and Catucha. In the laboratory, the treatments chitosan in nanoparticles, sage, nutmeg, mallow, phosphoric acid and thyme were the most efficient in controlling the mycelial growth and *in vitro* sporulation of *P. infestans*. For sporangia germination, the treatments that inhibited the most were chitosan in nanoparticles, basil and chitosan. The results in the greenhouse varied according to the evaluations, but the treatments: nutmeg, thyme, chitosan and phosphoric acid did not differ from the positive control in certain evaluations. In the field experiment, the results were not conclusive, due to the low incidence of the disease in this crop season. However, despite not being the main objective, it can be observed that the Catucha cultivar was more resistant than Agata to the severity and presented a higher yield. Some substances, in the evaluations of stem dry weight and severity throughout the hours after inoculation, showed similar results to Bordeaux mixture: thyme, nutmeg, phosphoric acid and chitosan. The treatment with chitosan in nanoparticles has not yet been tested in greenhouse and in the field but showed efficient results *in vitro*.

Keywords: Agroecology, Control, Management, Phytopathology, *Solanum tuberosum*.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente a batata (*Solanum tuberosum* L.) é o quarto produto vegetal mais produzido no mundo, sendo alimento utilizado em diferentes dietas. Originária da região dos Andes, apenas no século XVI chegou à Europa, onde foi popularizada e disseminada para o resto do mundo. Os principais desafios do cultivo, tanto na produção orgânica quanto no convencional, estão associados ao controle de doenças (DJAMAN et al., 2021) uma vez que os fungicidas vem perdendo eficiência (ALOO; MBEGA; MAKUMBA, 2020), além do manejo da adubação (FINCKH; SCHULTE-GELDERMANN; BRUNS, 2006).

Phytophthora infestans (Mont.) de Bary é o agente etiológico causador da requeima na batata, uma das doenças mais importante da cultura. Ficou mundialmente conhecida em 1861 quando o pesquisador Anton de Bary comprovou que as mortes das plantas de batata na Irlanda e parte da Europa que acarretaram em grande crise de fome era causada por patógeno e não por crenças místicas especuladas na época (AGRIOS, 2005). O oomiceto é caracterizado como patógeno hemibiotrófico, após as primeiras lesões, com o passar de poucos dias sob ambiente favorável produz cerca de 300.000 esporângios por lesão, via reprodução assexuada (FRY, 2008). Isso explica o grande potencial destrutivo da doença que possui rápido desenvolvimento e pode acometer a cultura em qualquer estágio (FRY et al., 2015). As infecções podem aparecer mais cedo em áreas em que ocorre o plantio sucessivo da batata, porém a principal e mais expressiva fonte de inóculo no Brasil são os esporângios carregados pelo ar, porque podem ser encontrados ao longo do ano (LIMA et al., 2009a).

Grandes perdas de qualidade e rendimento estão associadas a essa doença, que é uma das mais devastadoras da cultura. O controle requer o uso regular de fungicidas na agricultura convencional (AGRIOS, 2005; FRY et al., 2015). Na agricultura orgânica o controle da doença se dá majoritariamente com aplicações de produtos à base de cobre (DORN et al., 2007a). Desde 2009 a União Europeia vem estabelecendo regras para diminuir o uso de pesticidas como o cobre na agricultura orgânica, tendo como fundamento dessa regra a contaminação da água e principalmente do solo. Em dezembro de 2018 nova votação realizada pelo parlamento europeu acordou que o uso do cobre fosse prorrogado por mais 7 anos a partir de 31 de janeiro de 2019, desde que respeitando parâmetros estabelecidos pela *European Food Safety Authority* (EFSA) (EUROPEAN UNION, 2018a). Dentre as novas regras do uso do cobre ficou autorizado a quantidade máxima de 28 kg por hectare em período de 7 anos, ou seja, na média 4 kg ha⁻¹ ano⁻¹. No Brasil segundo a legislação vigente

(Instrução Normativa Nº 46 de 06 de outubro de 2011) o uso do cobre é permitido apenas como fungicida na quantidade máxima de 6 kg de cobre por hectare por ano nos sistemas orgânicos de produção agrícola, para evitar a contaminação do solo (MAPA, 2011). Visto que na Europa a preocupação com a contaminação pelo uso do cobre já está em discussão desde 2009, estima-se que em breve o uso do cobre possa se tornar uma não conformidade para a produção orgânica brasileira.

Muitas pesquisas estão sendo realizadas buscando alternativas eficazes e oriundas de fontes naturais ou mais sustentáveis para o manejo da requeima, porém grande parte é realizada apenas em laboratório faltando maior entendimento do desenvolvimento do controle a campo (MULUGETA et al., 2020). Num futuro próximo, no qual se almeja reduzir o uso do cobre na agricultura orgânica, novas alternativas precisam ser estudadas para encontrar substituto que controle satisfatoriamente *P. infestans* e que ao mesmo tempo proteja o ecossistema e a biodiversidade (NECHWATAL; ZELLNER, 2015b).

Produto à base de alho foi uma das substâncias já testadas para o controle de *P. infestans*, mas necessitou de dose muito alta para ser eficiente, sendo por isso descartado (NECHWATAL; ZELLNER, 2015b). Outro produto testado foi o fosfato de sódio que se saiu muito bem em testes de laboratório, porém foi descartado porque seu uso na agricultura orgânica não é permitido (NECHWATAL; ZELLNER, 2015b). Outros autores realizaram trabalhos semelhantes com diversas substâncias, incluindo controle biológico com *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) e *Trichoderma* sp. os quais inibiram 100% do crescimento micelial, ainda *Bacillus* sp. inibiu 1,6% da germinação de esporângios e em contrapartida *Trichoderma* sp. conseguiu inibir 37,5% (DORN et al., 2007a).

A falta de estudos completos com produtos alternativos eficientes para substituir o uso do cobre, justifica avaliar o potencial de novas alternativas *in vitro* e posteriormente *in vivo* para controlar a requeima na batata.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial de produtos alternativos para manejar a requeima (*Phytophthora infestans*) da batata em cultivo orgânico.

2.2 Objetivos específicos

- Introduzir e praticar um protocolo de isolamento indireto, cultivo e multiplicação *in vitro* de *P. infestans*.
- Avaliar a ação de extratos e óleos essenciais de plantas, ácido fosfórico e quitosana no crescimento micelial, esporulação e germinação *in vitro* de *P. infestans*.
- Testar o efeito de extratos e óleos essenciais de plantas, ácido fosfórico e quitosana para conter a severidade de *P. infestans* em casa de vegetação.
- Quantificar o efeito dos melhores tratamentos dos ensaios *in vitro* e em casa de vegetação na severidade a campo de *P. infestans* em cultivares de batata.
- Identificar os melhores tratamentos no manejo de *P. infestans* no cultivo orgânico de batata.

3. REFERÊNCIAL TEÓRICO

3.1. Agricultura orgânica

A agricultura orgânica está presente em mais de 130 países, com a crença de oferecer alimentos mais saborosos, nutritivos, saudáveis e principalmente que não agridam o meio ambiente. Esse sistema de produção possui vantagens como baixo custo de insumos para produção, maior resiliência das plantas a secas, além de presar pela questão social e ética (LOTTER, 2003).

O conceito da agricultura orgânica preza produzir alimentos sem agredir o ecossistema (SEUFERT; RAMANKUTTY; FOLEY, 2012), foi estabelecido pelo inglês Sir Albert Howard na década de 40. As características desse modelo de produção são: excluir o uso de agrotóxicos, aditivos sintéticos, organismos geneticamente modificados, reguladores de crescimento, diminuir impacto ao meio ambiente e produzir alimentos saudáveis sem resíduos tóxicos (HOWARD, 1940).

A agricultura orgânica vem ganhando força ano a ano e nesse sistema a importância não é dada apenas para a saúde da planta, mas também à qualidade do alimento que ela produz. Além disso esse sistema de produção é benéfico para o solo e à biodiversidade (KÜHNE et al., 2020a). Produtores que optam por esse sistema de produção são muitas vezes criticados, devido a produção ser menor quando comparado ao convencional (SEUFERT; RAMANKUTTY; FOLEY, 2012). Entretanto, produz alimentos mais nutritivos, com menos resíduos, ecologicamente corretos e muitas vezes mais rentáveis (REGANOLD; WACHTER, 2016).

Apesar de altamente difundido, muitas barreiras e críticas impedem maior adoção desse sistema, sugerindo que necessite de maior apoio político para facilitar a adoção desse sistema nas propriedades rurais (REGANOLD; WACHTER, 2016), assim como, melhor entendimento e difusão dos benefícios sociais, ambientais e econômicos da agricultura orgânica (SEUFERT; RAMANKUTTY; FOLEY, 2012).

3.2. Requeima da batata (*Phytophthora infestans*)

O oomiceto *P. infestans* é o mais expressivo da classe dos Stramenopiles, pertence à

ordem mais estudada desse grupo, a Peronosporales; é organismo eucarionte e possui capacidade de se reproduzir assexuadamente e sexuadamente (MCGOWAN; FITZPATRICK, 2020). Devido a algumas características morfológicas, crescimento filamentosos e absorção de nutrientes, eram classificados anteriormente como fungos (RICHARDS et al., 2006).

As diferenças mais significativas entre os fungos e oomicetos são: os oomicetos pertencem ao grupo taxonômico das algas marrons e diatomáceas, hifas asseptadas e multinucleadas, diploides, parede celular composta por celulose, β -1,3 e β -1,6 glucanase, não possuem pigmentação (o que no início dificultou os estudos), possuem zoósporos flagelados na reprodução assexuada e oósporos na sexuada. Por outro lado os fungos pertencem ao reino *Fungi* de acordo com a classificação de Whittaker (WHITTAKER; MARGULIS, 1978). Possuindo hifas septadas com um ou mais núcleos por compartimento, haploides, possuem quitina na parede celular, na reprodução assexuada há formação dos quitrídeos e na sexual há vários tipos de esporângios (JUDELSON; BLANCO, 2005).

Pesquisas atuais demonstram que o gene que teve grande importância na evolução dos oomicetos em comparação aos fungos é o HGT (genes de transferências horizontais), esse teve impacto principalmente no que diz respeito à patogenicidade dos oomicetos (MCGOWAN; FITZPATRICK, 2020).

P. infestans é o agente etiológico da requeima ou mela da batata assim conhecida no Brasil. Em outros países pode ser chamada por “potato late blight” ou “potato downy mildew” em inglês, “mildiu de la patata” em espanhol, “mildiou de la pomme de terre” em francês, “fitoforos” em russo, “wan yi bing” em chinês, “braunfaeule” e “kraut und knollenfaeule” em alemão, “aaloo ka jhulsa” em indiano e “phytophthorosis” em ucraniano (CABI, 2021).

O potencial destrutivo dessa doença se associa principalmente ao desenvolvimento rápido sob ambientes favoráveis e ao fato de que a doença pode acometer a cultura em qualquer estágio de desenvolvimento (ZANOTTA, 2019). Em áreas onde ocorre o plantio sucessivo da cultura da batata, as infecções podem aparecer mais cedo, porém, a principal fonte de inóculo e mais expressiva no Brasil são os esporângios carregados pelo ar (LIMA et al., 2009b).

É considerada uma das principais doenças da cultura da batata, sendo responsável pelo grande número de aplicações de fungicidas sintéticos. O agente etiológico afeta as solanáceas de maneira geral sendo economicamente mais prejudicial às culturas do tomate (*Solanum lycopersicum* L.) e batata (*Solanum tuberosum* L.) (LIMA et al., 2009b; SOUZA DIAS; IAMAUTI; FISCHER, 2020).

A *P. infestans* consegue, no período inicial se desenvolver discretamente nas células, o que dificulta a identificação de infecção ou não infecção da planta (JUDELSON; BLANCO, 2005). Os oomicetos causam infecções devido ao grande arsenal de proteínas efetoras que atuam desassociando os elementos celulares, modulam as respostas imunes do hospedeiro e levam a morte do tecido, ou seja, sua necrose (MCGOWAN; BYRNE; FITZPATRICK, 2019).

A reprodução assexuada é a que mais ocorre, e pode ser por duas vias, direta ou indireta. Quando as temperaturas estão acima de 14 °C, a germinação do esporângio vai ocorrer de forma direta e entrará na planta por meio das lenticelas, feridas ou estômatos. Já a forma indireta ocorre em temperaturas mais baixas em que ocorre a liberação dos zoosporos do esporângio, que encistam, perdem os flagelos e germinam, e esses por meio do apressório e haustório vão penetrar na planta e infectá-la. As duas formas, direta ou indireta de reprodução assexuada, necessitam de filme de água sob a folha (JUDELSON; BLANCO, 2005), evidenciando que é de grande importância a ocorrência de água para que haja a infecção, uma vez que se o esporângio ficar exposto ao sol por apenas uma hora acabará perdendo cerca de 95% de viabilidade (MIZUBUTI; AYLOR; FRY, 2000).

Os sintomas foliares iniciam em qualquer parte da planta, com manchas que apresentam tamanhos e formas variadas na cor verde clara ou escura. Com o passar dos dias a lesão evolui, caracterizando-se por coloração marrom mais escuro, aspecto encharcado e formas mais arredondadas ou irregulares. O aumento dessa lesão a tornará necrótica e com aspecto de queima intensa. Sob condições climáticas favoráveis, como temperaturas entre 15 e 20 °C e alta umidade, esporângios e esporangióforos se formam, apresentam coloração branca ou acinzentada na face inferior da folha, geralmente no limite o tecido doente do sadio. Na haste as lesões são marrons, contínuas e com aspecto anelado, que com o passar do tempo, levam a morte do tecido. Por fim quando a infecção atinge os tubérculos, esses vão apresentar manchas irregulares, com as bordas mais marcadas de cor marrom castanho. No interior dos tubérculos pode haver necrose de coloração marrom (SOUZA DIAS; IAMAUTI; FISCHER, 2020; TÖFOLI; DOMINGUES; ZANOTTA, 2017).

A disseminação do patógeno é facilitada pelo vento e pela chuva. Quando sob condições favoráveis combinadas a cultivares suscetíveis, pode concluir seu ciclo de vida em menos de 5 dias. O oomiceto pode se reproduzir assexuadamente ou sexuadamente, dependendo da presença dos grupos de compatibilidade A1 e A2 na população do patógeno. O México é considerado a região de origem da *P. infestans*, onde há os dois grupos sexuais

compatíveis. Em locais com temperaturas mais amenas o patógeno necessitará da estrutura de reprodução, oósporo, para sobrevivência e fonte de inóculo inicial. Já em locais com clima tropical basta plantas voluntárias de batata e tubérculos infectados para manter a fonte de inóculo (FRY; GOODWIN, 1997; SOUZA DIAS; IAMAUTI; FISCHER, 2020).

3.3. Manejo de Requeima da batata

Para as solanáceas, principalmente batata e tomate, *P. infestans* geralmente é o problema foliar mais difícil e caro de se manejar. O controle convencional da requeima na batata envolve alguns fungicidas como Ridomil® (Metalaxyl), Bravo® (Clorotalonil), Revus® (Mancozeb e Mandipropamida), entre outros; já o controle orgânico é realizado com caldas de cobre, e é extremamente dependente desse elemento (JOHNSON; JORDAN; GEVENS, 2015).

Até mesmo os produtores da agricultura convencional sofrem para controlar essa doença. Por exemplo, metalaxil, que é o princípio ativo utilizado no mundo todo contra *Phytophthora* e *Pythium* tem sido relatado como não eficiente, pois diversos isolados de *P. infestans* estão resistentes e chegam até serem estimulados por essa molécula (REIS; RIBEIRO; MIZUBUTI, 2006; ZHANG; PANACCIONE; GALLEGLY, 1997).

Na Europa, a agricultura orgânica não possui controle protetivo eficiente sem o uso de calda bordalesa, fato que preocupa os ambientalistas. Por isso a adoção de sistemas de decisão (DSS) foi estudada para que haja cronograma de pulverização e conseqüentemente diminuição do número de aplicações anuais de caldas à base de cobre, mesmo com pressão moderada da doença (BANGEMANN et al., 2014).

Desde 2009, os países que fazem parte da União Europeia estão passando por transição no uso do cobre na agricultura. Esse fato afeta diretamente os agricultores de batata orgânica, uma vez que são dependentes de caldas a base de cobre para controlar *P. infestans*. Muitos estudos vêm sendo realizados desde então, porém sem muito sucesso. Por isso a União Europeia em 2018, acordou diante votação do parlamento que o uso do cobre seria liberado por mais 7 anos, desde que nesse período táticas menos poluentes sejam estudadas e, devendo ser respeitado o limite de 4 kg de cobre ha⁻¹ ano⁻¹ (EUROPEAN UNION, 2018a).

Por mais que na agricultura orgânica alguns agentes de biocontrole tenham capacidade de reduzir a severidade da doença, nenhum deles se assemelha ao controle oferecido pelo cobre. O que se tem feito é a associação de biocontroles com as caldas de cobre, diminuindo a

quantidade anual de cobre usado (LAL et al., 2021). Em 2025 acontecerá nova reunião na Europa que avaliará sobre a continuidade do uso do cobre na agricultura; até lá há necessidade de se obter alternativas eficientes ao uso desse elemento (EUROPEAN UNION, 2018a).

Considerado patógeno de difícil controle, o manejo integrado de *P. infestans* precisa ser adotado, como uso de sementes (tubérculos) sadias, cultivares menos suscetíveis, destruição de fontes de inóculo como plantas voluntárias e controle químico (BOSCO et al., 2010; TAYLOR et al., 2003).

O cobre é micronutriente essencial para a maioria das culturas, pode ser encontrado em 3 estados e é mineral abundante na terra (GUJRE; RANGAN; MITRA, 2021), porém, seu uso contínuo oferece riscos de contaminação dos solos e da água. Por exemplo, 445 amostras investigadas na África demonstraram que 26 delas estavam com teor superior ao limite máximo de cobre permitido para solos agrícolas que é de 100 mg kg⁻¹ (MNG'ONG'O et al., 2021). Isso significa que mesmo o cobre sendo benéfico, em alguns casos pode ser maléfico, como quando em altas doses no solo.

3.4. Controle alternativo de *P. infestans*

Após o surgimento de isolados de *P. infestans* resistentes a fungicidas como o metalaxil (DAVIDSE; DANIAL; VAN WESTEN, 1983), o controle químico dessa doença começou a se tornar mais complexo. Assim como o controle com o cobre, devido à problemática já citada.

A quitosana é polissacarídeo que não apresenta riscos à saúde do consumidor e apresenta atividade antifúngica direta (SILVA et al., 2021). Alguns autores vêm estudando o efeito da quitosana solúvel em água na concentração de 0,1% no controle de doenças como a requeima na batata (O'HERLIHY; DUFFY; CASSELLS, 2003). Esses autores relatam que o uso de quitosana no controle de requeima na batata pode representar estratégia de controle economicamente viável e durável (O'HERLIHY; DUFFY; CASSELLS, 2003).

Testes de laboratório e de campo mostraram que não apenas a quitosana (NECHWATAL; ZELLNER, 2015b), assim como a maioria das substâncias utilizadas no trabalho apresentam bom desempenho *in vitro*, porém, ao serem levadas a campo não apresentam a mesma eficiência devido a fatores como chuvas, raios ultravioleta (UV) e temperaturas variáveis (DORN et al., 2007a). Em trabalho *in vitro* com quitosana em nanopartículas foi possível verificar efeito significativo na atividade antifúngica contra

Colletotrichum gloeosporioides Penz, *Phytophthora capsici* (Leonian) Sarej, *Sclerotinia sclerotorum* (Lib) de Bary, *Fusarium oxysporum* (Schlecht) Emend e *Giberella fujikori* (Sawada) Wollenw, em todas as concentrações testadas, de 0,1 a 5,0 mg mL⁻¹ (OH; CHUN; CHANDRASEKARAN, 2019).

Em outro trabalho realizado com nanopartículas de quitosana, o efeito contra *P. capsici* foi observado quando o material penetrou no conteúdo celular do oomiceto e o matou devido ao pequeno tamanho das nanopartículas utilizadas (LE et al., 2019). Na produção de alimento a empregabilidade de nanopartículas é tema ainda em estudo, visto que essa tecnologia pode ser solução de problemas como o uso de fertilizantes e manejo de pesticidas. O emprego dessa tecnologia aplicada em nanofertilizantes e nanopesticidas melhorou o controle de doenças, assim como o manejo de nutrientes em plantas, porém, ainda há muito a se estudar e entender sobre o assunto (GOMEZ et al., 2021).

O uso de extratos de plantas vem despertando interesse por ser baseado em método alternativo de controle de doenças (TURÓCZI et al., 2020b). Os extratos de plantas como *Salvia officinalis* L. (sálvia) e *Malva silvestres* L. (malva) para controle de *P. infestans* na concentração de 5% mostraram bons resultados em estudos anteriores (BLAESER et al., 2002; DORN et al., 2007b). O manjeriço, tomilho e orégano são plantas da família Lamiaceae cujos óleos essenciais vêm sendo estudados e têm apresentando alto potencial antimicrobiano (WALLER et al., 2017).

O óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. (manjeriço) mostrou bons resultados nas dosagens de 1000 ppm e 2000 ppm no controle de *C. gloeosporoide* no tratamento de sementes de cebola (LOZADA et al., 2019). Concentrações mais baixas desse óleo de 50 até 400 ppm foram testados em *Phytophthora spp.* por outros autores, sendo obtido bons resultados (JAHANSHIR et al., 2016). O óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. (tomilho) apresentou forte potencial de controle de patógenos como *C. gloeosporioides*, *E. ampelina* (Shear), e *P. infestans* em testes realizados em laboratório, sendo que concentrações a partir de 250 µL L⁻¹ foram capazes de inibir o crescimento micelial desses patógenos (HORST, 2020). Aflatoxinas são importantes micotoxinas produzidas pelo gênero de fungos *Aspergillus sp.* O óleo essencial de noz moscada (*Myristica fragrans*) (Houtt.), quando nanoencapsulados, inibiu a produção de aflatoxina em arroz (DAS et al., 2020). Esse mesmo óleo foi capaz de inibir o desenvolvimento de fungos como *Aspergillus niger* (Tiegh.), *F. oxysporum* e *Pinicillium glabrum* (Wehmer), (RODIANAWATI; HASTUTI; CAHYANTO, 2015). Porém, entendimento maior do efeito desse óleo sobre fungos e oomicetos causadores de doenças em

plantas não é encontrado na literatura.

O ácido fosfórico é sal derivado do fosfato. O uso de substâncias que são compostas por fosfatos para o controle de doenças vem sendo estudado desde 1989 quando se descobriu que sais de fosfato induziram resistência sistêmica em plantas de pepino contra o fungo *Colletotricum* sp. (GOTTSTEIN; KUC, 1989). O ácido fosfórico e outros produtos à base de fosfato apresentaram bons resultados em testes laboratoriais e a campo na dose de 1%, podendo ser produto promissor para substituir o cobre (DORN et al., 2007b; FORRER; VOGELGSANG; MUSA, 2017a).

3.5. Referências bibliográficas

ADOLF, B. et al. Fungal, Oomycete, and Plasmodiophorid Diseases of Potato. In: CAMPOS, H.; ORTIZ, O. (Eds.). **The Potato Crop: Its Agricultural, Nutritional and Social Contribution to Humankind**. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 307–350.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5. ed. Amsterdam; Boston: Elsevier Academic Press, 2005.

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2016.

ALOO, B. N.; MBEGA, E. R.; MAKUMBA, B. A. Rhizobacteria-Based Technology for Sustainable Cropping of Potato (*Solanum tuberosum* L.). **Potato Research**, v. 63, n. 2, p. 157–177, 1 jun. 2020.

BANGEMANN, L.-W. et al. Copper reducing strategies for late blight (*Phytophthora infestans*) control in organic potato (*Solanum tuberosum*) production. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 121, n. 3, p. 105–116, 1 jun. 2014.

BEAKES, G. W.; GLOCKLING, S. L.; SEKIMOTO, S. The evolutionary phylogeny of the oomycete “fungi”. **Protoplasma**, 2011.

BI, Y. et al. Inhibitory Effects of Essential Oils for Controlling *Phytophthora capsici*. **Plant Disease**, v. 96, n. 6, p. 797–803, 1 jun. 2012.

BLAESER, P. et al. **Pflanzeninhaltsstoffe mit fungizider Wirkung**. Nordrhein-Westfalen Bonn: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn Landwirtschaftliche Fakultät, 2002.

BOSCO, L. C. et al. Sistemas de previsão de requeima em cultivos de batata em Santa Maria, RS. **Bragantia**, v. 69, n. 3, p. 649–660, 2010.

CABI. **Center for Agriculture and Biosciences International**. Disponível em: <<https://www.cabi.org/isc/datasheet/40970>>. Acesso em: 19 ago. 2021.

CALVO, P. et al. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 63, n. 1, p. 125–132, 1997.

CASA-COILA, V. H. et al. Characterization of mating type and the diversity of pathotypes of *Phytophthora infestans* isolates from Southern Brazil. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 127, n. 1, p. 43–54, 1 fev. 2020.

CATEN, C. E.; JINKS, J. L. Spontaneous variability of single isolates of *Phytophthora infestans*. I. Cultural variation. **Canadian Journal of Botany**, v. 46, n. 4, p. 329–348, 1 abr. 1968.

COSSETIN, L. F. et al. Development of nanoemulsions containing *Lavandula dentata* or *Myristica fragrans* essential oils: Influence of temperature and storage period on physical-chemical properties and chemical stability. **Industrial Crops and Products**, v. 160, p. 113115, fev. 2021.

DAS, S. et al. Fabrication, characterization and practical efficacy of *Myristica fragrans* essential oil nanoemulsion delivery system against postharvest biodeterioration. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 189, p. 110000, 1 fev. 2020.

DAVIDSE, L. C.; DANIAL, D. L.; VAN WESTEN, C. J. Resistance to metalaxyl in *phytophthora infestans* in the Netherlands. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v. 89, n. 1, p. 1–20, 1 jan. 1983.

DERAL. **DERAL**. Disponível em: <https://view.officeapps.live.com/op/view.aspx?src=https%3A%2F%2Fwww.agricultura.pr.gov.br%2Fsites%2Fdefault%2Farquivos_restritos%2Ffiles%2Fdocumento%2F2021-08%2Fbdlpanet-1.xls&wdOrigin=BROWSELINK>. Acesso em: 20 set. 2021.

DINIZ, L. D. DO et al. Bioactive Natural Compounds and Antioxidant Activity of Essential

Oils from Spice Plants: New Findings and Potential Applications. **Biomolecules**, v. 10, n. 7, p. 988, 1 jul. 2020.

DJAMAN, K. et al. Characteristics of Organically Grown Compared to Conventionally Grown Potato and the Processed Products: A Review. **Sustainability**, v. 13, n. 11, p. 6289, jan. 2021.

DORN, B. et al. Control of late blight in organic potato production: evaluation of copper-free preparations under field, growth chamber and laboratory conditions. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, n. 2, p. 217–240, 2007a.

DORN, B. et al. Control of late blight in organic potato production: evaluation of copper-free preparations under field, growth chamber and laboratory conditions. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, n. 2, p. 217–240, 4 set. 2007b.

EUROPEAN UNION. Commission implementing regulation (EU) 2018/1981 - of 13 december 2018 - Renewing the approval of the active substances copper compounds, as candidates for substitution, in accordance with regulation (EC) no1107 / 2009 of the European parliament and of the council concerning the placing of plant protection products on the market, and amending the annex to commission implementing regulation (EU) no 540/2011. 2018 a, p. 5.

EUROPEAN UNION. 2018/1981. COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) 2018/1981 - of 13 December 2018 - Renewing the approval of the active substances copper compounds, as candidates for substitution, in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market, and amending the Annex to Commission Implementing Regulation (EU) no 540/2011. 2018 b, p. 5.

FAOSTAT. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 20 set. 2021.

FENG, W.; ZHENG, X. Essential oils to control *Alternaria alternata* *in vitro* and *in vivo*. **Food Control**, v. 18, n. 9, p. 1126–1130, set. 2007.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**,

v. 35, p. 1039–1042, dez. 2011.

FINCKH, M. R.; SCHULTE-GELDERMANN, E.; BRUNS, C. Challenges to Organic Potato Farming: Disease and Nutrient Management. **Potato Research**, v. 49, n. 1, p. 27–42, 1 jan. 2006.

FOKKEMA, N. J. The rôle of saprophytic fungi in antagonism against *Drechslera sorokiniana* (*Helminthosporium sativum*) on agar plates and on rye leaves with pollen. **Physiological Plant Pathology**, v. 3, n. 2, p. 195–205, abr. 1973.

FORRER, H.-R.; VOGELGSANG, S.; MUSA, T. Botanicals and phosphonate show potential to replace copper for control of potato late blight. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 4, p. 65, 24 nov. 2017a.

FORRER, H.-R.; VOGELGSANG, S.; MUSA, T. Botanicals and Phosphonate Show Potential to Replace Copper for Control of Potato Late Blight. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 4, p. 65, dez. 2017b.

FRY LAB. **Biology of Phytophthora infestans and Management of Late Blight – Cornell University – Department of Plant Pathology and Plant-Microbr Biology**. Disponível em: <<http://www.plantpath.cornell.edu/Fry/Protocols-UnclarifiedV8.html>>. Acesso em: 5 ago. 2021.

Fry Lab: Protocols-Rating system. Disponível em: <<http://www.plantpath.cornell.edu/Fry/Protocols-Rating-system.html>>. Acesso em: 30 ago. 2020.

FRY, W. *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. **Molecular Plant Pathology**, v. 9, n. 3, p. 385–402, 1 maio 2008.

FRY, W. E. et al. Five Reasons to Consider *Phytophthora infestans* a Reemerging Pathogen. **Phytopathology**, v. 105, n. 7, p. 966–981, 1 jul. 2015.

FRY, W. E.; GOODWIN, S. B. Resurgence of the Irish potato famine fungus. **BioScience**, v. 47, n. 6, p. 363–371, jun. 1997.

GARCIA, C. et al. Antimicrobial activity of *Agaricus brasiliensis* on *Plasmopara viticola* and

its effect on the induction of resistance to the control of downy mildew on 'Isabel Precoce'. **Plant Pathology**, v. 85, n. 0, 23 ago. 2018.

GOMEZ, A. et al. Effects of nano-enabled agricultural strategies on food quality: Current knowledge and future research needs. **Journal of Hazardous Materials**, v. 401, p. 123385, jan. 2021.

GOTTSTEIN, H. D.; KUC, J. A. Induction of systemic resistance to anthracnose in cucumber by phosphates. **Phytopathology**, v. 79, n. 2, p. 176, 1989.

GUJRE, N.; RANGAN, L.; MITRA, S. Occurrence, geochemical fraction, ecological and health risk assessment of cadmium, copper and nickel in soils contaminated with municipal solid wastes. **Chemosphere**, v. 271, p. 129573, 1 maio 2021.

HORST, M. V. **Óleos essenciais de plantas da família lamiaceae no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Elsinoëampelina* e *Phytophthora infestans***. Guarapuava - Paraná: Universidade Estadual do Centro-Oeste, 2020.

HOWARD, A. **An agricultural testament**. London: New York Oxford University Press, 1940.

HUANG, X. et al. Antifungal activity of chitosan against *Phytophthora infestans*, the pathogen of potato late blight. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 166, p. 1365–1376, 1 jan. 2021.

ISMAN, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, v. 19, n. 8–10, p. 603–608, set. 2000.

JAHANSHIR, J. et al. Antifungal effect of plant essential oils on controlling *Phytophthora Species*. **The Plant Pathology Journal**, v. 32, n. 1, p. 16–24, 1 fev. 2016.

JAMES, W. CI. An illustrated series of assessment keys for plant diseases, their preparation and usage. **Canadian Plant Diseases**, 1971.

JOHNSON, A. C. S.; JORDAN, S. A.; GEVENS, A. J. Efficacy of Organic and Conventional Fungicides and Impact of Application Timing on Control of Tomato Late Blight Caused by US-22, US-23, and US-24 Isolates of *Phytophthora infestans*. **Plant Disease**, v. 99, n. 5, p.

641–647, 2015.

JOHNSON, D. A.; INGLIS, D. A.; MILLER, J. S. Control of Potato Tuber Rots Caused by Oomycetes with Foliar Applications of Phosphorous Acid. **Plant Disease**, v. 88, n. 10, p. 1153–1159, out. 2004.

JUDELSON, H. S.; BLANCO, F. A. The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 47–58, jan. 2005.

KREBS, H. et al. Copper free control of potato late blight in organic potato production? **Agrarforschung Schweiz**, v. 4, n. 5, p. 238–243, 2013.

KÜHNE, S. et al. Pflanzenschutzkonzepte für den Ökologischen Landbau weiterentwickeln – aus der Forschung für die Praxis. **Journal für Kulturpflanzen**, v. 72, n. 7, p. 290–297, 1 jul. 2020a.

KÜHNE, S. et al. Pflanzenschutzkonzepte für den Ökologischen Landbau weiterentwickeln – aus der Forschung für die Praxis. **Journal für Kulturpflanzen**, v. 72, n. 7, p. 290–297, 1 jul. 2020b.

LAL, M. et al. Evaluation of bio-agents and neem based products against late blight disease (*Phytophthora infestans*) of potato. **Indian Phytopathology**, v. 74, n. 1, p. 181–187, mar. 2021.

LE, V. T. et al. Synthesis and antifungal activity of chitosan-silver nanocomposite synergize fungicide against *Phytophthora capsici*. **Journal of Macromolecular Science, Part A**, v. 56, n. 6, p. 522–528, 3 jun. 2019.

LIMA, M. A. et al. *Phytophthora infestans* in a subtropical region: survival on tomato debris, temporal dynamics of airborne sporangia and alternative hosts. **Plant Pathology**, v. 58, n. 1, p. 87–99, 2009a.

LIMA, M. A. et al. *Phytophthora infestans* in a subtropical region: survival on tomato debris, temporal dynamics of airborne sporangia and alternative hosts. **Plant Pathology**, v. 58, n. 1, p. 87–99, 2009b.

LOTTER, D. W. Organic Agriculture. **Journal of Sustainable Agriculture**, v. 21, n. 4, p.

59–128, abr. 2003.

LOZADA, M. I. O. et al. Essential oils in the control of *Colletotrichum gloeosporioides* f. Sp. cepae in onion seeds. **Revista Ciência Agronômica**, v. 50, n. 3, p. 510–518, set. 2019.

MALIK, T. et al. Nutmeg nutraceutical constituents: In vitro and in vivo pharmacological potential. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. n/a, n. n/a, p. e15848, 2 ago. 2021.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa MAPA nº 46 de 06/10/2011. 2011.

MCGOWAN, J.; BYRNE, K. P.; FITZPATRICK, D. A. Comparative Analysis of Oomycete Genome Evolution Using the Oomycete Gene Order Browser (OGOB). **Genome Biology and Evolution**, v. 11, n. 1, p. 189–206, 1 jan. 2019.

MCGOWAN, J.; FITZPATRICK, D. A. Recent advances in oomycete genomics. In: **Advances in Genetics**. Amsterdam: Elsevier, 2020. v. 105p. 175–228.

MEIJER, H. J. G. et al. *Phytophthora infestans* small phospholipase D-like proteins elicit plant cell death and promote virulence. **Molecular Plant Pathology**, v. 20, n. 2, p. 180–193, 1 fev. 2019.

MILLER, P. V-8 juice agar as a general-purpose medium for fungal and bacteria. **Phytopathology**, v. 45, p. 461–462, 1955.

MING, K. et al. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. **International journal of food microbiology**, v. 144, n. 1, 15 nov. 2010.

MIZUBUTI, E. S. G.; AYLOR, D. E.; FRY, W. E. Survival of *Phytophthora infestans* sporangia exposed to solar radiation. **Phytopathology**, v. 90, n. 1, p. 78–84, 2000.

MNG'ONG'O, M. et al. Toxic metals in East African agro-ecosystems: Key risks for sustainable food production. **Journal of Environmental Management**, p. 16, 2021.

MULUGETA, T. et al. Botanicals and plant strengtheners for potato and tomato cultivation in Africa. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 19, n. 2, p. 406–427, 1 fev. 2020.

NECHWATAL, J.; ZELLNER, M. Potential suitability of various leaf treatment products as copper substitutes for the control of late blight (*Phytophthora infestans*) in organic potato farming. **Potato Research**, v. 58, n. 3, p. 261–276, set. 2015a.

NECHWATAL, J.; ZELLNER, M. Potential suitability of various leaf treatment products as copper substitutes for the control of late blight (*Phytophthora infestans*) in organic potato farming. **Potato Research**, v. 58, n. 3, p. 261–276, 1 set. 2015b.

NEDA, N. et al. Biocidal activity of plant-derived compounds against *Phytophthora infestans*: An alternative approach to late blight management. **Crop Protection**, v. 138, p. 105315, 1 dez. 2020.

O'CONNELL, R. J.; PANSTRUGA, R. Tête à tête inside a plant cell: establishing compatibility between plants and biotrophic fungi and oomycetes. **New Phytologist**, v. 171, n. 4, p. 699–718, 1 set. 2006.

OH, J.-W.; CHUN, S. C.; CHANDRASEKARAN, M. Preparation and in vitro characterization of chitosan nanoparticles and their broad-spectrum antifungal action compared to antibacterial activities against Phytopathogens of tomato. **Agronomy**, v. 9, n. 1, p. 21, jan. 2019.

O'HERLIHY, E. A.; DUFFY, E. M.; CASSELLS, A. C. The effects of arbuscular mycorrhizal fungi and chitosan sprays on yield and late blight resistance in potato crops from microplants. **Folia Geobotanica**, v. 38, n. 2, p. 201–207, jun. 2003.

PASSOS, S. **Desempenho de cultivares de batata em sistema orgânico: crescimento, produtividade e resposta a requeima e a larva alfinete**. Guarapuava: Universidade Estadual do Centro Oeste, 2016.

PURWANTISARI, S. et al. Systemic inducing resistance against late blight by applying antagonist *Trichoderma Viride*. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1025, n. 1, p. 012053, 1 maio 2018.

QUINTANILLA, P.; ROHLOFF, J.; IVERSEN, T.-H. Influence of essential oils on *Phytophthora infestans*. **Potato Research**, v. 45, n. 2–4, p. 225–235, dez. 2002.

RADWAN, M. M. et al. Antifungal compounds from turmeric and nutmeg with activity against plant pathogens. **Fitoterapia**, v. 99, p. 341–346, dez. 2014.

REGANOLD, J. P.; WACHTER, J. M. Organic agriculture in the twenty-first century. **Nature Plants**, v. 2, n. 2, p. 1–8, 3 fev. 2016.

REIS, A.; RIBEIRO, F. H. S.; MIZUBUTI, E. S. G. Caracterização de isolados de *Phytophthora infestans* do Distrito Federal e de Goiás. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 270–276, jun. 2006.

RICHARDS, T. A. et al. Evolution of Filamentous Plant Pathogens: Gene Exchange across Eukaryotic Kingdoms. **Current Biology**, v. 16, n. 18, p. 1857–1864, set. 2006.

RODIANAWATI, I.; HASTUTI, P.; CAHYANTO, M. N. Nutmeg's (*Myristica Fragrans* Houtt) oleoresin: effect of heating to chemical compositions and antifungal properties. **Procedia Food Science**, The First International Symposium on Food and Agro-biodiversity Conducted by Indonesian Food Technologists Community. v. 3, p. 244–254, 1 jan. 2015.

SANTOS, R. **Crescimento, severidade de requeima e produtividade de cultivares de batata sob adubação orgânica e mineral**. Dissertação em Produção Vegetal—Guarapuava: Universidade Estadual do Centro Oeste, 2017.

SATHIYABAMA, M.; MUTHUKUMAR, S. Chitosan guar nanoparticle preparation and its in vitro antimicrobial activity towards phytopathogens of rice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 153, p. 297–304, jun. 2020.

SAVILLE, A. et al. Fungicide Sensitivity of U.S. Genotypes of *Phytophthora infestans* to Six Oomycete-Targeted Compounds. **Plant Disease**, 29 maio 2015.

SEUFERT, V.; RAMANKUTTY, N.; FOLEY, J. A. Comparing the yields of organic and conventional agriculture. **Nature**, v. 485, n. 7397, p. 229–232, maio 2012.

SHANER, G. The Effect of Nitrogen Fertilization on the Expression of Slow-Mildewing Resistance in Knox Wheat. **Phytopathology**, v. 77, n. 8, p. 1051, 1977.

SILVA, F. B. et al. Chitosan preparations with improved fat-binding capacity. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 138, n. 34, p. 50841, 10 set. 2021.

SILVA, L. F. D. **Capacidade de Deterioração de Cepas de Eucalyptus spp. por Fungos Xilófagos**. Espírito Santo: Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, 2011.

SOUZA, J. L. DE; RESENDE, P. **Manual da horticultura orgânica**. Viçosa - MG: Aprenda Fácil, 2003.

SOUZA DIAS, J. A. C.; IAMAUTI, M. T.; FISCHER, I. H. Doenças da batateira. In: **Manual de fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Hiroshi Kimati, 2020. v. 2p. 125–147.

TAYLOR, M. C. et al. Relative performance of five forecasting schemes for potato late blight (*Phytophthora infestans*) I. Accuracy of infection warnings and reduction of unnecessary, theoretical, fungicide applications. **Crop Protection**, v. 22, n. 2, p. 275–283, mar. 2003.

TÖFOLI, J. G.; DOMINGUES, R.; ZANOTTA, S. Doenças fúngicas da batata. In: **Cultura da batata: pragas e doenças**. São Paulo: [s.n.]. p. 222.

TUITE, J. F. **Plant pathological methods. Fungi and bacteria**. Minneapolis: Burgess Publish Company, 1969.

TURÓCZI, B. et al. *In vitro* and *In vivo* Effect of Poplar Bud Extracts on *Phytophthora infestans*: A New Effective Biological Method in Potato Late Blight Control. **Plants**, v. 9, n. 2, p. 217, fev. 2020a.

