

Patogenicidade *in vitro* de *Pythium aphanidermatum* e *Pythium dissotocum* em variedades de alface (*Lactuca sativa* L.)¹

Katya da Silva Patekoski^{2,3} e Carmen Lidia Amorim Pires Zottarelli²

Recebido: 12.11.2008; aceito: 05.03.2009

ABSTRACT - (Pathogenicity *in vitro* of *Pythium aphanidermatum* and *Pythium dissotocum* in varieties of lettuce (*Lactuca sativa* L.)). *Pythium* species are responsible for root rot in hydroponically grown, being the aims of this study to evaluate the *Pythium aphanidermatum* and *P. dissotocum* pathogenicity, in lettuce. Petri dishes contained water-agar and the mycelium of the isolates were incubated at 15 to 45 °C to verify the optimum temperature of growth, which were 31 °C for *P. aphanidermatum* and 26 °C for *P. dissotocum*. It was evaluated the pathogenicity of the isolates in the optimum temperatures, and 20 °C ideal to lettuce, placing the seeds in water-agar and the mycelium in the center of the dishes. Petri dishes contained only the seeds in media as controls. It was evaluated the hypocotyl and primary root length and the percentage of survivors seedlings, selecting *P. aphanidermatum* as more pathogenic; Vera and Tainá varieties as less susceptible and Elisa most susceptible.

Key words: hydroponic system, *Pythiales*, root infection

RESUMO - (Patogenicidade *in vitro* de *Pythium aphanidermatum* e *Pythium dissotocum* em variedades de alface (*Lactuca sativa* L.)). *Pythium* spp. são importantes causadoras de infecções radiculares nos cultivos hidropônicos, tendo sido objetivo deste estudo avaliar a patogenicidade de *Pythium aphanidermatum* e *P. dissotocum*, em alface. Placas de Petri contendo ágar-água e micélio dos isolados foram incubadas de 15 a 45 °C, para verificação da temperatura ótima de crescimento, estabelecendo-se 31 °C para *P. aphanidermatum* e, 26 °C para *P. dissotocum*. Avaliou-se, então, a patogenicidade dos espécimes nas suas temperaturas ótimas e, em 20 °C, ideal para a alface, colocando-se sementes em ágar-água e um disco com micélio no centro das placas. Placas contendo somente sementes em meio de cultura serviram como controle. Verificou-se o comprimento dos hipocótilos, das radículas e a porcentagem de plântulas sobreviventes, selecionando-se *P. aphanidermatum* como mais patogênico; as variedades Vera e Tainá como menos suscetíveis e, Elisa, como mais suscetível.

Palavras-chave: hidroponia, infecção radicular, *Pythiales*

Introdução

O gênero *Pythium* criado por Pringsheim em 1858 é atualmente classificado como pertencente a Pythiaceae, Pythiales, Oomycetes, Oomycota, dentro do Reino Chromista (Straminipila) (Alexopoulos *et al.* 1996, Kirk *et al.* 2001, Dick 2001). Com cerca de 120 espécies conhecidas, é considerado como um dos gêneros de maior importância dentro do grupo, principalmente devido ao alto potencial parasítico de muitas de suas espécies em plantas de interesse econômico, causando apodrecimento de raízes, caules e frutos; tombamento de plântulas (“damping off”) na pós-emergência e podridão de sementes na pré-emergência (Plaats-Niterink 1981). Representantes de *Pythium* podem também ocasionar reduções significativas na

produção de diversas culturas, mesmo na ausência de sintomas radiculares e foliares visíveis, o que tem sido classificado como infecção subclínica (Stanghellini & Kronland 1986, Owen-Going *et al.* 2003).

Infecções radiculares ocasionadas por *Pythium* spp. são frequentemente destrutivas na maioria das culturas produzidas em sistemas hidropônicos, principalmente nas épocas em que ocorre a elevação da temperatura da solução nutritiva e do ambiente das casas-de-vegetação (Sutton *et al.* 2006). *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp., *P. catenulatum* Matthews, *P. dissotocum* Drechsler, *P. helicoides* Drechsler, *P. intermedium* de Bary, *P. irregulare* Buisman, *P. mamillatum* Meurs, *P. middletonii* Sparrow, *P. myriotylum* Drechsler, *P. paroecandrum* Drechsler, *P. rostratum* Bütler, *P. sylvaticum* Campbell & Hendrix, *P. ultimum* Trow,

1. Parte da monografia da graduação da primeira autora

2. Instituto de Botânica de São Paulo, Seção de Micologia e Liquenologia, Caixa Postal 3005, 04301-902 São Paulo, SP, Brasil

3. Autor para correspondência: katya_patekoski@yahoo.com.br

P. uncinulatum Van der Plaats-Niterink & Blok, *P. violae* Chester & Hickman, *Pythium* sp. “grupo F” e *Pythium* sp. “grupo T” são os táxons mais comumente citados nestes sistemas (Stanghellini & Kronland 1986, Stanghellini & Rasmussen 1994, Herrero *et al.* 2003, Postma *et al.* 2005, Teixeira *et al.* 2006).