TURÓCZI, B. et al. *In vitro* and *In vivo* effect of poplar bud extracts on *Phytophthora infestans*: A new effective biological method in potato late blight control. **Plants**, v. 9, n. 2, p. 217, 8 fev. 2020b.

VAYER, M. DE F. LE. The Potato: a Long History to Fit our Contemporary World. **Potato Research**, v. 60, n. 3–4, p. 223–235, dez. 2017.

WALLER, S. B. et al. Plants from Lamiaceae family as source of antifungal molecules in humane and veterinary medicine. **Microbial Pathogenesis**, v. 104, p. 232–237, mar. 2017.

WHITTAKER, R. H.; MARGULIS, L. Protist classification and the kingdoms of organisms. **Biosystems**, v. 10, n. 1–2, p. 3–18, 1 abr. 1978.

YAN, H. et al. Antagonistic activity of *Bacillus velezensis* SDTB038 against *Phytophthora infestans* in potato. **Plant Disease**, p. PDIS-08-20-1666-RE, 11 nov. 2020.

ZADOKS, J. C. The Potato Murrain on the European Continent and the Revolutions of 1848. **Potato Research**, v. 51, n. 1, p. 5–45, 1 mar. 2008.

ZANOTTA, S. **Caracterização da população de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary em regiões produtoras de batata (*Solanum tuberosum* L.) no Brasil**. São Paulo: Instituto Biológico, 2019.

ZHANG, S.; PANACCIONE, D. G.; GALLEGLY, M. E. Metalaxyl Stimulation of Growth of Isolates of *Phytophthora infestans*. **Mycologia**, v. 89, n. 2, p. 289, mar. 1997.

ZHENG, K. et al. Efficiency of chitosan application against *Phytophthora infestans* and the activation of defence mechanisms in potato. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 182, p. 1670–1680, jul. 2021a.

ZHENG, K. et al. Efficiency of chitosan application against *Phytophthora infestans* and the activation of defence mechanisms in potato. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 182, p. 1670–1680, 1 jul. 2021b.

ZHU, W. et al. Limited sexual reproduction and quick turnover in the population genetic structure of *Phytophthora infestans* in Fujian, China. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 10094, 13 maio 2015.

CAPÍTULO I

4. TÉCNICA PARA ISOLAMENTO E MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Phytophthora infestans*

4.1 Resumo

O oomiceto *Phytophthora infestans* é um dos principais problemas fitossanitários dos produtores de batata. Os oomicetos são morfologicamente parecidos com os fungos verdadeiros, porém são do agrupamento das algas sendo que o processo de isolamento *in vitro* desse patógeno é difícil. O objetivo deste trabalho foi descrever técnica simples de isolamento *in vitro* desse oomiceto. O processo inicia-se com a identificação de plantas de batata com sintomas e sinais de lesões do patógeno. As lesões foliares novas são higienizadas com água corrente por 30 minutos. Na sequência tubérculos de batata sadios são lavados com detergente neutro. Depois de limpos os tubérculos são passados em álcool (96%) e no fogo para complementar a limpeza superficial. Em seguida, corta-se rodela de cerca de 4 mm do tubérculo. Prepara-se cortes pequenos do tecido foliar, entre as lesões e o tecido sadio das folhas. Esses cortes de folhas são colocados dentro de placas de Petri esterilizadas e as rodela de batata são sobrepostas sobre elas. As placas são seladas com filme plástico e levadas para BOD a 18 °C no escuro por 5 dias. A partir desse período é possível visualizar o crescimento de micélio ralo de cor branca sobre as rodela de batata. Com alça de Drigalski o micélio visível é transferido para placa de Petri com meio de cultura de centeio. Após cerca de 8 a 9 dias a placa estará tomada pelo crescimento micelial de *P. infestans*. A esporulação depois do preenchimento da placa foi de 1,79 esporângios x 10⁴ mL⁻¹ em média, e a germinação de esporângios variou de 69 a 78%. A técnica de isolamento descrita facilita o isolamento *in vitro* de *P. infestans*, contribuindo para as pesquisas dessa importante doença.

Palavras-chave: Hemibiotrófico, Laboratório, Produção massiva de inóculo.

4.2 Abstract

The oomycete *Phytophthora infestans* is one of the main disease problems for potato growers. Oomycetes are morphologically similar to true fungi, but belong to the algae grouping, and the process of *in vitro* isolation of this pathogen is difficult. The objective of this work was to describe a simple technique to isolate this oomycete *in vitro*. The process begins with the identification of potato plants with symptoms and signs of lesions of the pathogen. Young leaf lesions are sanitized with tap water for 30 minutes. In sequence, healthy potato tubers are washed with neutral detergent. After cleaning, the tubers are cleansed in alcohol (96%) and in fire to complement the surface cleaning. Next, about 4 mm tuber slices are cut. Then small lesion cuts between diseased and healthy leaf tissue are made. These leaf cuttings are placed in sterilized Petri dishes, and the potato slices are placed on top of them. The plates are sealed with plastic film and placed in a BOD chamber at 18 °C in the dark for 5 days. After this period, it is possible to see a white sparse mycelium growth on top of the potato slices. With a Drigalski loop the visible mycelium is transferred to a Petri dish with rye culture medium. Within 8 to 9 days the plate is filled with *P. infestans* mycelial growth. The average sporulation potential after filling the plate was $1.79 \text{ sporangia} \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$, and the sporangia germination ranged from 69 to 78%. The isolation technique described facilitates the *in vitro* isolation of *P. infestans*, contributing to research on this important disease.

Keywords: Hemibiotrophic, Laboratory, Massive inoculum production.

4.3 Introdução

O oomiceto *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary é responsável pela doença foliar mais destrutiva da cultura da batata na região sul do Brasil (CASA-COILA et al., 2020). Além disso, isolados recentes de *P. infestans* estão se mostrando insensíveis a muitas moléculas de fungicidas (SAVILLE et al., 2015).

A requeima da batata ficou mundialmente conhecida por causar indiretamente inúmeras mortes e colapso na população irlandesa que ficou sem seu alimento base, a batata, levando a diminuição de cerca de um quarto da população desse país em meados do século XIX (ZADOKS, 2008). Todavia, essa doença persiste até a atualidade, sendo grande problema para os bataticultores.

Os oomicetos são morfologicamente parecidos com os fungos verdadeiros, porém estudos atuais revelam que eles vieram das profundezas dos mares, e o parasitismo é adaptação que está enraizada na espécie. Esses seres são eucariontes e possuem flagelos, atualmente fazem parte do reino Straminopila juntamente com as algas (BEAKES; GLOCKLING; SEKIMOTO, 2011). *Phytophthora infestans* quando está sob condições naturais agrícolas é patógeno hemibiotrófico (FRY, 2008). Patógeno hemibiotrófico, inicialmente colonizam planta viva, ou seja, possuem fase biotrófica, e depois de um tempo coloniza novas células levando-as a morte. Outra característica de patógenos hemibiotrófico é que seus primeiros sintomas aparecem cerca de dois dias após a infecção (O'CONNELL; PANSTRUGA, 2006). Na penetração foliar esse patógeno vai romper a cutícula vegetal, depois o micélio invade as células intracelulares, enquanto ocorre a formação do haustório nas células do mesófilo (MEIJER et al., 2019). No tecido infectado vai crescer estruturas de reprodução assexuada, os esporangióforos que podem produzir cerca de 300.000 esporângios por lesão (FRY, 2008).

O intuito de se isolar um patógeno é obter cultura pura, para conseguir realizar estudos de morfologia, taxonomia, testes de resistência a fungicidas, fisiologia, reprodução, entre outros (ALFENAS; MAFIA, 2016). De maneira geral, quando se fala em isolamento de fungos fitopatogênicos, logo se pensa em isolamento direto ou indireto que são as duas técnicas mais utilizadas em fitopatologia. O isolamento direto, basicamente consiste em raspar levemente estruturas do patógeno como esporângios ou hifas que estão sob o tecido lesionado e passar para placa de Petri com meio de cultura adequado. Caso o tecido não possua esporulação ativa ou micélio visível, pode-se deixar as folhas ou qualquer parte da

planta que esteja infectada em câmara úmida para que o tecido forme estruturas reprodutivas e assim possa ser passado para o meio de cultura (SILVA, 2011).

O isolamento indireto exige mais trabalho e consiste em cortar pequenos fragmentos de mais ou menos 4 mm de tecido foliar entre o tecido infectado e o tecido sadio. Esse fragmento é higienizado com hipoclorito de sódio, álcool e água destilada autoclavada, para então ser transpassado para placa de Petri com meio de cultura (SILVA, 2011).

O meio de cultura além de fornecer nutrientes aos patógenos, deve atender requisitos de pH, pressão osmótica, umidade, temperatura e atmosfera propícios para o desenvolvimento do patógeno fora do seu ambiente natural. Os meios de cultura vão variar de acordo com o patógeno que se trabalha, havendo grande quantidade de receitas. Os meios também podem variar entre líquidos e sólidos, sintéticos e naturais e são vertidos em tubos de ensaio ou em placas de Petri para repicagem de patógenos (TUIE, 1969).

O termo patógeno quase obrigatório significa que *P. infestans* necessita de partes vivas da planta para conseguir sobreviver (O'CONNELL; PANSTRUGA, 2006). Essa característica dificulta o isolamento desses patógenos para a realização de testes e pesquisas *in vitro* e *in vivo*. Apesar da importância da *P. infestans*, são poucas as informações disponíveis na literatura sobre técnicas para seu isolamento.

O objetivo desse trabalho é descrever técnica de isolamento e multiplicação *in vitro* de *P. infestans*.

4.4 Técnicas de isolamento

A técnica foi realizada em laboratório no período de dezembro de 2020 e janeiro de 2021. As plantas com sintomas da doença foram coletadas no distrito de Entre Rios, município de Guarapuava-PR. As plantas com sintomas de requeima coletadas eram da cultivar Agata (suscetível a requeima), e foram coletadas em lavoura de batata orgânica.

Os materiais autoclavados (20 minutos, 120 °C) utilizados na técnica foram: facas, placas de Petri (70 mm), Beckers de 600 mL, pinça e bisturi. Enquanto o material era autoclavado, separou-se em Becker as folhas com presença de requeima, colocando-as dentro do Becker, fechando-as com camada de gaze e prendendo-a com elástico para que as folhas não extravasem do recipiente. Posteriormente, colocou-se o Becker inclinado sob água corrente por 30 minutos (Figura 1A), observando as folhas girando no interior do recipiente, processo que auxilia na desinfestação mais grosseira das folhas de batata com inóculo de *P.*

infestans já que a utilização de desinfetantes normais, como hipoclorito de sódio, diminui muito a viabilidade das partes vegetativas do microrganismo. As folhas limpas foram colocadas em placa de Petri, cortando-as em pedaços de cerca de 4 mm, transversalmente à borda da lesão, entre o tecido sadio e o tecido lesionado, deixando-se a parte maior com o tecido ainda verde e menor do tecido morto, pois é a área com maior atividade do patógeno. Em placa de Petri esterilizada colocou-se de 3 a 4 fragmentos dessas folhas, tampando a placa até a próxima etapa.

Tubérculos comerciais de batata, grandes e sem lesões na epiderme, foram lavados com auxílio de detergente neutro e secando com papel toalha, reservando-os. Dois Beckeres autoclavados, adicionou-se álcool 70% em um, e álcool 96% no outro. Com auxílio de pinça, banhou-se o tubérculo em álcool 96% e flambou-se ligeiramente pela lamparina. Numa placa de Petri e com faca de serra autoclavada e esterilizada no álcool 70%, cortou-se rodela do tubérculo de cerca de 4 mm de espessura (Figura 1B). Essas rodela de batata foram colocadas em cima dos pedaços de folha dentro da placa de Petri (Figura 1C). Continua-se o processo, alternando as facas e esterilizando-as, até finalizar todas as placas com os pedaços de folhas (Figura 1D). Na sequência, as placas foram protegidas com plástico filme e armazenadas em câmara BOD, a 18 °C no escuro. Cerca de cinco dias foram necessários para que a *P. infestans* colonizasse o tecido da batata, que começa a adquirir a cor marrom castanho e micélio ralo da cor branca começa a crescer por cima das rodela do tubérculo (Figura 1E).

Em placas com meio de centeio, raspa-se delicadamente com agulha ou alça de Drigalski o micélio contido em cima do tubérculo e coloca-se no centro da placa, cuidando para não encostar no tubérculo e contaminar a placa. Espera-se a cultura atingir a borda da placa para avaliar os parâmetros morfológicos de produção e viabilidade de esporângios (Figura 1F). O micélio do oomiceto é de coloração branca e inicialmente é mais ralo e fraco.

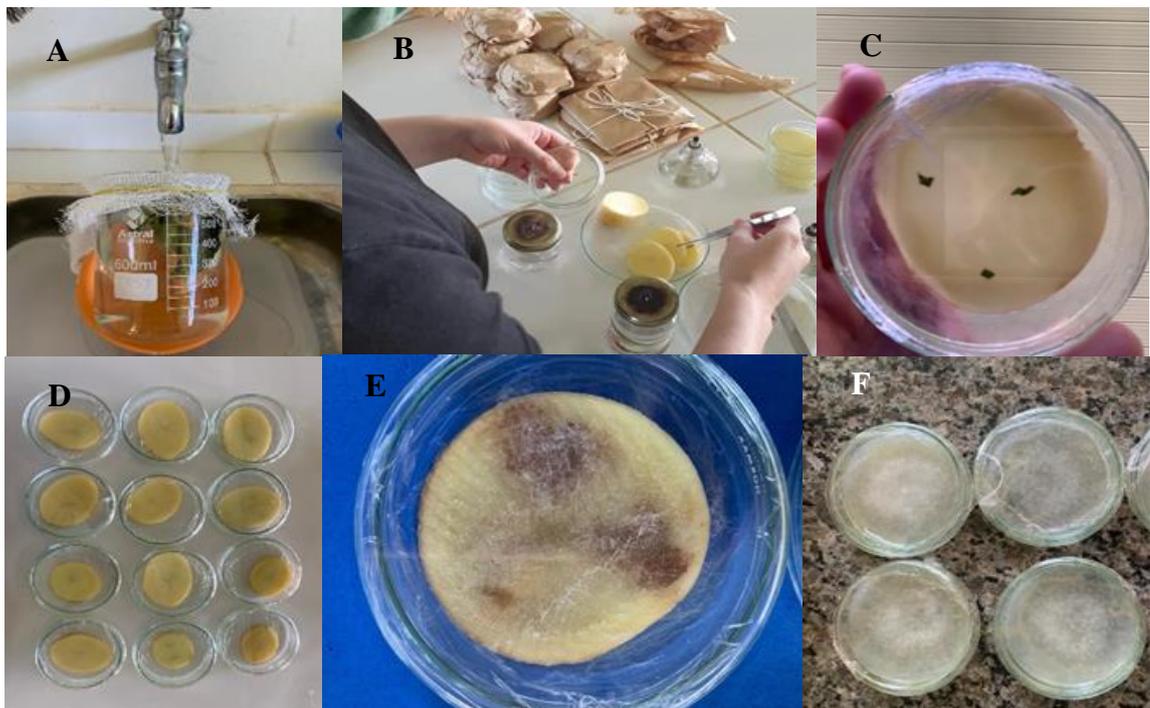


Figura 1. Processo de isolamento de *P. infestans*. (A) Folhas infectadas sendo higienizadas sob fluxo contínuo de água corrente; (B) Corte das rodelas de tubérculos de batata, externamente desinfestado; (C) Pedacos das rodelas de tubérculos alocados em cima das frações das folhas lesionadas; (D) Placas prontas embaladas com plástico filme; (E) Micélio da *P. infestans* invadindo o tecido do tubérculo e saindo na parte superior; (F) Crescimento micelial em placas com meio de cultura de centeio.

4.5. Meio de cultura

Para *P. infestans* os meios de cultura mais relatados na literatura são o V-8 ou suco de tomate, o meio de centeio, e o de caldo de ervilhas. O meio de cultura V-8, foi proposto por Miller (1955), sendo muito usado em diversas metodologias e técnicas para trabalho *in vitro* com *P. infestans*. O método proposto por Fry (2013) propõe a receita do meio de cultura com suco V-8 não clarificado a 10%, para realizar isolamentos de *P. infestans*. Outro meio de cultura relatado por Fry (2013) é o meio de centeio ágar. Esse meio foi elaborado por Caten e Jinks (1968) e é amplamente utilizado para manter e repicar o oomiceto. Dessa forma, o meio de cultura centeio ágar (FRY LAB, 2013) foi o escolhido para este trabalho, por ser meio

mais barato comparado com o V-8, porém se adotam algumas modificações como: utilização da farinha de centeio.

4.6. Armazenamento e repicagem

Quando se está trabalhando com determinado patógeno *in vitro* é necessário fornecer condições ideais para que seu desenvolvimento seja possível, mesmo esse não estando em seu ambiente natural. Dessa forma é importante saber qual a temperatura ótima para armazenamento do patógeno em câmara de crescimento tipo BOD (TUIITE, 1969). É preciso também tomar devido cuidado com a repicagem dos patógenos, para mantê-los em atividade. A repicagem deve ser feita preferencialmente da parte lateral da placa de Petri, local em que há maior atividade metabólica, pois é a parte mais jovem e esporulante (SILVA, 2011; TUIITE, 1969).

A *P. infestans* necessita de temperatura de armazenamento que varia de 18 °C (DORN et al., 2007a) até 20 °C (TURÓCZI et al., 2020a), no escuro. Essas condições favorecem o crescimento *in vitro* do oomiceto em BOD.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, a amostra experimental foi de uma placa, com 4 repetições, realizado em duplicata. Os testes aplicados foram, análise de variância e comparação de médias pelo Tukey a 5%.

4.7. Potencial de produção e multiplicação

Quando o crescimento micelial de *P. infestans* foi realizado em meio de cultura de centeio, em 8 dias se obteve o preenchimento total da placa (n=8). O potencial de crescimento micelial para tomar toda a placa foi de 8 dias, a esporulação do patógeno foi de $1,79 \times 10^4$ esporângios mL⁻¹ e a germinação dos esporângios produzidos foi 73,1% (Tabela 1). A porcentagem de germinação observada foi ligeiramente inferior ao observado por Dorn (2007) que contabilizou germinação de 85% dos esporângios em seu tratamento testemunha (água destilada).

Tabela 1. Número de dias para preenchimento total de placas de Petri (70 mm, CM), potencial de esporulação (ES) e porcentagem de esporângios germinados (GM) de *Phytophthora infestans* isolada pela técnica.

	CM (dias)	ES (x 10 ⁴ mL ⁻¹)	GM (%)
Média	8	1,79	73,1
CV (%)	-	11	8,2

CV: coeficiente de variação, n=8.

Outros métodos de isolamento do oomiceto experimentados não tiveram sucesso. Quando foi utilizado o método direto, não se observou crescimento de *P. infestans* (Figura 2A). Quando se empregou a técnica indireta ocorreu crescimento de vários fungos oportunistas, mas não do oomiceto (Figura 2B).

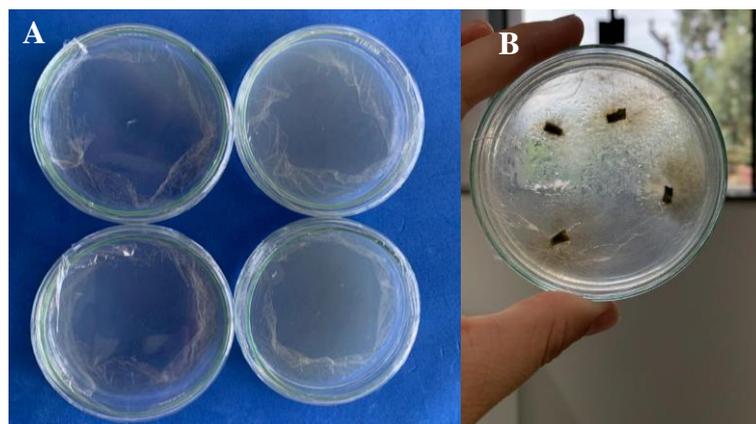


Figura 2. Isolamento direto com micélio de *Phytophthora infestans* após 5 dias (A). Tentativa de isolamento indireto com pedaços de folhas infectadas com *P. infestans* (B).

4.8. Preparo para inoculação em plantas

Placas contendo meio de centeio e cultura de *P. infestans* foram repicadas em placas sem meio de cultura, e sobre esses fragmentos foram colocadas rodela de batatas

higienizadas (Figura 3A). Após cerca de 5 dias observou-se colonização do tecido do tubérculo, formando massa micelial branca (Figura 3B). Na sequência foram adicionados 5 mL de água destilada e autoclavada por placa e com alça de Drigalski realizou-se esfregaço para liberação dos esporângios. Por fim filtrou-se o líquido e a solução foi calibrada com câmara de Neubauer, obtendo-se a suspensão com 1×10^4 esporângios mL^{-1} , para subsequentes inoculações em plantas saudas.

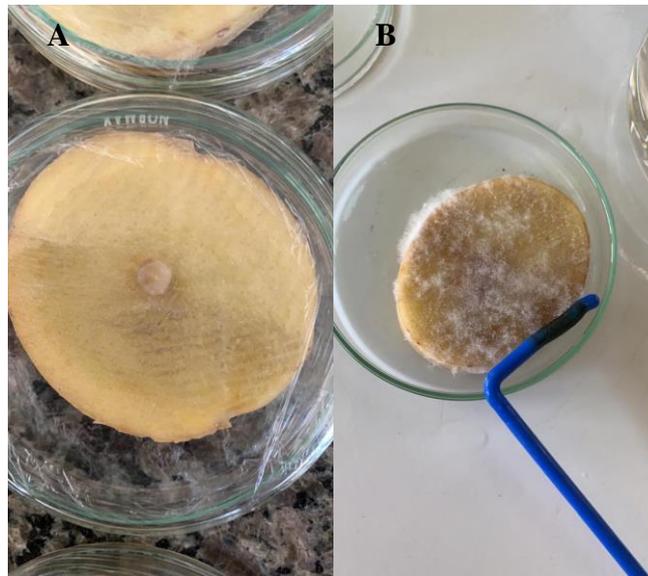


Figura 3. Rodela de batata com fragmento do meio de cultura contendo micélio de *Phytophthora infestans* (A); após 5 dias de incubação a 18 °C no escuro o micélio de *P. infestans* invade o tecido e produz mais inóculo (B).

4.9. Inoculação em casa de vegetação

Para confirmar se a técnica de isolamento daria origem a esporângios viáveis, solução com água destilada autoclavada foi preparada com esporângios na concentração de 1×10^4 mL^{-1} . Essa solução foi borrifada sob plantas de batata da cultivar Ágata em casa de vegetação. Posteriormente as plantas foram mantidas em câmara úmida por 12 horas mantendo microclima favorável ao patógeno. Dois dias após a inoculação os primeiros sintomas começaram a aparecer, comprovando a viabilidade dos isolados *in vitro* de *P. infestans* descritos pela técnica (Figura 4).



Figura 4. Aplicação da suspensão de esporângios de *P. infestans* (A); Início dos primeiros sintomas dois dias após inoculação (B); Cinco dias após inoculação C.

4.10. Conclusão

A técnica descrita é simples, barata e possibilita o isolamento *in vitro* de *P. infestans* sem contaminações.

4.11. Referências bibliográficas

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2016.

BEAKES, G. W.; GLOCKLING, S. L.; SEKIMOTO, S. The evolutionary phylogeny of the oomycete “fungi”. **Protoplasma**, v. 249, n. 1, p. 3-19, 2011.

CASA-COILA, V. H. et al. Characterization of mating type and the diversity of pathotypes of *Phytophthora infestans* isolates from Southern Brazil. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 127, n. 1, p. 43–54, 1 fev. 2020.

CATEN, C. E.; JINKS, J. L. Spontaneous variability of single isolates of *Phytophthora infestans*. I. Cultural variation. **Canadian Journal of Botany**, v. 46, n. 4, p. 329–348, 1 abr. 1968.

DORN, B. et al. Control of late blight in organic potato production: evaluation of copper-free

preparations under field, growth chamber and laboratory conditions. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, n. 2, p. 217–240, 2007a.

FRY LAB. **Biology of Phytophthora infestans and Management of Late Blight – Cornell University – Department of Plant Pathology and Plant-Microbr Biology**. Disponível em: <<http://www.plantpath.cornell.edu/Fry/Protocols-UnclarifiedV8.html>>. Acesso em: 5 ago. 2021.

FRY, W. Phytophthora infestans: the plant (and R gene) destroyer. **Molecular Plant Pathology**, v. 9, n. 3, p. 385–402, 1 maio 2008.

MEIJER, H. J. G. et al. Phytophthora infestans small phospholipase D-like proteins elicit plant cell death and promote virulence. **Molecular Plant Pathology**, v. 20, n. 2, p. 180–193, 1 fev. 2019.

MILLER, P. V-8 juice agar as a general-purpose medium for fungal and bacteria. **Phytopathology**, v. 45, p. 461–462, 1955.

O'CONNELL, R. J.; PANSTRUGA, R. Tête à tête inside a plant cell: establishing compatibility between plants and biotrophic fungi and oomycetes. **New Phytologist**, v. 171, n. 4, p. 699–718, 1 set. 2006.

SAVILLE, A. et al. Fungicide Sensitivity of U.S. Genotypes of Phytophthora infestans to Six Oomycete-Targeted Compounds. **Plant Disease**, 29 maio 2015.

SILVA, L. F. D. **Capacidade de Deterioração de Cepas de Eucalyptus spp. por Fungos Xilófagos**. Espírito Santo: Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, 2011.

TUITE, J. F. **Plant pathological methods. Fungi and bacteria**. Minneapolis: Burgess Publish Company, 1969.

TURÓCZI, B. et al. In Vitro and In Vivo Effect of Poplar Bud Extracts on Phytophthora infestans: A New Effective Biological Method in Potato Late Blight Control. **Plants**, v. 9, n. 2, p. 217, fev. 2020a.

ZADOKS, J. C. The potato murrain on the european continent and the revolutions of 1848.
Potato Research, v. 51, n. 1, p. 5–45, 1 mar. 2008.

CAPÍTULO II

5. INIBIÇÃO *IN VITRO* DE *Phytophthora infestans* POR SUBSTÂNCIAS ALTERNATIVAS

5.1 Resumo

Atualmente apontada como principal dificuldade de produção de batata, a *Phytophthora infestans* é um patógeno de difícil controle. Para a agricultura orgânica o uso de caldas a base de cobre se torna crucial na proteção da planta, porém, estudos recentes mostram que quando aplicado em altas quantidades o cobre pode ser tóxico às plantas e ao ser humano. O objetivo do trabalho foi testar substâncias promissoras a substituir o uso de caldas a base de cobre no cultivo de batata orgânica. Para isso, foram realizados testes *in vitro* com: calda bordalesa (testemunha positiva), água destilada (testemunha negativa), ácido fosfórico, óleos essenciais de tomilho, manjeriço e noz moscada, extratos alcoólicos de malva e sálvia, quitosana convencional e quitosana em nanopartículas, em diferentes doses. Além dessas substâncias, foram testadas o efeito de seus diluentes: tween, álcool de cereal 70% e ácido acético. A maioria dos tratamentos testados controlaram 100% do crescimento micelial em alguma das doses testadas, exceto manjeriço e quitosana que inibiram entre 70 e 80%. Como esperado o controle negativo, com água destilada, não ofereceu inibição ao crescimento do patógeno. Para a análise de esporulação, quitosana em nanopartículas, sálvia, noz moscada, malva, ácido fosfórico, tomilho, quitosana e manjeriço resultaram em baixa esporulação. A água destilada forneceu, como esperado a maior esporulação. Por fim, no teste de porcentagem de germinação de esporângios o tratamento que resultou em menor germinação foi a quitosana em nanopartículas. Conclui-se que nos testes *in vitro* as substâncias quitosana em nanopartículas e convencional, sálvia, noz moscada, malva, ácido fosfórico, tomilho e manjeriço, além da calda bordalesa, impedem o crescimento ou a multiplicação de *P. infestans*. Na sequência, deve-se realizar testes *in vivo* para verificar o desempenho a campo desses produtos.

Palavras-chave: Fitossanidade, Manejo, Oomiceto.

5.2 Abstract

Currently pointed out as the main difficulty in potato production, *Phytophthora infestans* is a pathogen difficult to control. For organic agriculture the use of copper-based mixture is crucial in protecting the plant, however, recent studies show that when applied in high quantities copper can be toxic to plants and humans. The objective of this work was to test promising substances to replace the use of copper-based mixtures in organic potato cultivation. For this, *in vitro* tests were performed with: Bordeaux mixture (positive control), distilled water (negative control), phosphoric acid, essential oils of thyme, basil and nutmeg, alcoholic extracts of mallow and sage, conventional chitosan and chitosan in nanoparticles, at different doses. Besides these substances, the effect of their diluents: tween, cereal alcohol 70% and acetic acid were tested. Most of the tested treatments inhibited 100% of the mycelial growth in some of the tested doses, except basil and chitosan, which inhibited between 70 and 80%. As expected, the negative control, with distilled water, offered no restriction to mycelial growth. For the sporulation analysis, chitosan in nanoparticles, sage, nutmeg, mallow, phosphoric acid, thyme, chitosan and basil resulted in low sporulation. The distilled water produced as expected, the highest sporulation. Finally, in the sporangia germination percentage test, the treatment that resulted in the lowest germination was chitosan in nanoparticles. We conclude that in the *in vitro* tests the substances chitosan in nanoparticles and conventional chitosan, sage, nutmeg, mallow, phosphoric acid, thyme and basil, in addition to Bordeaux mixture, prevent the growth or multiplication of *P. infestans*. Subsequently, *in vivo* tests should be conducted to verify the field performance of these products.

Keywords: Management, Oomycete, Plant health.

5.3 Introdução

A batata é cultura de grande importância mundial, uma vez que é a base da alimentação de diversas populações. A cultura enfrenta, entretanto desafios de produção, como ser suscetível a uma das doenças mais destrutivas de plantas, a requeima da batata, causada pelo oomiceto *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary (NECHWATAL; ZELLNER, 2015b). A requeima da batata ficou conhecida por causar a crise de fome na Irlanda

(AGRIOS, 2005), desde então o controle dessa doença pelos agricultores de batata é grande desafio, principalmente para os que trabalham com sistemas orgânicos de produção (JOHNSON; JORDAN; GEVENS, 2015).

Os benefícios da agricultura orgânica vão desde preservar o meio ambiente, a biodiversidade, até a qualidade dos produtos ao consumidor final (KÜHNE et al., 2020b). Na produção de batata orgânica o cobre é o principal elemento utilizado na produção de caldas, principalmente na proteção das plantas contra *P. infestans*. O meio de controle tradicional é o cobre, porém esse elemento enfrenta dicotomia no sentido de que sua utilização é efetiva para o controle da requeima, porém, seu uso contínuo pode resultar em acúmulo nos lençóis aquáticos (MNG'ONG'O et al., 2021). Em razão disso a partir de 2009 a União Europeia vem implantando diretrizes para diminuir a utilização do cobre (EUROPEAN UNION, 2018a).

A *P. infestans* depois de infectar a planta vai apresentar os primeiros sintomas da doença em 2 a 3 dias, e sob condições favoráveis pode levar a planta a morte em poucos dias (ADOLF et al., 2020). Devido a agressividade as populações de *P. infestans* vêm sendo monitoradas e isso têm revelado que estão em evolução e alguns isolados não são mais controlados de forma eficiente por fungicidas (ADOLF et al., 2020).

Existem trabalhos testando substâncias menos agressivas ao meio ambiente como quitosana na tentativa de indução de resistência (ZHENG et al., 2021b), ou até mesmo a atividade direta na inibição desse patógeno com resultados positivos (HUANG et al., 2021). Outros estudos testaram o uso de substâncias biológicas como *Bacillus* e *Trichoderma* que apresentaram resultados auspiciosos (DORN et al., 2007b). Porém, trabalhos mais conclusivos no Brasil com resultados *in vitro* e *in vivo* ainda não foram amplamente publicados.

O objetivo deste trabalho foi testar substâncias promissoras como possíveis substitutas ao cobre em *P. infestans in vitro*.

5.4 Material e Métodos

5.4.1 Local e período de execução dos experimentos

O experimento *in vitro* foi realizado em laboratório no período de janeiro e fevereiro de 2021. Para escolha das doses ideais de cada tratamento e verificação do efeito do tratamento, foram realizados 3 testes: um de inibição do crescimento micelial, outro de

esporulação e por último, de germinação de esporângios. Utilizou-se 12 substâncias, sendo duas testemunhas, uma positiva com calda bordalesa e outra negativa com água destilada.

5.4.2 Obtenção do patógenos

A obtenção e isolamento *in vitro* do patógeno foi realizada de acordo com a técnica descrita no capítulo 1.

5.4.3 Substâncias testadas

Foram testados extratos de *Salvia officinalis* L. (sálvia) e *Malva silvestris* L. (malva) (DORN et al., 2007b), óleos essenciais de *Thymus vulgaris* L. (tomilho), *Ocimum basilicum* L. (manjeriço) e *Myristica fragrans* (Houtt.) (noz moscada), além de ácido fosfórico, quitosana convencional e quitosana em nanopartícula (NECHWATAL; ZELLNER, 2015a). Os tratamentos utilizados, bem como as doses testadas estão expostos na Tabela 2.

Como testemunha negativa utilizou-se água destilada e como testemunha positiva, calda bordalesa a 2%. Além disso, foram testados diluentes das substâncias testadas: Tween (10%): diluente dos óleos essenciais; ácido acético (1,2%): diluente da quitosana; e álcool (5%): componente principal dos extratos de sálvia e malva.

Tabela 2. Substâncias e concentrações utilizadas.

Substâncias		Doses (%)				
Nome científico	Nome comum					
<i>Salvia officinalis</i> , <i>Malva silvestres</i> , <i>Thymus vulgaris</i> , <i>Ocimum basilicum</i> e <i>Myristica fragrans</i>	Sálvia, Malva, Tomilho, Manjeriço e Noz moscada	0,5	1	2,5	10	
Ácido fosfórico	Ácido fosfórico	0,1	0,5	1	2	
Quitosana	Quitosana	1	2	4	6	8

5.4.4 Testes realizados *in vitro*

O experimento contou com os tratamentos de quitosana em sua forma convencional e em nanopartículas, extratos alcoólicos de sálvia e malva, óleos essenciais de manjeriço, noz moscada, tomilho e ácido fosfórico, além da testemunha positiva (calda bordalesa, SOUZA; RESENDE, 2003) e a testemunha negativa (água destilada). As doses bases do experimento foram escolhidas de acordo com as dosagens já encontradas por outros autores.

As nanopartículas de quitosana foram preparadas com a utilização de trifosfato de sódio (TPP), com a técnica eletrostática entre o grupo amina da quitosana e as cargas negativas do trifosfato. A quitosana foi dissolvida em ácido acético e o TPP em água ultra pura, na sequência misturou-se as duas emulsões e agitou-se mecanicamente, em temperatura ambiente (CALVO et al., 1997).

Este experimento foi composto por testes das substâncias, doses e diluentes supracitados, totalizando 12 substâncias divididas em 32 tratamentos, submetidos a avaliações de crescimento micelial, esporulação e germinação de esporângios. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado com 1 placa por unidade experimental, 4 repetições em duplicata.

O crescimento micelial foi acompanhado seguindo a metodologia usada por Turóczy et al. (2020b) com algumas modificações, a utilização do centeio foi do tipo farinha. As substâncias utilizadas foram incorporadas no meio de centeio. Os meios de cultura com as concentrações dos produtos foram vertidos em placas de Petri e posteriormente discos de micélio de 7 mm foram adicionados sobre as placas com o meio vertido. O crescimento micelial foi avaliado diariamente pelo diâmetro da cultura até quando *P. infestans* atingiu a borda da placa da testemunha negativa (70 mm). Posteriormente foi calculado a porcentagem de inibição do crescimento micelial em relação à testemunha, seguindo a equação de Fokkema (1973):

$$\% \text{ de inibição} = [(\text{crescimento micelial do tratamento} - \text{crescimento micelial da testemunha}) / \text{crescimento micelial da testemunha}] \times 100.$$

Para o teste de esporulação, foram utilizadas as placas do experimento de crescimento micelial com 8 dias. As placas dos tratamentos receberam 5 mL de água destilada e autoclavada, e com alça de Drigalski realizou-se esfregaço sobre o micélio na placa para que os esporângios fossem liberados. Essa suspensão com esporângios foi filtrada com gaze, e foi quantificado o número de esporângios por quadrante na câmara de Neubauer. Para se estimar

a concentração de esporângios, foi usada a seguinte equação:

$$[(\text{número de esporângios dos 4 quadrantes de cima} + 64) + (\text{número de esporângios dos 4 quadrantes de baixo} + 64) / 2 = \text{número de esporângios} \times 10^4 \text{ por mL}]$$

A germinação esporangial foi realizada segundo metodologia adotada por Garcia et al. (2018) com algumas modificações. Essa metodologia consiste na preparação de suspensão padrão de 1×10^4 esporângios mL^{-1} com contagem em câmara de Neubauer. Os tratamentos testados foram os mesmos do crescimento micelial. Alíquotas de 40 μL da suspensão do patógeno mais 40 μL da dose do tratamento foram colocadas em placas ELISA mantidas em câmara de crescimento a 18 °C no escuro por 24 horas. Após esse período adicionou-se corante azul de lactofenol para paralisar a germinação e por fim contabilizou-se a germinação de 100 esporângios com auxílio do microscópio óptico e calculada a porcentagem de esporângios germinados.

Os experimentos foram realizados em duplicata, com 4 repetições, uma placa por unidade experimental, inteiramente casualizado, as análises estatísticas foram de variância e comparação de média por meio do teste de Tukey a 5%.

5.5 Resultados

5.5.1 Teste de doses

Com a realização do experimento de dose foi possível observar que houve efeito nas três variáveis analisadas e em todas as substâncias testadas. Já quando analisado o efeito do experimento e da interação entre dose e experimento, o resultado variou, sendo que para interação, apenas tomilho, noz moscada e sálvia apresentaram significância nos três testes realizados.

Tabela 3. Resultado da análise de variância (anova) da porcentagem de inibição do

crescimento micelial (CM), potencial de esporulação (ES) e porcentagem de esporângios germinados (GM) de *Phytophthora infestans* submetidas a diferentes doses *in vitro* de substâncias em dois experimentos.

Substância	Avaliação	Dose (D)	Exper. (E)	D x E	CV1 (%)	CV2 (%)
Tomilho	CM	**	*	**	7,9	10,0
	ES	**	**	**	4,0	24,5
	GM	**	ns	*	19,9	10,6
Manjericão	CM	**	**	**	17,6	17,0
	ES	**	ns	ns	34,2	26,3
	GM	**	*	*	5,0	11,2
Noz moscada	CM	**	**	**	5,8	5,2
	ES	**	**	**	12,7	29,1
	GM	**	ns	**	11,5	7,7
Ácido Fosfórico	CM	**	**	**	0	0
	ES	**	ns	ns	9,4	22,7
	GM	**	**	ns	4,4	9,7
Quitosana	CM	**	ns	**	11,0	3,0
	ES	**	*	ns	9,3	16,6
	GM	**	ns	*	9,4	7,9
Sálvia	CM	**	*	**	5,5	4,5
	ES	**	ns	**	21,4	21,8
	GM	**	ns	*	6,1	7,4
Malva	CM	**	**	**	7,7	7,6
	ES	**	ns	ns	33,9	27,6
	GM	**	ns	ns	5,3	8,2

ns: diferença estatística não significativa, * e **: diferença estatística significativa a 5% e 1%, respectivamente. CV1 e CV2: coeficiente de variação do primeiro e do segundo experimento, respectivamente.

A partir da dose de 2,5% de óleo essencial de tomilho alcançou-se 100% de inibição do crescimento de *P. infestans*, nos dois experimentos (Figura 5A). No teste de esporulação a mesma dose do óleo essencial inibiu completamente a esporulação (Figura 5B). Porém, nem a maior dose foi 100% eficaz em suprimir a germinação dos esporângios (Figura 5C).

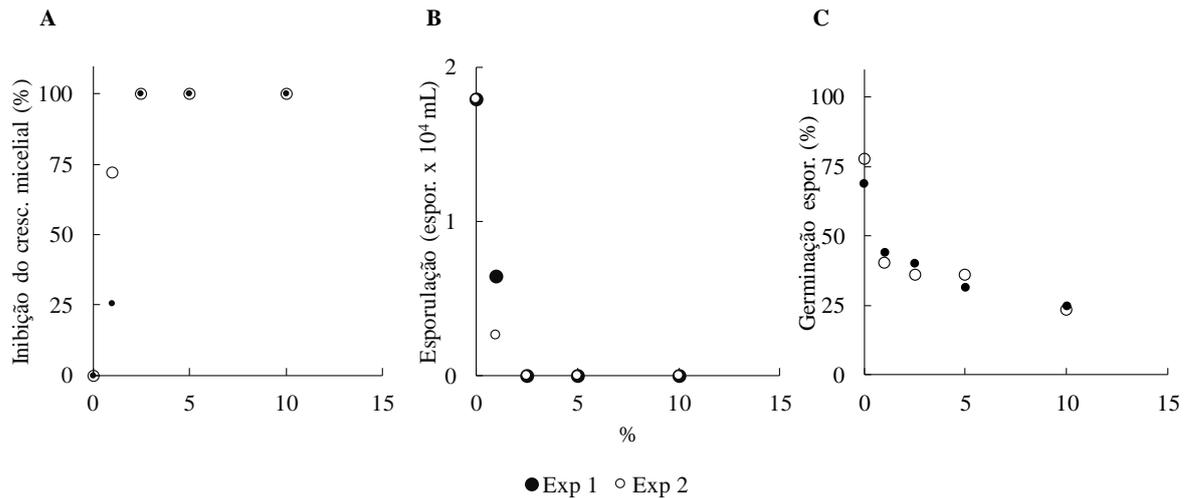


Figura 5. Porcentagem de inibição de crescimento micelial (A), produção de esporângios (B) e porcentagem de germinação de esporângios (C) de *Phytophthora infestans* submetidos a doses *in vitro* de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*).

Nem a dose mais alta de manjeriço testada foi capaz de inibir 100% o crescimento de *P. infestans* (Figura 6A), nem a esporulação (Figura 6B) ou a germinação de esporângios (Figura 6C).

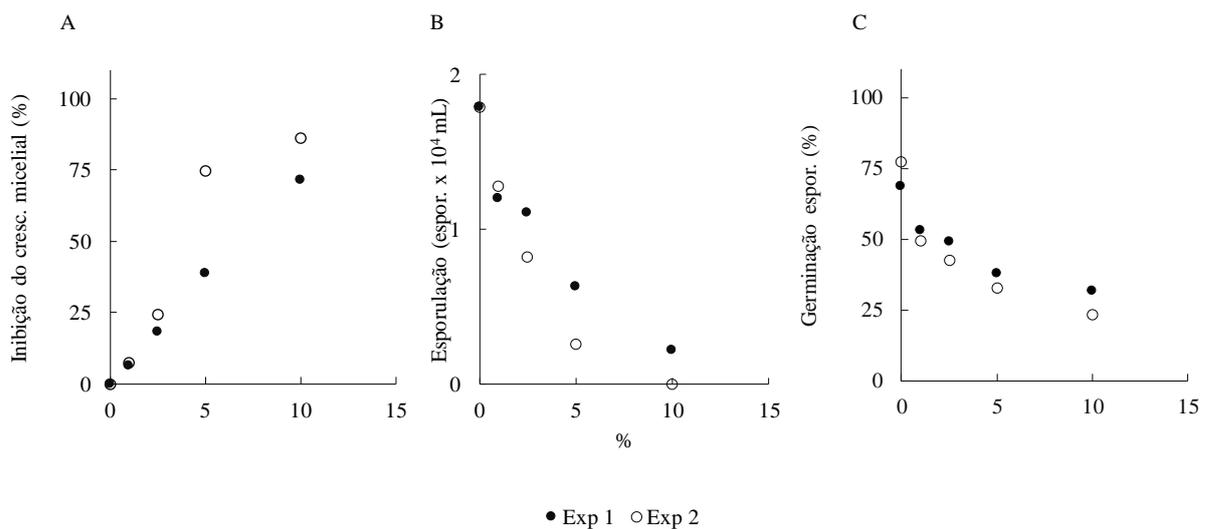


Figura 6. Porcentagem de inibição de crescimento micelial (A), produção de esporângios (B) e porcentagem de germinação de esporângios (C) de *Phytophthora infestans* submetidos a doses *in vitro* de manjeriço (*Ocimum basilicum*).

O óleo essencial de noz moscada inibiu o crescimento de *P. infestans* a partir da dose de 2,5% (segundo experimento) ou 5,0% (primeiro experimento) (Figura 7A). A partir da dose de 2,5% a esporulação foi cessada (Figura 7B). Mesmo na maior dose testada, *P. infestans* germinou 32,5% no experimento 1 e 28,8% no experimento 2 (Figura 7C).

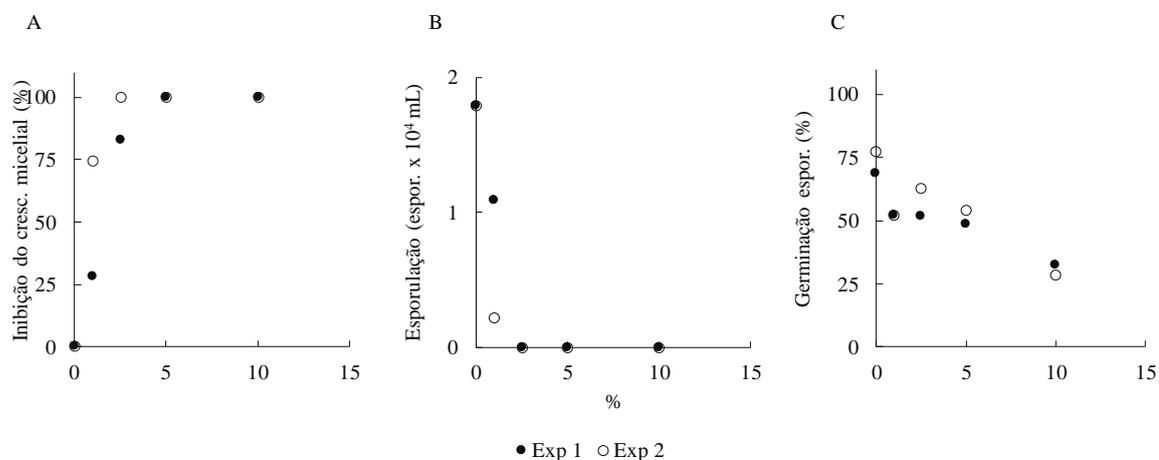


Figura 7. Porcentagem de inibição de crescimento micelial (A), produção de esporângios (B) e porcentagem de germinação de esporângios (C) de *Phytophthora infestans* submetidos a doses *in vitro* de noz moscada (*Myristica fragrans*).

A menor dose testada de ácido fosfórico inibiu em 100% o crescimento micelial (Figura 8A) e a esporulação (Figura 8B) de *P. infestans*. Porém, ao se analisar a germinação de esporângios percebe-se que nem a dose mais alta inibiu completamente a germinação (Figura 8C).

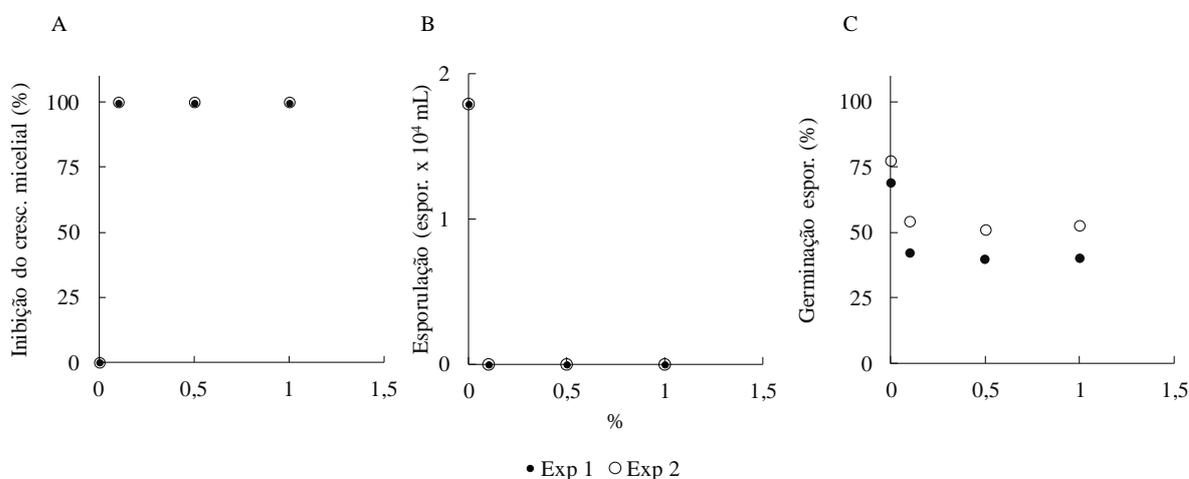


Figura 8. Porcentagem de inibição de crescimento micelial (A), produção de esporângios (B) e porcentagem de germinação de esporângios (C) de *Phytophthora infestans* submetidos a

doses *in vitro* de ácido fosfórico.

Houve diferença entre experimentos no crescimento micelial submetido a quitosana: o experimento 1 apresentou inibição de 83% na dose de 8%, já o segundo inibiu 87% na mesma dose (Figura 9A). A esporulação foi quase totalmente inibida nessa dose (Figura 9B), enquanto a germinação seguiu o padrão dos demais tratamentos, ou seja, não foi completamente inibida nem na maior dose, havendo germinação de 35% dos esporângios (Figura 9C).

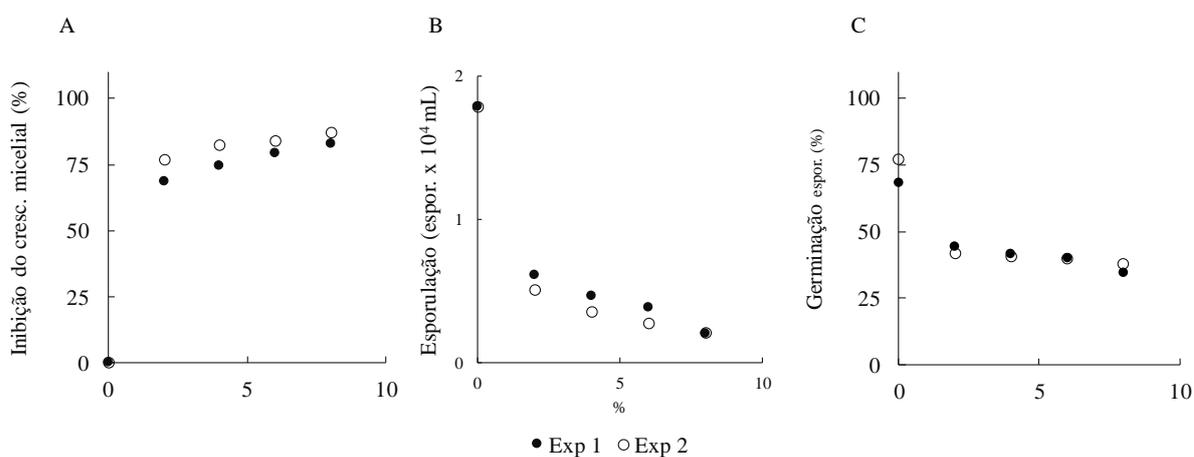


Figura 9. Porcentagem de inibição de crescimento micelial (A), produção de esporângios (B) e porcentagem de germinação de esporângios (C) de *Phytophthora infestans* submetidos a doses *in vitro* de quitosana convencional.

O extrato alcoólico de sálvia inibiu 100% do crescimento micelial na maior concentração (Figura 10A) e a esporulação (Figura 10B) na dose mais alta testada, nos dois experimentos. A porcentagem de esporângios germinados variou entre 41% e 46% na maior dose testada (Figura 10C).

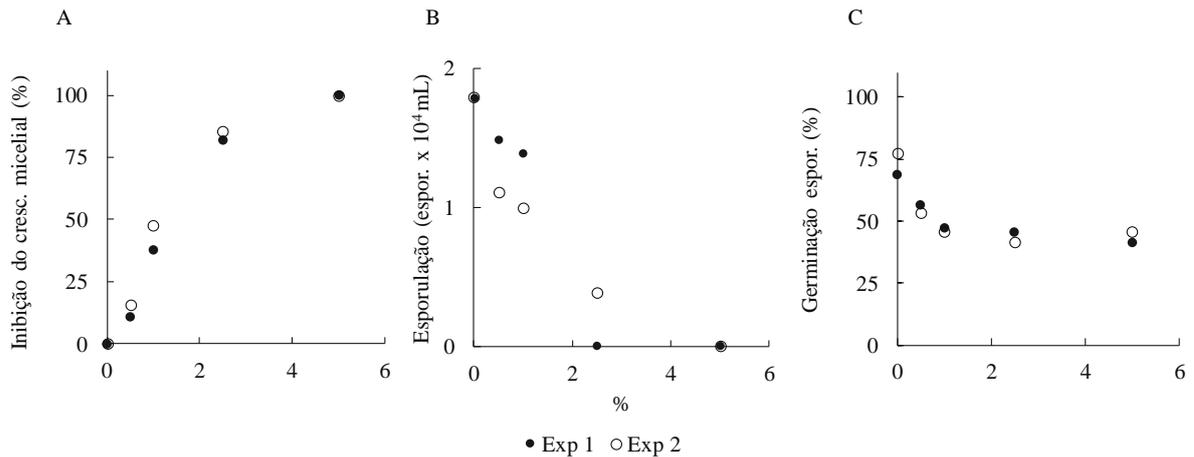


Figura 10. Porcentagem de inibição de crescimento micelial (A), produção de esporângios (B) e porcentagem de germinação de esporângios (C) de *Phytophthora infestans* submetidos a doses *in vitro* de extrato alcoólico de sálvia (*Salvia officinalis*).

O extrato alcoólico de malva inibiu totalmente o crescimento micelial (Figura 11A), assim como a esporulação na concentração de 2,5% (Figura 11B). Por fim a germinação de esporângios foi de 40% na maior dose testada (Figura 11C).

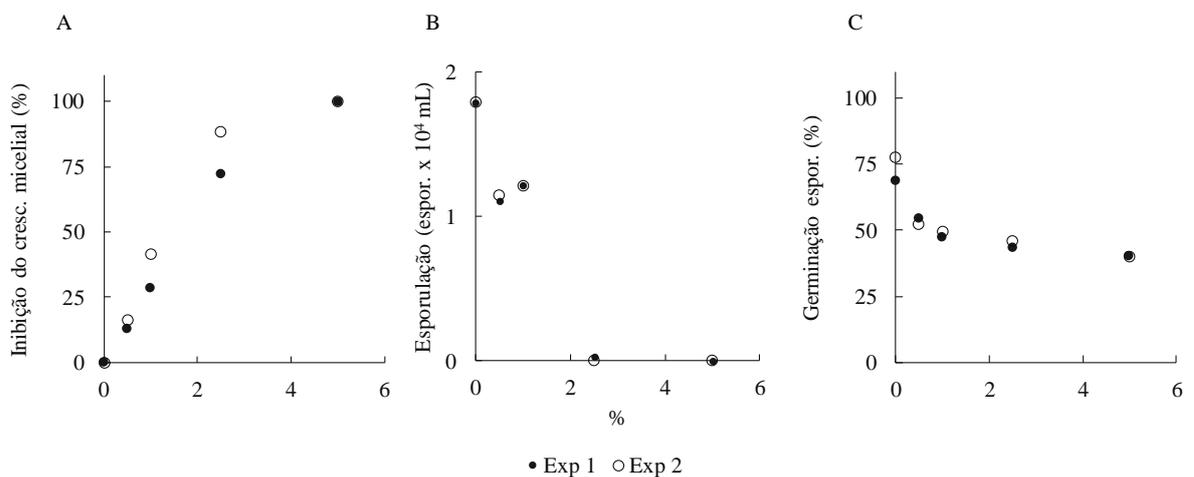


Figura 11. Porcentagem de inibição de crescimento micelial (A), produção de esporângios (B) e porcentagem de germinação de esporângios (C) de *Phytophthora infestans* submetidos a doses *in vitro* de extrato alcoólico de malva (*Malva silvestris*).

As doses de cada tratamento foram escolhidas com base nos melhores resultados dos testes acima, sem desperdícios, sendo; tomilho (2,5%), noz moscada (5%), ácido fosfórico

(0,1%), quitosana (8%), malva (5%) e sálvia (5%), essas foram submetidas a testes de casa de vegetação com os resultados apresentados no capítulo a seguir.

5.5.2. Diluentes das substâncias

Tabela 4. Resultado da análise de variância (anova) da porcentagem de inibição do crescimento micelial (CM), potencial de esporulação (ES) e porcentagem de esporângios germinados (GM) de *Phytophthora infestans* submetidas *in vitro* a diferentes diluentes de substâncias em dois experimentos.

Avaliação	Diluyente (D)	Exper. (E)	D x E	CV1 (%)	CV2 (%)
CM	**	ns	ns	9,06	11,2
ES	**	ns	ns	10,0	24,7
GM	**	ns	ns	9,55	9,46

ns: diferença estatística não significativa, * e **: diferença estatística significativa a 5% e 1%, respectivamente. CV1 e CV2: coeficiente de variação do primeiro e do segundo experimento, respectivamente.

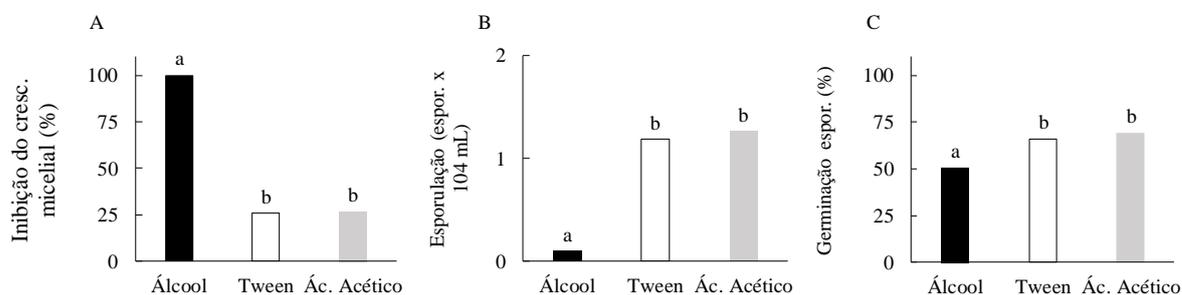


Figura 12. Porcentagem de inibição de crescimento micelial (A), produção de esporângios (B) e porcentagem de germinação de esporângios (C) de *Phytophthora infestans* submetidos a diluentes *in vitro*.

Letras minúsculas comparam experimentos (Tukey, 5%).

Os diluentes não tiveram capacidade de inibir o crescimento micelial (Figura 12A) e a esporulação (Figura 12B), exceto o álcool. A porcentagem de esporângios germinados foi alta, sendo que o álcool foi o diluyente que resultou em menor porcentagem de germinação (Figura 12C).

5.5.3. Comparação do melhor resultado de cada tratamento

Observou-se interação significativa para as análises de crescimento micelial e germinação de esporângios (Tabela 5).

Tabela 5. Resultado da análise de variância para as variáveis crescimento micelial (CM), porcentagem de esporulação (ES) e porcentagem de germinação esporangial (GM) de *P. infestans* submetidas *in vitro* a substâncias alternativas.

Tratamento	CM	ES	GM
Substância (S)	**	**	**
Experimento (E)	ns	ns	Ns
S x E	*	ns	*
CV1	5,99	23,8	13,6
CV2	4,96	33,9	9,33

ns: diferença estatística não significativa, * e **: diferença estatística significativa a 5% e 1%, respectivamente. CV1 e CV2: coeficiente de variação do primeiro e do segundo experimento, respectivamente.

Pode-se observar que os tratamentos tomilho, ácido fosfórico, malva, noz moscada, sálvia e quitosana em nanopartículas resultaram em 100% de inibição do crescimento micelial e não diferiram da testemunha positiva com calda bordalesa (Figura 13). O álcool se comportou de forma semelhante aos tratamentos citados. Os tratamentos manjerição e quitosana convencional ofereceram resultados inferiores aos tratamentos com maior inibição e não diferiram entre si. Tween e ácido acético resultaram em menor inibição de crescimento micelial. Por fim a testemunha negativa, água destilada, como previsto, resultou em menor inibição e diferiu estatisticamente de todos os demais tratamentos. Tween e manjerição tiveram comportamentos diferentes nos experimentos: ofereceram maior inibição no primeiro do que no segundo experimento, enquanto os demais tratamentos tiveram resultados semelhante nos dois experimentos.

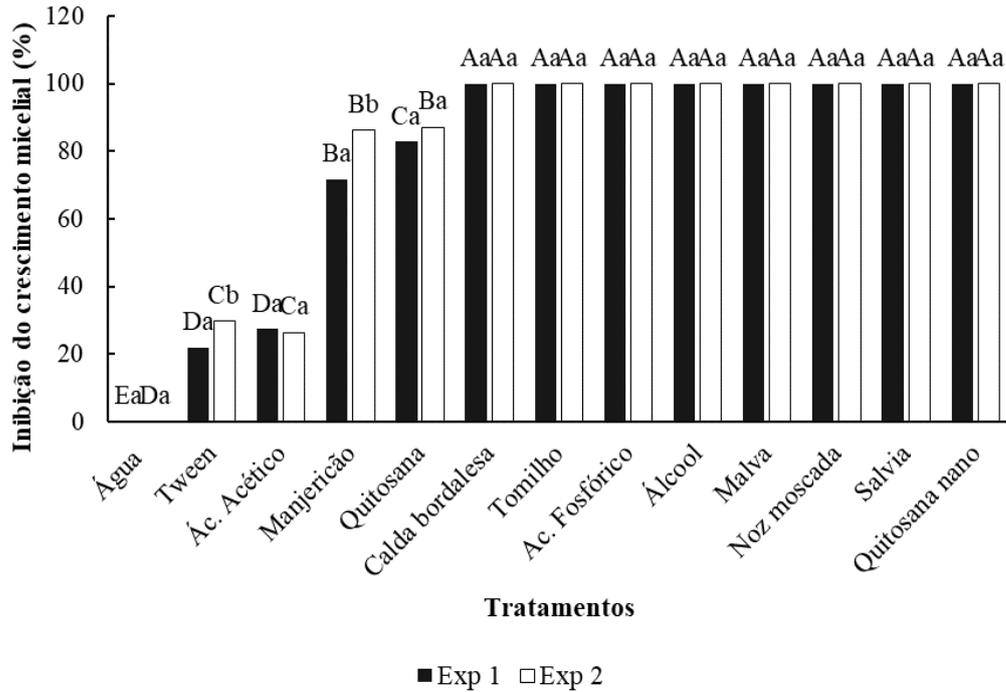


Figura 13. Porcentagem de inibição de crescimento micelial *in vitro* de *Phytophthora infestans* submetida a substâncias alternativas.

Letras maiúsculas comparam produtos e letras minúsculas comparam experimentos, sendo que letras diferentes indicam diferença entre os tratamentos (Tukey, 5%).

A testemunha com água destilada resultou em esporulação mais alta, como esperado (Figura 14). Tween e ácido acético resultaram em alta esporulação, não diferindo entre si, mas diferido dos demais tratamentos. Por fim manjeriço, quitosana, calda bordalesa, tomilho, ácido fosfórico, álcool, malva, noz moscada, sálvia e quitosana em nanopartículas resultaram em menor produção de esporângios, não diferindo entre si.

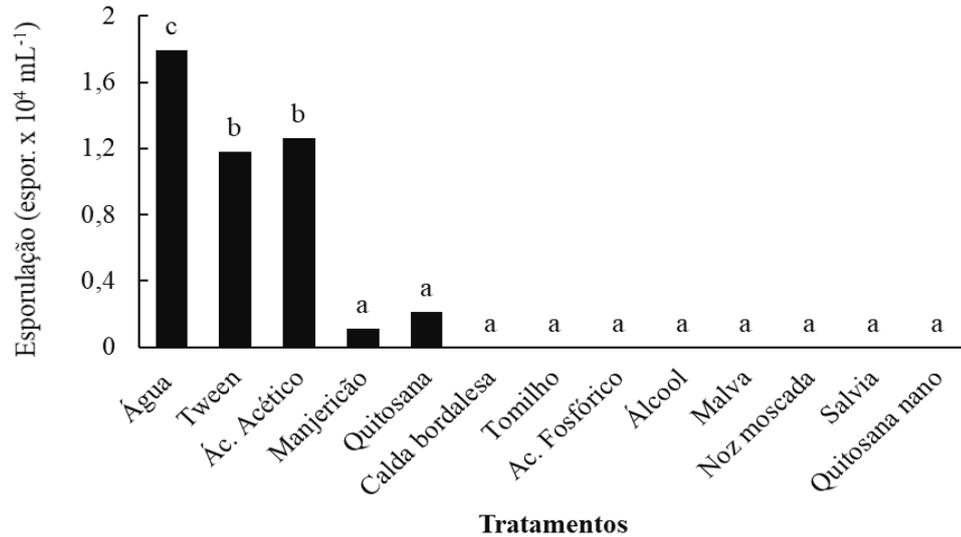


Figura 14. Esporulação *in vitro* de *Phytophthora infestans* submetida a substâncias alternativas.

Letras diferentes indicam diferença entre os tratamentos (Tukey, 5%).

Os tratamentos que resultaram em comportamentos diferentes na porcentagem de esporângios germinados nos dois experimentos foram a água, o ácido acético e o ácido fosfórico (Figura 15). Essas substâncias resultaram em maior porcentagem de esporângios germinados no segundo experimento em relação ao primeiro. O manjeriçao foi diferente: no segundo experimento teve germinação de esporângios menor, ao contrário dos tratamentos anteriores. Apesar da interação significativa, o efeito das substâncias seguiu um padrão: a quitosana em nanopartículas resultou em menor porcentagem de esporângios germinados, na sequência observou-se manjeriçao, quitosana convencional, calda bordalesa, tomilho, malva, ácido fosfórico e sálvia. As testemunhas com água destilada, tween e ácido acético não diferiram entre si e foram os tratamentos que resultaram em maior porcentagem de esporângios germinados.

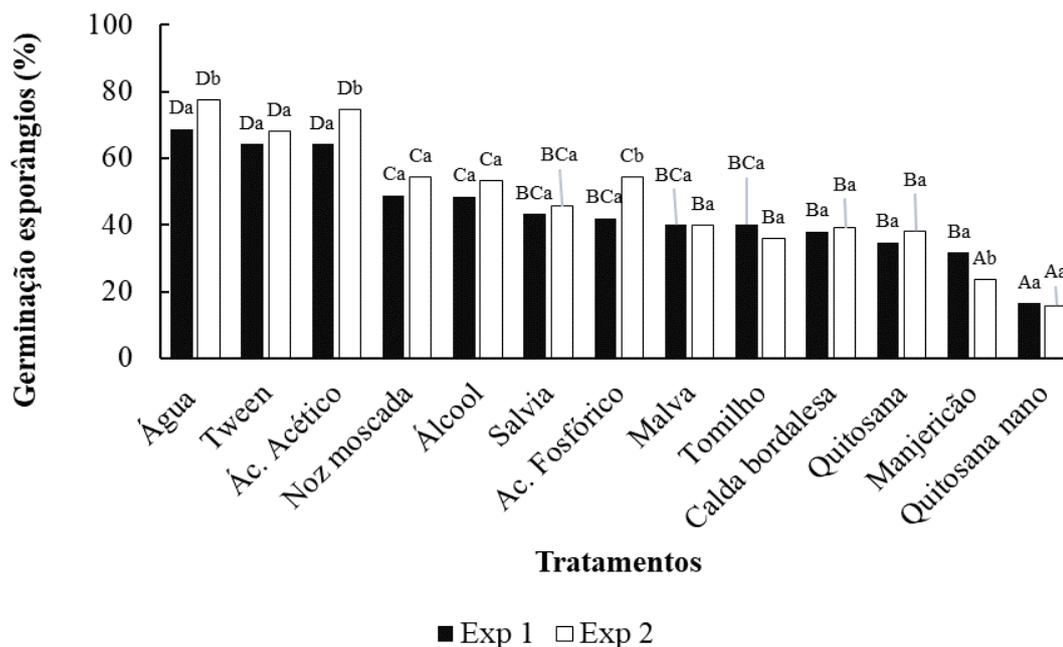


Figura 15. Porcentagem de esporângios germinados *in vitro* de *Phytophthora infestans* submetida a substâncias alternativas.

Letras maiúsculas comparam produtos e letras minúsculas comparam experimentos, sendo que letras diferentes indicam diferença entre os tratamentos (Tukey, 5%).

5.6 Discussão

Este trabalho analisou o potencial *in vitro* de substâncias para substituição do cobre no controle do oomiceto *Phytophthora infestans* em batata orgânica.

De acordo com os resultados avaliados com as substâncias *in vitro* cerca de 76% delas inibiram 80 a 100% do crescimento micelial, assim como 76% das substâncias foram capazes de zerar totalmente a taxa de esporulação. Em experimento semelhante com extratos de plantas e microrganismos realizado por Dorn (2007), apenas 26% das preparações testadas resultou em taxa significativa de inibição da *P. infestans*. Dessa forma, observa-se que o presente estudo resultou em taxa satisfatória de sucesso das substâncias testadas.

Os óleos essenciais possuem ação antimicrobiana com efeito sinérgico ou antagônico. No presente trabalho, o óleo essencial de tomilho, de manjeriçã e noz moscada resultaram em menor crescimento micelial e em 100% de inibição. No trabalho realizado por Neda et al. (2020), tomilho apresentou efeito fungicida em *P. infestans*. Trabalhos de outros autores mostraram a eficiência do óleo essencial de tomilho no controle *in vitro* de *P. capsici* e *P. infestans* (BI et al., 2012; QUINTANILLA; ROHLOFF; IVERSEN, 2002). Esses resultados

corroboram o resultado do presente trabalho. O óleo essencial de manjeriço apresentou resultados positivo nos testes de laboratório do presente estudo. Esse resultado corrobora com resultados semelhantes observados com *C. gloeosporoides* e *P. infestans* ((DORN et al., 2007b; LOZADA et al., 2019) e dá suporte à tese de que esse óleo apresenta efeito antimicrobiano (DINIZ et al., 2020). O óleo essencial de noz moscada foi efetivo em condições *in vitro* contra *P. infestans*. Radwan et al. (2014) testaram esse óleo essencial para o controle de *C. acutatum* J. H. Simmonds (1968), *C. fragariae* A. N. Brooks, (1931), e *C. gloeosporioides* e os resultados positivos obtidos confirmam a eficácia *in vitro* desse óleo (FENG; ZHENG, 2007).

A quitosana e a nanopartícula de quitosana, juntamente com ácido fosfórico e os dois extratos, de sálvia e malva, controlaram *P. infestans* em laboratório. Em desacordo com o presente trabalho, Forrer et al. (2017b) relatam que o ácido fosfórico não se mostrou efetivo no controle *in vitro* do oomiceto. Com bons resultados no presente trabalho, as substâncias quitosana convencional e quitosana em nanopartículas possuem potencial antimicrobiano (NECHWATAL; ZELLNER, 2015b; ZHENG et al., 2021a). No presente trabalho as nanopartículas foram ainda mais promissoras que a quitosana convencional. Autores que desenvolveram trabalhos semelhantes também encontraram resultados semelhantes ao do presente trabalho para a variável crescimento micelial (HUANG et al., 2021). Todavia, para a análise de esporângios germinados o mesmo trabalho supracitado relata germinação de apenas 1,29%, diferente do presente trabalho em que a maior dose testada resultou em 35% de esporângios germinados. As nanopartículas de quitosana foram mais eficientes quando comparadas a convencional provavelmente pelo fato de possuírem maior superfície de contato e maior afinidade com células bacterianas (Ming et al., 2010). As nanopartículas foram capazes de inibir a *P. infestans* no presente trabalho, assim como em trabalhos semelhantes com outros patógenos: *Piricularia grisea* Sacc.1880, *Xanthomonas oryzae* Xoo. (SATHIYABAMA; MUTHUKUMAR, 2020), *Colletotrichum gloeosporoides*, *Phytophthora capsici*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *F. oxysporum* e *G. fujikori* (OH; CHUN; CHANDRASEKARAN, 2019).

Por fim, os dois extratos testados, sálvia e malva também inibiram o desenvolvimento *in vitro* da *P. infestans* corroborando com outros trabalhos (BLAESER et al., 2002; DORN et al., 2007b).

Todos os tratamentos testados, em pelo menos uma das doses testadas, foram eficientes para controlar *in vitro* *P. infestans*, ressaltando que as nanopartículas de quitosana

foram bastante efetivas no controle de *P. infestans* em laboratório, sendo uma das mais promissoras substâncias testadas para testes *in vivo*.

5.7 Conclusão

Os tratamentos quitosana em nanopartículas, sálvia, noz moscada, malva, ácido fosfórico e tomilho foram os mais eficientes no controle do crescimento micelial e na esporulação *in vitro* de *P. infestans*. Para germinação de esporângios os tratamentos que mais inibiram foram quitosana em nanopartículas, manjerição e quitosana.

5.8 Referências bibliográficas

ADOLF, B. et al. Fungal, Oomycete, and Plasmodiophorid Diseases of Potato. In: CAMPOS, H.; ORTIZ, O. (Eds.). **The Potato Crop: Its Agricultural, Nutritional and Social Contribution to Humankind**. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 307–350

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5th ed. Amsterdam; Boston: Elsevier Academic Press, 2005.

BI, Y. et al. Inhibitory Effects of Essential Oils for Controlling *Phytophthora capsici*. **Plant Disease**, v. 96, n. 6, p. 797–803, 1 jun. 2012.

BLAESER, P. et al. **Pflanzeninhaltsstoffe mit fungizider Wirkung**. Nordrhein-Westfalen Bonn: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn Landwirtschaftliche Fakultät, 2002.

DINIZ, L. D. DO et al. Bioactive Natural Compounds and Antioxidant Activity of Essential Oils from Spice Plants: New Findings and Potential Applications. **Biomolecules**, v. 10, n. 7, p. 988, 1 jul. 2020.

DORN, B. et al. Control of late blight in organic potato production: evaluation of copper-free preparations under field, growth chamber and laboratory conditions. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, n. 2, p. 217–240, 4 set. 2007b.

EUROPEAN UNION. Commission implementing regulation (EU) 2018/1981 - of 13 december 2018 - renewing the approval of the active substances copper compounds, as

candidates for substitution, in accordance with regulation (EC) no 1107 / 2009 of the European parliament and of the council concerning the placing of plant protection products on the market, and amending the annex to commission implementing regulation (EU) no 540/2011. 2018 a, p. 5.

FENG, W.; ZHENG, X. Essential oils to control *Alternaria alternata* *in vitro* and *in vivo*. **Food Control**, v. 18, n. 9, p. 1126–1130, set. 2007.

FOKKEMA, N. J. The rôle of saprophytic fungi in antagonism against *Drechslera sorokiniana* (*Helminthosporium sativum*) on agar plates and on rye leaves with pollen. **Physiological Plant Pathology**, v. 3, n. 2, p. 195–205, abr. 1973.

FORRER, H.-R.; VOGELGSANG, S.; MUSA, T. Botanicals and Phosphonate Show Potential to Replace Copper for Control of Potato Late Blight. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 4, p. 65, dez. 2017b.

GARCIA, C. et al. Antimicrobial activity of *Agaricus brasiliensis* on *Plasmopara viticola* and its effect on the induction of resistance to the control of downy mildew on ‘Isabel Precoce’. **Plant Pathology**, v. 85, n. 0, 23 ago. 2018.

HUANG, X. et al. Antifungal activity of chitosan against *Phytophthora infestans*, the pathogen of potato late blight. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 166, p. 1365–1376, 1 jan. 2021.

JOHNSON, A. C. S.; JORDAN, S. A.; GEVENS, A. J. Efficacy of Organic and Conventional Fungicides and Impact of Application Timing on Control of Tomato Late Blight Caused by US-22, US-23, and US-24 Isolates of *Phytophthora infestans*. **Plant Disease**, v. 99, n. 5, p. 641–647, 2015.

KÜHNE, S. et al. Pflanzenschutzkonzepte für den Ökologischen Landbau weiterentwickeln – aus der Forschung für die Praxis. **Journal für Kulturpflanzen**, v. 72, n. 7, p. 290–297, 1 jul. 2020b.

LOZADA, M. I. O. et al. Essential oils in the control of *Colletotrichum gloeosporioides* f. Sp. cepae in onion seeds. **Revista Ciência Agronômica**, v. 50, n. 3, p. 510–518, set. 2019.

MING, K. et al. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. **International journal of food microbiology**, v. 144, n. 1, 15 nov. 2010.

MNG'ONG'O, M. et al. Toxic metals in East African agro-ecosystems: Key risks for sustainable food production. **Journal of Environmental Management**, p. 16, 2021.

NECHWATAL, J.; ZELLNER, M. Potential suitability of various leaf treatment products as copper substitutes for the control of late blight (*Phytophthora infestans*) in organic potato farming. **Potato Research**, v. 58, n. 3, p. 261–276, set. 2015a.

NECHWATAL, J.; ZELLNER, M. Potential suitability of various leaf treatment products as copper substitutes for the control of late blight (*Phytophthora infestans*) in organic potato farming. **Potato Research**, v. 58, n. 3, p. 261–276, 1 set. 2015b.

NEDA, N. et al. Biocidal activity of plant-derived compounds against *Phytophthora infestans*: An alternative approach to late blight management. **Crop Protection**, v. 138, p. 105315, 1 dez. 2020.

OH, J. W.; CHUN, S. C.; CHANDRASEKARAN, M. Preparation and *in vitro* characterization of chitosan nanoparticles and their broad-spectrum antifungal action compared to antibacterial activities against Phytopathogens of tomato. **Agronomy**, v. 9, n. 1, p. 21, jan. 2019.

QUINTANILLA, P.; ROHLOFF, J.; IVERSEN, T.-H. Influence of essential oils on *Phytophthora infestans*. **Potato Research**, v. 45, n. 2–4, p. 225–235, dez. 2002.

RADWAN, M. M. et al. Antifungal compounds from turmeric and nutmeg with activity against plant pathogens. **Fitoterapia**, v. 99, p. 341–346, dez. 2014.

SATHIYABAMA, M.; MUTHUKUMAR, S. Chitosan guar nanoparticle preparation and its *in vitro* antimicrobial activity towards phytopathogens of rice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 153, p. 297–304, jun. 2020.

SOUZA, J. L. DE; RESENDE, P. **Manual da horticultura orgânica**. Viçosa - MG: Aprenda Fácil, 2003.

TURÓCZI, B. et al. *In vitro* and *in vivo* effect of poplar bud extracts on *phytophthora*

infestans: A new effective biological method in potato late blight control. **Plants**, v. 9, n. 2, p. 217, 8 fev. 2020b.

ZHENG, K. et al. Efficiency of chitosan application against *Phytophthora infestans* and the activation of defence mechanisms in potato. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 182, p. 1670–1680, jul. 2021a.

CAPÍTULO III

6. POTENCIAL DE CONTROLE *IN VIVO* DE REQUEIMA (*Phytophthora infestans*) POR SUBSTÂNCIAS ALTERNATIVAS EM CULTIVO ORGÂNICO DE BATATA

6.1 Resumo

A cultura da batata é acometida por uma das doenças mais destrutiva, a requeima causada por *Phytophthora infestans*, oomiceto temido por muitos produtores de batata. A agricultura orgânica é dependente de calda bordalesa para o controle desse oomiceto, porém o uso do cobre em altas quantidades pode resultar no acúmulo do elemento nos solos e nos lençóis aquáticos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de controle de *P. infestans* por substâncias em casa de vegetação e a campo. Em casa de vegetação foram testados: quitosana, sálvia, malva, tomilho, noz moscada, ácido fosfórico e duas testemunhas, calda bordalesa (positiva) e água destilada (negativa). As plantas de batata foram conduzidas em vasos e aos 15 dias após emergência iniciaram as aplicações das substâncias que foram reaplicadas a cada 7 dias e após 3 aplicações, o oomiceto foi inoculado, pulverizando uma suspensão de esporângios (10^4 mL^{-1}). Os primeiros sintomas começaram dois dias após a inoculação, momento em que as avaliações foram iniciadas. No campo foram testados os tratamentos: quitosana, tomilho, noz moscada, ácido fosfórico e as duas testemunhas. As avaliações a campo iniciaram aos 25 dias após emergência, quando os primeiros sintomas apareceram. As aplicações foram espaçadas a cada 5~6 dias. Os resultados da casa de vegetação mostraram que nenhum tratamento se igualou a calda bordalesa, porém aos 78 dias após a inoculação os tratamentos, tomilho, quitosana, noz moscada e ácido fosfórico foram semelhantes a calda bordalesa, sugerindo que esses tratamentos podem ser intercalados com a calda bordalesa visando diminuição do número de aplicações com cobre. Apesar desta safra ter apresentado índices pluviométricos baixos e pouca incidência da doença, pode-se observar que algumas substâncias, em certas avaliações apresentaram resultados semelhantes a calda bordalesa a campo: tomilho, noz moscada, ácido fosfórico e quitosana. Essas substâncias podem ser promissoras para testes em campo, assim como a quitosana em nanopartículas que ainda não foi testada em casa de vegetação, porém apresentou resultados eficientes *in vitro*.

Palavras-chave: Agroecologia, Requeima, *Solanum tuberosum* L.,

6.2 Abstract

The potato crop is hampered by one of the most destructive diseases, late blight caused by *Phytophthora infestans*, the oomycete feared by many potato growers. Organic agriculture depends on Bordeaux mixture for the control of this oomycete, but the use of copper in high quantities can result in the accumulation of the element in soils and water tables. The objective of this work was to evaluate *P. infestans* control potential by substances in the greenhouse and in the field. In the greenhouse, chitosan, sage, mallow, thyme, nutmeg, phosphoric acid and two controls, Bordeaux mixture (positive) and distilled water (negative) were tested. The potato plants were grown in pots and at 15 days after emergence the applications of the substances started, which were reapplied every 7 days and after 3 applications, the oomycete was inoculated, by spraying a sporangia suspension (10^4 mL^{-1}). The first symptoms started two days after inoculation, when the evaluations started. In the field, the following treatments were tested: chitosan, thyme, nutmeg, phosphoric acid, and the two controls. Field evaluations started at 25 days after emergence, when the first symptoms appeared naturally. Applications were spaced every 5~6 days. The results in the greenhouse showed that no treatment was similar to Bordeaux mixture, but at 78 days after inoculation the treatments thyme, chitosan, nutmeg and phosphoric acid were similar to Bordeaux mixture, suggesting that these treatments can be interspersed with Bordeaux mixture to reduce the number of copper applications. Although this growing season had low rainfall and little incidence of the disease, it can be observed that some substances, in certain evaluations, were similar to Bordeaux mixture in the field: thyme, nutmeg, phosphoric acid and chitosan. These substances may be promising for field tests, as well as chitosan in nanoparticles, substance not yet tested in the greenhouse, but that showed efficient results *in vitro*.

Keywords: Agroecology, Late blight, *Solanum tuberosum*.

6.3 Introdução

Nos Andes a cultura da batata é cultivada há cerca de 8.000 anos por várias civilizações pré-colombianas. Por conquistadores espanhóis no século XVI, foi levada à Europa e disseminou-se para o mundo todo, tornando-se alimento básico para diversas populações (VAYER, 2017). No Brasil, a cultura tem grande importância comercial sendo que na safra de 2018 foram produzidas mais de 3,6 milhões de toneladas em 118.297 hectares

(FAOSTAT, 2021). A região sul do Brasil na safra de 2019 produziu 419.654 toneladas, sendo que o Paraná é o segundo Estado brasileiro com maior produção desse tubérculo (DERAL, 2021).

Das doenças mais destrutivas da cultura, a requeima é a principal e o manejo dessa doença custa em torno de 5 bilhões de dólares ao ano mundialmente (JUDELSON; BLANCO, 2005). Esse patógeno pertence ao grupo dos oomicetos, e pode se reproduzir de forma assexuada e sexuada (MCGOWAN; FITZPATRICK, 2020). Esse fato confere ao patógeno maior variabilidade genética, aumentando a probabilidade da ocorrência de recombinação e eventualmente, mutação (JUDELSON; BLANCO, 2005).

Na agricultura orgânica, a requeima da batata ainda não possui controle efetivo, além das caldas de cobre como fungicidas protetores (KREBS et al., 2013). Apesar do cobre ser mineral essencial para a maioria das culturas (GUJRE; RANGAN; MITRA, 2021), seu uso excessivo é prejudicial aos solos e aos lençóis aquáticos (KREBS et al., 2013). Esse fato acaba sendo problemático aos produtores de batata orgânica, pois esses são dependentes desse mineral para o controle da requeima da batata. Além disso, a União Europeia prevê a gradativa diminuição da utilização do cobre, sendo atualmente permitido o uso de apenas 4 kg ha⁻¹ ano⁻¹. Há acordos para que novas técnicas para controle desse oomiceto sejam pesquisadas (EUROPEAN UNION, 2018b). No Brasil a instituição responsável por impor limites de utilização de produtos é o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), e de acordo com esse órgão, o cobre pode ser usado na agricultura apenas como fungicida e não deve ultrapassar o limite de 6 kg ha⁻¹ ano⁻¹ (MAPA, 2011).

Estudos vêm sendo realizados buscando formas de controle alternativo ao cobre. Pode-se citar o controle biológico com algumas cepas de *Bacillus* sp. que atuam no metabolismo secundário oferecendo resistência maior da planta a *P. infestans* a campo (YAN et al., 2020), assim como algumas espécies de *Trichoderma* que promovem a resistência induzida em plantas de batata (PURWANTISARI et al., 2018). A quitosana é matéria prima barata e tem sido estudada como possível indutor de resistência de plantas de batata (ZHENG et al., 2021b), assim como caldas de alho (NECHWATAL; ZELLNER, 2015a), e extratos de plantas e produtos comerciais como o Bion[®] (Acibenzolar-S-metílico) (DORN et al., 2007b). Entretanto, a grande maioria das pesquisas que são realizadas ficam restritas a testes laboratoriais (MULUGETA et al., 2020), implicando em falta de informações do efeito da utilização das substâncias no manejo a campo de *P. infestans*.

O objetivo do experimento foi avaliar substâncias alternativas promissoras na

substituição ao cobre para o manejo *in vivo* de requeima na batata. *P. infestans*.

6.4 Material e Métodos

6.4.1. Experimento em casa de vegetação

O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso, com 4 blocos, e 8 tratamentos. Cada unidade experimental foi formada por 3 vasos.

O experimento foi realizado na Universidade Estadual do Centro Oeste – Unicentro, Guarapuava PR (25° 23' S e 51° 29' W, 1023 m de altitude) em casa de vegetação com nevoa de irrigação controlada, em vasos. Solo de barranco peneirado e autoclavado foi adubado com 260 g de cama de aviário por vaso (SANTOS, 2017). Tubérculos brotados e padronizados de 45 mm da cultivar Ágata, susceptível a requeima, foram plantados em vasos (5,5 L, polietileno) em meados de fevereiro de 2021 e as plantas senesceram ao final de março do mesmo ano.

Foram testadas 6 substâncias, além de testemunha negativa com água destilada e testemunha positiva com calda bordalesa, totalizando 8 tratamentos. Os tratamentos e suas respectivas doses foram: óleo essencial de tomilho (2,5%), óleo essencial de noz moscada (5%), extrato alcoólico de sálvia (5%), extrato alcoólico de malva (5%), ácido fosfórico (0,1%), quitosana (8%) e calda bordalesa (2%).

As substâncias começaram a ser aplicadas com pulverizador manual de 1,5 L (Brudden Equipamentos), 2 semanas após emergência das plantas (12/03/2021) (Figura 16A); a segunda aplicação foi após 7 dias da primeira aplicação (19/03/2021), e um dia depois as plantas foram inoculadas com suspensão de esporângios na concentração de $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ até o ponto de escorrimento (Figura 16B). A suspensão de esporângios foi realizada seguindo a metodologia apresentada no capítulo I, repicado o inóculo do meio de centeio para rodela de batata e incubadas por 5 dias em BOD a 18 °C. Após a inoculação a umidade da casa de vegetação foi aumentada por meio de nebulização de 30 segundos a cada 1 hora e serragem foi colocada entre os vasos e enxarcada para manter a umidade quando da instalação de câmara úmida (Figura 16C e 16D), e por fim as plantas receberam a suspensão de esporângios antes do ponto de escorrimento (Figura 16E).



Figura 16. Primeira aplicação das substâncias nas plantas da casa de vegetação (A); inoculação de *Phytophthora infestans* em plantas de batata (B); aspectos externos (C) e interno (D) da câmara úmida; ponto de molhamento (E); primeiros sintomas de *P. infestans* em folhas de plantas de batata após dois dias da inoculação (F).

Dois dias após a inoculação começaram os primeiros sintomas de requeima (Figura 16F) e realizou-se as primeiras avaliações de severidade. No terceiro dia após inoculação foi realizado a terceira aplicação das substâncias. As avaliações foram realizadas duas vezes ao dia, até a senescência das plantas. A avaliação de severidade da doença foi estimada de acordo com a metodologia proposta por James (1971) e modificada por Fry Lab (2013), a qual avalia lesões de 0 a 100% de tecido infectado em escala diagramática.

Depois da senescência, hastes e raízes foram colocados para secar em estufa com circulação força de ar a 60 °C até atingir massa constante, sendo na sequência pesadas. Os tubérculos foram separados em maiores que 1 cm de diâmetro e menores que 1 cm e tiveram

seu peso fresco e seco anotados.

6.4.2. Experimento de campo

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso em esquema de parcelas subdivididas, com cultivares (Agata e Catucha) alocadas na parcela principal e substâncias (calda bordalesa, água destilada, quitosana, ácido fosfórico, tomilho e noz moscada) alocadas nas subparcelas, com 3 repetições.

O experimento foi realizado na mesma instituição do experimento em casa de vegetação. Em abril de 2020 cobertura verde com aveia preta foi semeada para manter o solo coberto, com espaçamento de 0,20 m entre linhas, e cerca de 85 kg ha⁻¹ de sementes, sendo manejada em setembro do mesmo ano. Em fevereiro de 2021 foi realizado o revolvimento do solo e o preparo das linhas para o plantio foi realizado ao final do mesmo mês. As parcelas mediam 1,4 m por 3,2 m e o espaçamento entre linhas foi de 0,80 m e entre plantas de 0,20 m, ou seja, 4 linhas por parcela e 7 plantas por linha. O experimento de campo foi preparado e adubado no dia 22/02/2021 (Figura 17A). E plantas iniciaram florescimento aos 40 dias após emergência (Figura 17B). A dose de cama de aviário utilizado foi na mesma proporção do experimento em casa de vegetação: 13.000 kg ha⁻¹. A área foi limpa de plantas daninhas manualmente três vezes durante o experimento e todo seu manejo foi de forma orgânica.

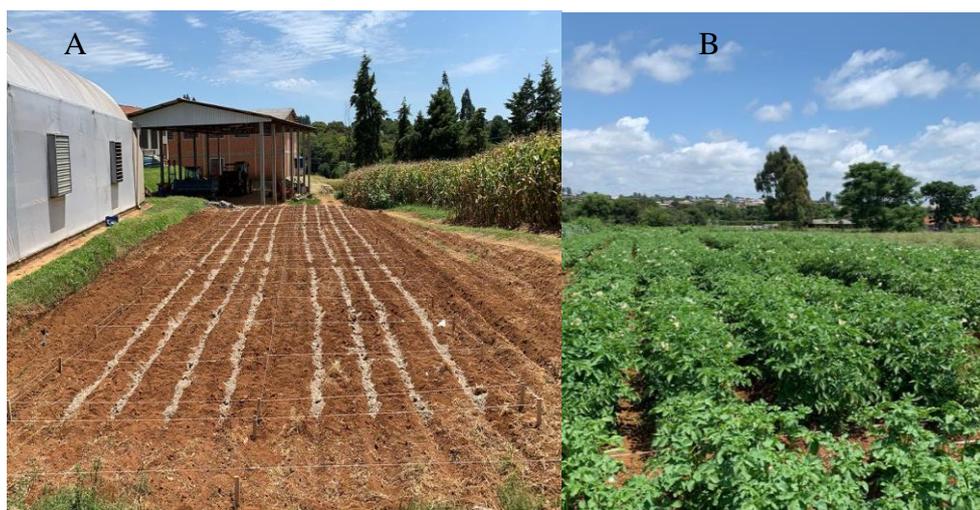


Figura 17. Preparo da área com a adubação o de cama de aviário (A), plantas de batata com 40 dias após emergência (B).

As substâncias e doses testadas foram: óleo essencial de tomilho (2,5%), óleo essencial de noz moscada (5,0%), ácido fosfórico (0,1%) e quitosana (8%), além das

testemunhas positiva, calda bordalesa (2%) e negativa, água destilada. Todas as substâncias foram calculadas e aplicadas no volume de 200 L ha⁻¹. As aplicações das substâncias foram realizadas com equipamento manual de 1,5 L e iniciaram duas semanas após a emergência das plantas (25/03/2021) e foram realizadas com intervalos diferentes dependendo da pressão da doença.

As avaliações de severidade, avaliadas em 10 plantas das duas linhas centrais por tratamento, iniciaram quando os primeiros sintomas da doença foram observados (05/04/2021) e foram espaçadas entre 2, 3 ou 4 dias de acordo com a pressão da doença. As avaliações foram de acordo com a escala diagramática proposta por James em 1971, adotando algumas modificações, com o intuito de observar a severidade e posteriormente calcular a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD), equação calculada e adaptada por Shaner e Finney (1977). Após a senescência das plantas foram contabilizados o peso e o número de tubérculos totais em 8 plantas das duas linhas centrais.

6.4.3. Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos a análise de variância e quando significativo, comparado pelo teste de Tukey a 5% no software Sisvar (FERREIRA, 2011).

6.5 Resultados

6.5.1 Casa de vegetação

As variáveis número de tubérculos maiores e menores que 1 cm, peso fresco e peso seco de tubérculos e peso seco de raiz não apresentaram efeito da aplicação das substâncias (Tabela 6).

Tabela 6. Análise de variância para as variáveis número de tubérculos maiores que 1 cm (Tub. > 1 cm), tubérculos menores que 1 cm (Tub. < 1 cm), peso fresco dos tubérculos (PF tub.), peso seco dos tubérculos (PS tub.), peso seco da haste (PS haste) e peso seco da raiz (PS raiz) por planta, aos 32 dias após emergências das plantas e 23 dias após inoculação.

	Tub. >	Tub. <	PF	PS	PS	PS
	1 cm	1 cm	tub.	tub.	haste	raiz
	(n° planta ⁻¹)		(g planta ⁻¹)			
Média geral	4,46	6,87	77,6	9,19	9,65	2,46
Anova	ns	ns	ns	ns	**	ns
CV	26,4	181,6	43,1	46,1	21,6	20,3

ns: diferença estatística não significativa; **: diferença estatística significativa a 1%. CV: coeficiente de variação.

A variável peso seco da haste apresentou efeito da aplicação das substâncias: calda bordalesa resultou em maior peso seco da haste que sálvia, malva, quitosana e água destilada. Ácido fosfórico, tomilho e noz moscada apresentaram efeito, intermediário quando comparados ao melhor tratamento e os menos eficientes (Figura 18).

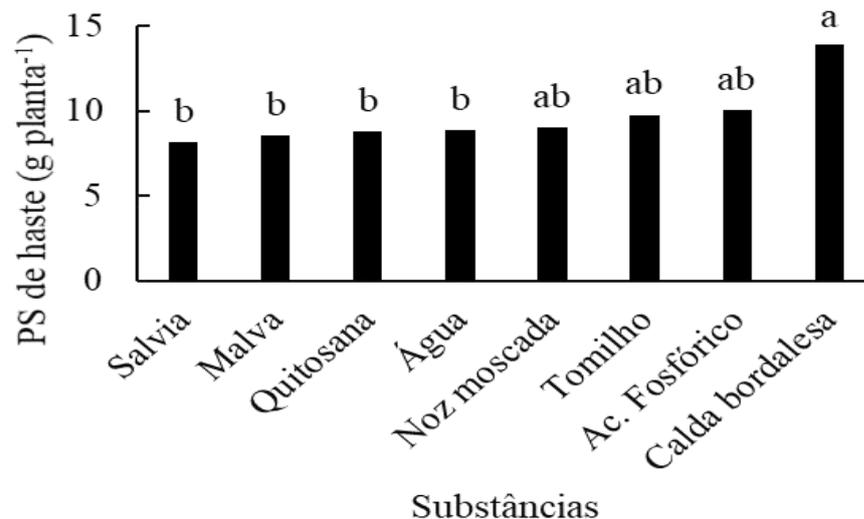


Figura 18. Peso seco (PS) da haste de plantas de batata aos 32 dias após emergências e 23 dias após inoculação de esporângios de *Phytophthora infestans* e submetidas a substâncias alternativas.

Letras diferentes indicam diferença entre os tratamentos (Tukey, 5%).

Tabela 7. Análise de variância para da severidade de requeima, realizadas em horas após inoculação.

Horas	48	57	78	81	96	105	120	129	144
Anova	*	*	**	**	**	**	**	**	**
CV	118,5	85,6	43,9	24,24	14,29	11	11,27	11,98	3,5

* e **: diferença estatística significativa a 5% e 1%, respectivamente. CV: coeficiente de variação.

A primeira avaliação foi realizada 48 horas após inoculação, quando surgiram os primeiros sintomas (Tabela 7). Nessa avaliação calda bordalesa, malva e sálvia resultaram em menor severidade e a testemunha com água destilada resultou em maior severidade (Figura 19). Os demais tratamentos resultaram em severidade intermediária. Após 81 horas da inoculação, calda bordalesa continuou como o tratamento com menor severidade, seguida por quitosana e tomilho. Por fim, sálvia e água destilada foram os tratamentos com maior severidade. Na penúltima avaliação realizada após 129 horas da inoculação o tratamento com calda bordalesa se manteve como o que resultou em menor severidade, seguida por quitosana. Os demais tratamentos resultaram em severidade intermediária entre a quitosana e a água destilada, tratamento que resultou na maior severidade.

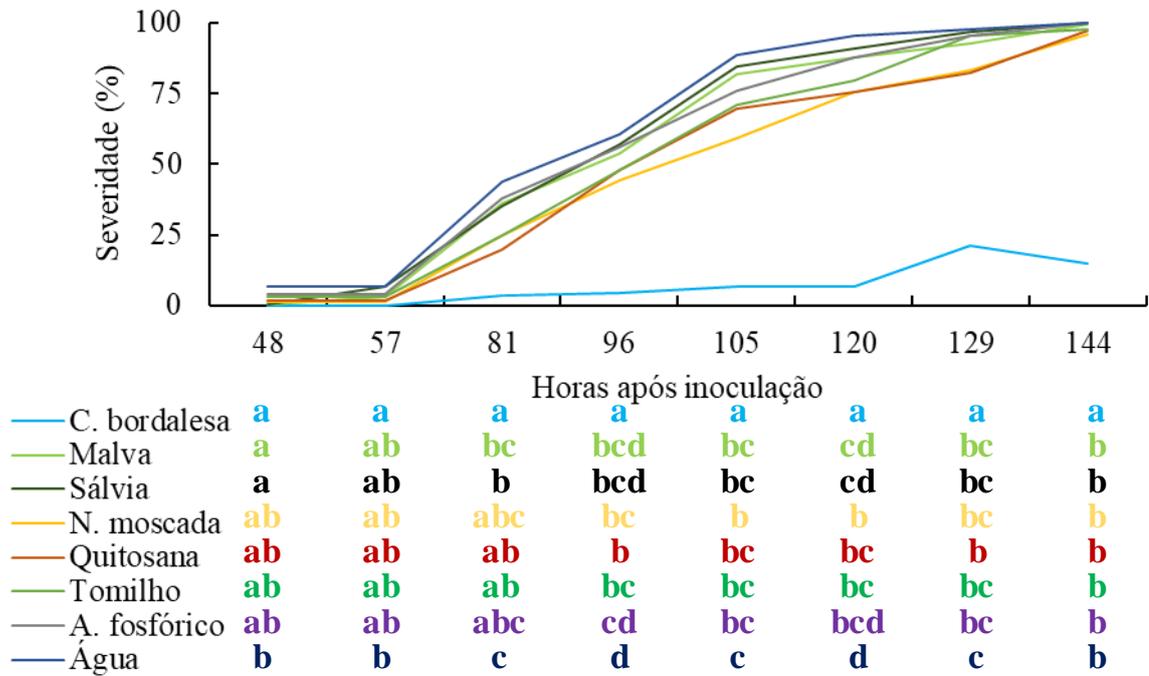


Figura 19. Severidade de plantas de batata após inoculação de esporângios de *Phytophthora infestans* e submetidas a substâncias alternativas.

Letras diferentes em cada hora após a inoculação indicam diferença entre os tratamentos (Tukey, 5%).

Constatou-se diferença significativa entre os tratamentos para AACPD sendo que calda bordalesa resultou no menor e a água destilada no maior valor (Figura 20). Sálvia, malva e ácido fosfórico não diferiram da água destilada, enquanto noz moscada, quitosana e tomilho tiveram menor AACPD que a água destilada.

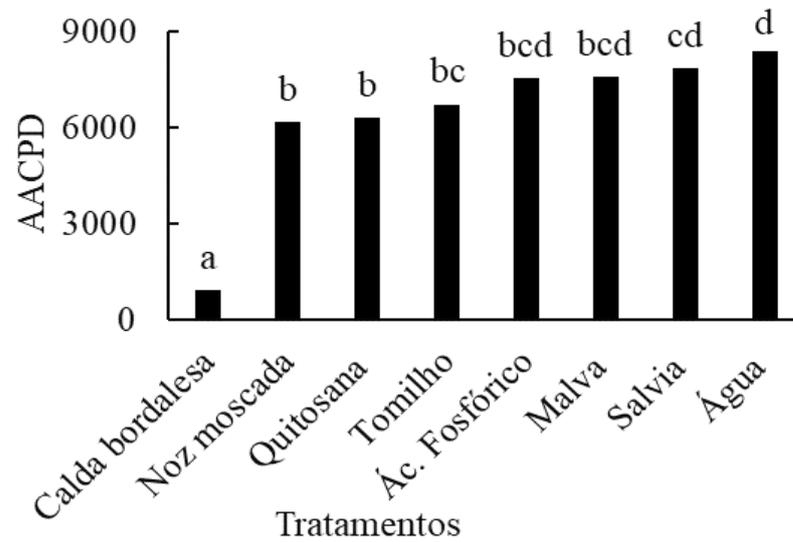


Figura 20. Área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) causada por *Phytophthora infestans* em plantas de batata cultivada em vaso em casa de vegetação, submetidas a substâncias alternativas.

Letras diferentes indicam diferença entre os tratamentos (Tukey, 5%).

6.5.2 Campo

Não se observou interação significativa para nenhuma das variáveis analisadas nas avaliações realizadas a campo (Tabela 8).

Tabela 8. Resultado da análise de variância para as variáveis área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), peso e número de tubérculo de cultivares de batata, submetidas a substâncias alternativas ao controle de *Phytophthora infestans*.

	AACPD	Peso fresco tubérculo (g planta ⁻¹)	N ^o tubérculo (planta ⁻¹)
Média	229,8	260,1	8
Cultivar (C)	ns	**	ns
Substâncias (S)	ns	ns	ns
C x S	ns	ns	ns
CV ¹	61,9	21,4	15,3
CV ²	84,2	18,7	15,4

ns: diferença estatística não significativa, **: diferença estatística significativa a 1%.
CV1 e CV2: coeficiente de variação da parcela principal e da subparcela, respectivamente.

A produtividade média apresentou diferença significativa entre as cultivares, sendo que a Catucha teve maior produtividade do que a Agata (Figura 21).

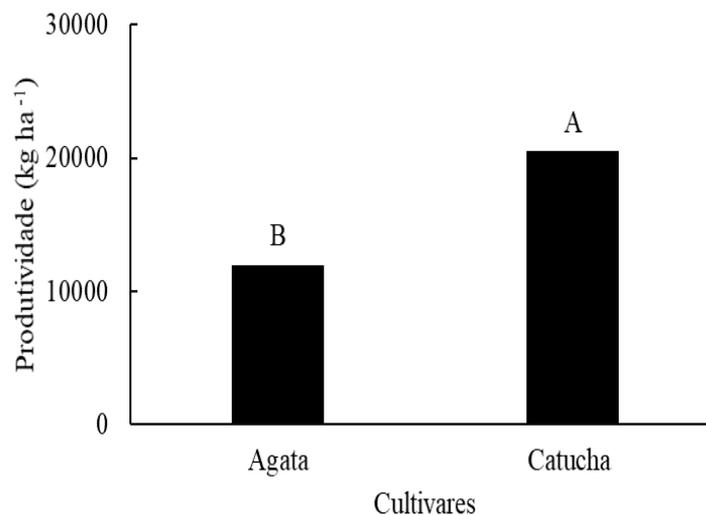


Figura 21. Produtividade média (kg ha⁻¹) das cultivares Agata e Catucha submetidas a substâncias alternativas ao controle de *Phytophthora infestans*.

Letras diferentes indicam diferença entre os tratamentos (Tukey, 5%).

As avaliações de severidade iniciaram quando os primeiros sintomas da doença foram observados aos 25 dias após emergência das plantas (Tabela 9).

Tabela 9. Análise de variância para a severidade quantificada em notas por escala diagramática.

DAE	Média	Cultivar (C)	Substâncias (S)	C x S	CV ¹	CV ²
25	0,29	ns	*	*	266,8	106,6
27	0,67	ns	ns	ns	191,2	92,1
29	0,92	ns	ns	ns	202,3	76,1
31	1,07	ns	*	*	160,9	69,4
33	1,00	ns	ns	ns	166,1	72,7
36	1,08	*	ns	ns	107,1	56,4
39	1,29	ns	*	ns	110,1	58,1
43	1,52	ns	*	ns	99,9	51,9
47	3,14	*	ns	ns	28,8	37,4
51	4,71	**	ns	ns	13,2	28,2

ns: diferença estatística não significativa, * e **: diferença estatística significativa a 5% e 1%, respectivamente. CV1 e CV2: coeficiente de variação da parcela principal e da subparcela, respectivamente. DAE: dias após emergência.

Na primeira avaliação de severidade aos 25 DAE foi observada interação significativa entre as cultivares e substâncias. As cultivares tiveram severidade semelhante, exceto quando submetidas ao tratamento de noz moscada e quitosana em que a cv Ágata apresentou severidade maior que Catucha (Figura 22A). Na avaliação aos 31 DAE a cultivar Catucha mostrou severidade semelhante a Ágata em todos as substâncias, com exceção da noz moscada em que a severidade foi maior na cultivar Ágata em relação a Catucha (Figura 22B). De modo geral, nessas duas avaliações plantas que receberam noz moscada resultaram em maior severidade.

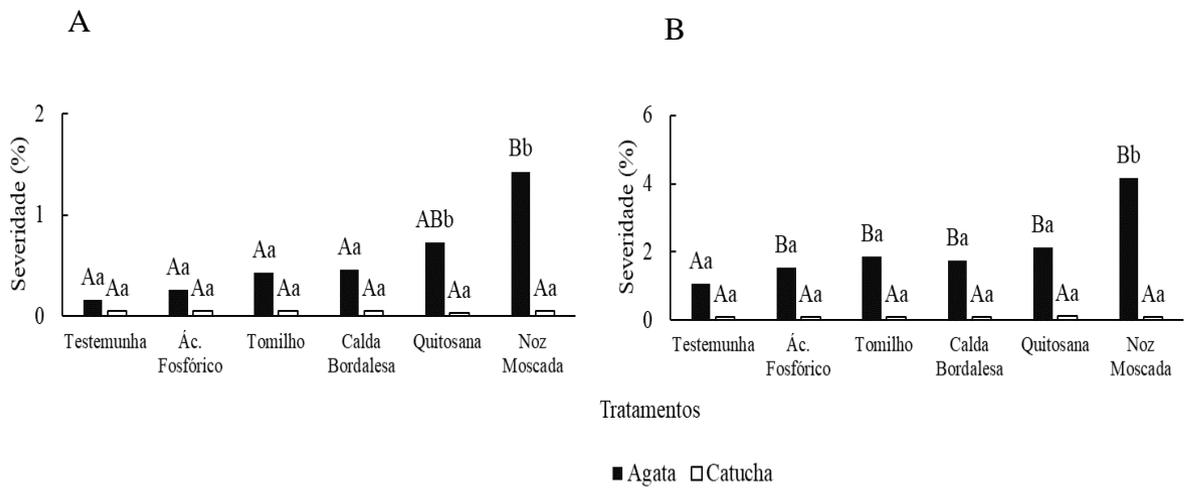


Figura 22. Severidade de plantas de batata de duas cultivares submetidas a seis substâncias alternativas ao controle de *Phytophthora infestans*, aos 25 (A) e aos 31 dias após emergência das plantas (B).

Letras maiúsculas comparam produtos e letras minúsculas comparam cultivares, sendo que letras diferentes indicam diferença entre os tratamentos (Tukey, 5%).

Nas avaliações aos 36 (Figura 23A), 47 (Figura 23B) e 51 DAE (Figura 23C), houve diferença significativa apenas entre cultivares, sendo que nas 3 avaliações a cultivar Catucha teve severidade menor que a cultivar Ágata.

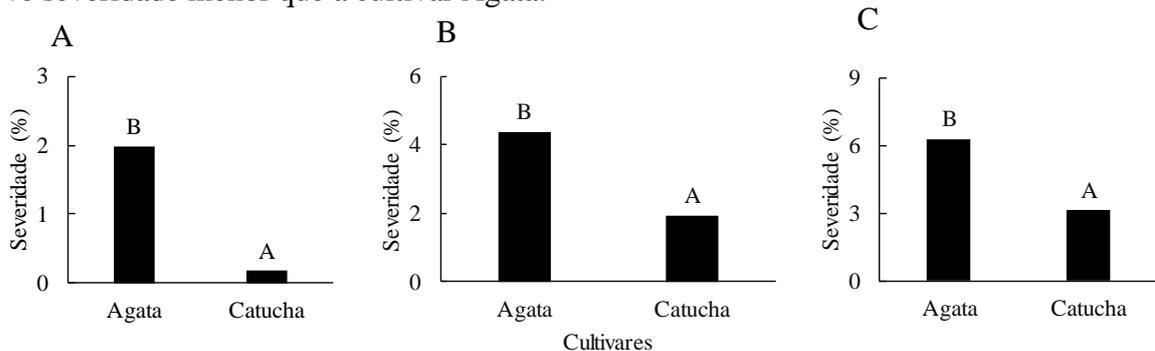


Figura 23. Severidade de plantas de batata de duas cultivares submetidas a seis substâncias alternativas ao controle de *Phytophthora infestans*, aos 36 (A), 47 (B) e aos 51 dias após emergência das plantas (C).

Letras diferentes indicam diferença entre os tratamentos (Tukey, 5%).

Para as avaliações aos 39 (Figura 24A) e aos 43 DAE (Figura 24B) ocorreu diferença entre as substâncias testadas. Na avaliação aos 39 DAE o tratamento com menor severidade foi a testemunha negativa (água destilada), e a noz moscada foi o tratamento com maior severidade. Aos 43 DAE a menor severidade foi observada nos tratamentos: água destilada,

ácido fosfórico e calda bordalesa, enquanto a maior severidade foi observada na noz moscada.

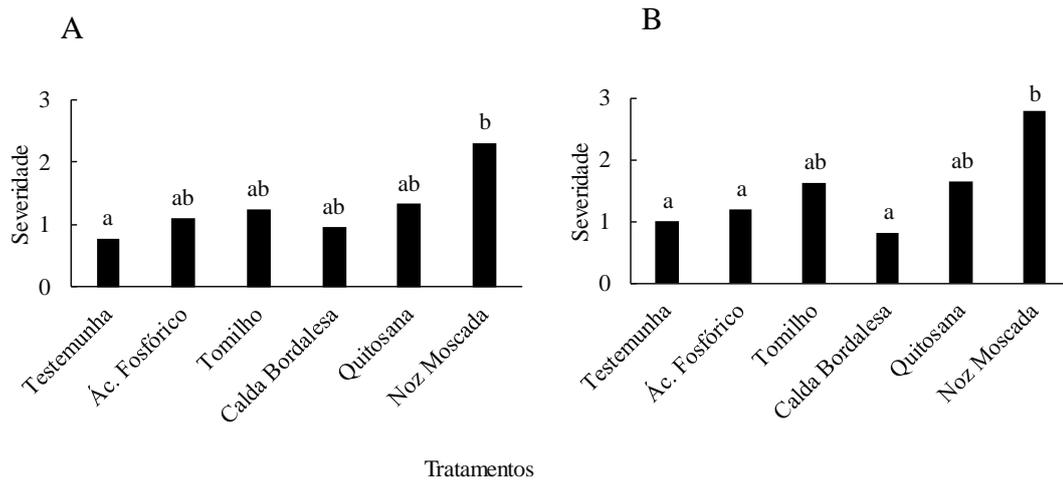


Figura 24. Severidade de plantas de batata de duas cultivares submetidas a seis substâncias alternativas ao controle de *Phytophthora infestans*, aos 39 (A), 43 dias após a emergência das plantas (B).

Letras diferentes indicam diferença entre os tratamentos (Tukey, 5%).

6.6 Discussão

O experimento realizado em casa de vegetação mostrou que nenhuma das substâncias testadas foram eficientes no controle de *Phytophthora infestans* como a calda bordalesa. A cultivar usada para esse experimento, Ágata, é conhecida pela sua alta suscetibilidade à requeima e pode ter influenciado o resultado (PASSOS, 2016). A calda bordalesa apresentou menor severidade, sendo que os outros tratamentos se assemelharam ao tratamento controle com água ao final do experimento. Além disso, o desenvolvimento da doença foi tão rápido que a produção acabou sendo prejudicada.

A ineficácia do óleo essencial de tomilho em plantas de batatas cultivadas em casa de vegetação já havia sido relatada por Quintanilla; Rohloff e Iversen (2002), além de relatos de que esse tratamento causa fitotoxidez. Por outro lado, experimento semelhante mostrou que o óleo essencial de tomilhos diminuiu a severidade em cerca de 50% das plantas (NEDA et al., 2020). O óleo essencial de noz moscada também não controlou a doença em casa de vegetação, contrastando com os resultados *in vitro* do capítulo anterior. Os óleos essenciais possuem componentes voláteis (MALIK et al., 2021), tornando-os facilmente degradados devido à oxidação, luz e altas temperaturas (COSSETIN et al., 2021; ISMAN, 2000).

A quitosana é relatada em trabalhos por oferecer indução de resistência sistêmica (ISR) (ZHENG et al., 2021b). Dando suporte a essa informação, trabalho realizado em plantas de batata em estufa mostrou que o tratamento com quitosana diminuiu a infecção de *P. infestans* (NECHWATAL; ZELLNER, 2015a). No presente trabalho, não foi possível observar diferença do tratamento com quitosana comparada ao controle com água, possivelmente pela promoção de ambiente altamente favorável ao desenvolvimento da requeima, aliado a utilização de cultivar com alta susceptibilidade ao patógeno.

O ácido fosfórico é derivado de fosfato e foram relatadas há algum tempo como indutores de resistência sistêmica contra antracnose em pepino (GOTTSTEIN; KUC, 1989). O ácido fosforoso, principal substância do ácido fosfórico, foi capaz de diminuir a podridão nos tubérculos de batata causada por *P. infestans* (JOHNSON; INGLIS; MILLER, 2004). No entanto, tais resultados divergem com os do presente trabalho, no qual constatou-se que não houve inibição do oomiceto em condições de estufa.

Esses tratamentos supracitados apresentaram comportamento diferente do mostrado *in vitro* no presente estudo. É possível que a deterioração dessas substâncias ao entrarem em contato com o ambiente, água e altas temperaturas possa ter causado essa discrepância nos resultados (DORN et al., 2007b; NECHWATAL; ZELLNER, 2015b).

Os resultados observados a campo não foram conclusivos. A safra 2021 foi seca (Figura 25B) e quente (Figura 25A), condições desfavoráveis ao desenvolvimento de *P. infestans*. O plantio do experimento a campo foi realizado após meados de fevereiro e colhido ao final de maio e início de junho épocas com poucas chuvas e temperaturas altas. A umidade é condição importante para a esporulação da *P. infestans* (JUDELSON; BLANCO, 2005), assim como temperaturas moderadas (ZHU et al., 2015). Essas condições não foram observadas na safra do presente trabalho em 2021 (Figura 25A 25B). Provavelmente esse fato afetou a incidência de requeima a campo bem como um possível efeito das substâncias testadas.

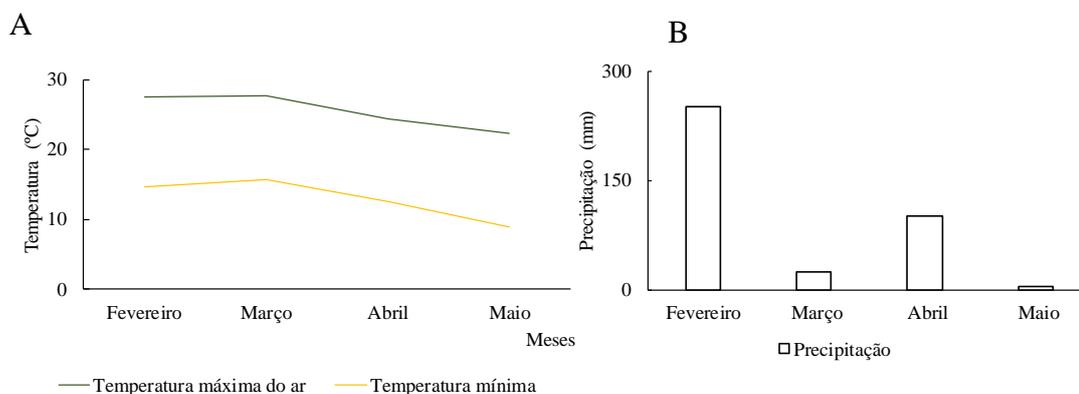


Figura 25. Temperatura e precipitação nos meses de condução do experimento a campo, ano 2021.

Dados disponibilizados pela estação meteorológica do Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (IDR) / Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR), localizada na Universidade Estadual do Centro Oeste, Campus Cedeteg.

6.7 Conclusão

A calda bordalesa foi o tratamento com menor severidade em casa de vegetação, porém, na avaliação efetuada após 81 horas da inoculação, tomilho, quitosana, noz moscada e ácido fosfórico foram semelhantes à calda bordalesa.

Em campo, a cultivar Catucha foi mais produtiva que a cultivar Ágata. Já entre as substâncias não foi possível observar nítida diferença entre os tratamentos devido à baixa incidência de requeima. A noz moscada resultou em menor controle.

6.8 Referências bibliográficas

COSSETIN, L. F. et al. Development of nanoemulsions containing *Lavandula dentata* or *Myristica fragrans* essential oils: Influence of temperature and storage period on physical-chemical properties and chemical stability. **Industrial Crops and Products**, v. 160, p. 113-115, fev. 2021.

DERAL. **DERAL.** Disponível em: https://view.officeapps.live.com/op/view.aspx?src=https%3A%2F%2Fwww.agricultura.pr.gov.br%2Fsites%2Fdefault%2Farquivos_restritos%2Ffiles%2Fdocumento%2F2021-08%2Fbdlpanet-1.xls&wdOrigin=BROWSELINK>. Acesso em: 20 set. 2021.

DORN, B. et al. Control of late blight in organic potato production: evaluation of copper-free preparations under field, growth chamber and laboratory conditions. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, n. 2, p. 217–240, 4 set. 2007b.

EUROPEAN UNION. 2018/1981. COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) 2018 / 1981 - of 13 December 2018 - renewing the approval of the active substances copper compounds, as candidates for substitution, in accordance with Regulation (EC) No 1107 / 2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market, and amending the Annex to Commission Implementing Regulation (EU) No 540 / 2011. 13 dez. 2018 b, p. 5.

FAOSTAT. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 20 set. 2021.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 1039–1042, dez. 2011.

FRY LAB. **Protocols-Rating system**. Disponível em: <<http://www.plantpath.cornell.edu/Fry/Protocols-Rating-system.html>>. Acesso em: 30 ago. 2020.

GOTTSTEIN, H. D.; KUC, J. A. Induction of systemic resistance to anthracnose in cucumber by phosphates. **Phytopathology**, v. 79, n. 2, p. 176, 1989.

GUJRE, N.; RANGAN, L.; MITRA, S. Occurrence, geochemical fraction, ecological and health risk assessment of cadmium, copper and nickel in soils contaminated with municipal solid wastes. **Chemosphere**, v. 271, p. 129573, 1 maio 2021.

ISMAN, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, v. 19, n. 8–10, p. 603–608, set. 2000.

JAMES, W. CI. An illustrated series of assessment keys for plant diseases, their preparation and usage. **Canadian Plant Diseases**, 1971.

JOHNSON, D. A.; INGLIS, D. A.; MILLER, J. S. Control of Potato Tuber Rots Caused by

Oomycetes with Foliar Applications of Phosphorous Acid. **Plant Disease**, v. 88, n. 10, p. 1153–1159, out. 2004.

JUDELSON, H. S.; BLANCO, F. A. The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 47–58, jan. 2005.

KREBS, H. et al. Copper free control of potato late blight in organic potato production? **Agrarforschung Schweiz**, v. 4, n. 5, p. 238–243, 2013.

MALIK, T. et al. Nutmeg nutraceutical constituents: *In vitro* and *in vivo* pharmacological potential. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. n/a, n. n/a, p. e15848, 2 ago. 2021.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa MAPA nº 46 de 06/10/2011**. 2011.

MCGOWAN, J.; FITZPATRICK, D. A. Recent advances in oomycete genomics. In: **Advances in Genetics**. Amsterdam: Elsevier, 2020. v. 105p. 175–228.

MULUGETA, T. et al. Botanicals and plant strengtheners for potato and tomato cultivation in Africa. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 19, n. 2, p. 406–427, 1 fev. 2020.

NECHWATAL, J.; ZELLNER, M. Potential suitability of various leaf treatment products as copper substitutes for the control of late blight (*Phytophthora infestans*) in organic potato farming. **Potato Research**, v. 58, n. 3, p. 261–276, set. 2015a.

NEDA, N. et al. Biocidal activity of plant-derived compounds against *Phytophthora infestans*: An alternative approach to late blight management. **Crop Protection**, v. 138, p. 105315, 1 dez. 2020.

PASSOS, S. **Desempenho de cultivares de batata em sistema orgânico: crescimento, produtividade e resposta a requeima e a larva alfinete**. Guarapuava: Universidade Estadual do Centro Oeste, 2016.

PURWANTISARI, S. et al. Systemic inducing resistance against late blight by applying antagonist *Trichoderma Viride*. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1025, n. 1, p.

012053, 1 maio 2018.

QUINTANILLA, P.; ROHLOFF, J.; IVERSEN, T.-H. Influence of essential oils on *Phytophthora infestans*. **Potato Research**, v. 45, n. 2–4, p. 225–235, dez. 2002.

SANTOS, R. **Crescimento, severidade de requeima e produtividade de cultivares de batata sob adubação orgânica e mineral**. Dissertação em Produção Vegetal—Guarapuava: Universidade Estadual do Centro Oeste, 2017.

SHANER, G. The Effect of Nitrogen Fertilization on the Expression of Slow-Mildewing Resistance in Knox Wheat. **Phytopathology**, v. 77, n. 8, p. 1051, 1977.

VAYER, M. DE F. LE. The Potato: a Long History to Fit our Contemporary World. **Potato Research**, v. 60, n. 3–4, p. 223–235, dez. 2017.

YAN, H. et al. Antagonistic activity of *Bacillus velezensis* SDTB038 against *Phytophthora infestans* in potato. **Plant Disease**, p. PDIS-08-20-1666-RE, 11 nov. 2020.

ZHENG, K. et al. Efficiency of chitosan application against *Phytophthora infestans* and the activation of defense mechanisms in potato. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 182, p. 1670–1680, 1 jul. 2021b.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O isolamento da *Phytophthora infestans* por métodos convencionais não se mostrou eficiente. Por ser um patógeno quase obrigatório necessita de técnica diferente, utilizando-se rodelas de batata como isca para isolamento indireto. A técnica descrita proporcionou isolamento fácil e rápido.

Com a realização dos experimentos *in vivo* foi possível perceber que apesar do efeito positivo de inibição de crescimento, esporulação e germinação de esporângios a substâncias *in vitro*, o mesmo resultado não foi visto em casa de vegetação, demonstrando a agressividade desse patógeno sob condições mais naturais no hospedeiro-vivo.

A campo, são necessárias condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da epidemia da requeima para se obter resultados mais conclusivos. Com isso, sugere-se a continuidade dos trabalhos optando-se por cultivares mais resistentes em casa de vegetação (e.g., Catucha) e repetição do experimento a campo, com substituição da noz moscada pela quitosana em nanopartícula.