No Brasil, a hidroponia apresentou grande expansão na década de 90, e tem se difundido em todo o país, sendo encontrada nos cinturões verdes de algumas capitais, e também de algumas cidades do interior, principalmente nas regiões sul e sudeste (Furlani 1999, Lopes *et al.* 2003, Silva & Lima Neto 2007). O sucesso da hidroponia se deve à produção de hortaliças de ótima qualidade, melhor aproveitamento do espaço físico, além da menor incidência de pragas e doenças (Furlani 1996, Rodrigues 2002). Dentre as hortaliças produzidas por meio desta técnica, destaca-se a alface (*Lactuca sativa* L.), pioneira em cultivos hidropônicos no país, e preferida por grande parte dos hidroponicultores, por apresentar ciclo de vida curto; alta produtividade e ampla aceitação no mercado (Lopes *et al.* 2003, Teixeira *et al.* 2006). Entretanto, diversas espécies de *Pythium* são relatadas em cultivos hidropônicos desta hortaliça, dentre elas *P. aphanidermatum*, *P. catenulatum*, *P. dissotocum*, *P. helicoides*, *P. irregulare*, *P. uncinulatum*, *P. rostratum*, *P. sylvaticum*, *P. myriotilum*, *P. violae*, bem como isolados de *Pythium* do “grupo F” e *Pythium* do “grupo T” (Stanghellini & Kim 1998, Stanghellini & Kronland 1986, Utkhede *et al.* 2000, Teixeira *et al.* 2006).

Considerando que isolados de *Pythium* são importantes patógenos em cultivos hidropônicos, e sendo a alface amplamente consumida pela população brasileira e produzida em grande escala por meio deste sistema, o presente estudo foi realizado com objetivos de: analisar a temperatura ótima de crescimento de *P. aphanidermatum* e *P. dissotocum*, isolados de culturas hidropônicas sintomáticas, e verificar o grau de patogenicidade dos espécimes em variedades de alface.

Material e métodos

Amostras de plantas sintomáticas submetidas à clínica fitopatológica da ESALQ-USP e à Seção de Micologia e Liquenologia do Instituto de Botânica por hidroponicultores do Estado de São Paulo, foram examinadas para verificar a ocorrência de *Pythium* sp., possibilitando o isolamento e a identificação de *Pythium aphanidermatum* de tabaco (*Nicotiana*

tabacum L.) e *P. dissotocum* de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). O isolamento dos patógenos foi realizado a partir da lavagem das raízes necróticas de plantas sintomáticas, em água corrente, e posterior transferência de fragmentos radiculares para CMA + p.p.e. (“Corn-meal” ágar DIFCO acrescido de penicilina, pimaricina, e sulfato de estreptomicina) (Carvalho & Milanez 1989). Após o crescimento, os isolados foram transferidos para placas de Petri esterilizadas com água destilada esterilizada e metades de sementes previamente fervidas de *Sorghum* sp.

A identificação dos espécimes foi realizada com auxílio de literatura especializada (Frezzi 1956, Plaats-Niterink 1981) e os mesmos incorporados à Coleção de Culturas da Seção de Micologia e Liquenologia do Instituto de Botânica, São Paulo (SPC), pelo método de Castellani (Figueiredo 1967), em frascos “Wheaton” com água destilada esterilizada (Milanez 1989) e em tubos de ensaio com meio de cultura CMA + p.p.e, sendo os frascos “Wheaton” e os tubos acondicionados em câmara fria (± 10 °C) (Milanez 1989, modificado).

Para verificação da temperatura ótima de crescimento dos espécimes, discos de 6mm diâm. com micélio dos isolados foram colocados no centro de placas de Petri contendo o meio de cultura AA (Ágar-Água), e as placas incubadas em câmara de germinação BOD em 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C, com três repetições por temperatura. As leituras diárias foram realizadas a partir de 24 horas até o crescimento micelial total nas placas, medindo-se o diâmetro (em cm) das colônias em 4 direções diametralmente opostas, com o auxílio de uma régua graduada.

Para a análise dos resultados foram considerados os diâmetros médios das avaliações, os quais foram representados graficamente, evidenciando o crescimento micelial dos isolados por tempo de incubação (dias) e, a taxa de extensão micelial (cm dia⁻¹) por temperatura de incubação (°C), estabelecendo-se assim, por meio de uma equação de 2º grau, a temperatura ideal de crescimento dos isolados.

As placas nas quais não houve o crescimento dos isolados, foram incubadas na temperatura ideal de crescimento dos mesmos, durante aproximadamente 25 dias. Este teste possibilitou verificar se as temperaturas em que as placas foram previamente incubadas apenas inibiram o crescimento dos isolados ou causaram a sua morte.

A avaliação e comparação do potencial patogênico dos espécimes de *Pythium* foram realizadas na temperatura de 20 °C, ideal para o crescimento da alface

(Nascimento & Cantlife 2002) e, nas temperaturas ideais para o crescimento dos isolados. Sementes de alface (sete sementes/placa), das variedades Elisa (lisa), Tainá (americana), Mimosa (mimosa) e Vera (crespa), após desinfetadas superficialmente com hipoclorito de sódio (três partes de água destilada: uma parte de água sanitária – 0,625% de cloro ativo), foram pré-germinadas por 24 horas em papel de filtro umedecido e colocadas em placas de Petri com meio de cultura (AA). Em seguida, um disco de 6mm diâm. com micélio dos isolados de *Pythium* crescidos em CMA + p.p.e, foi disposto no centro de cada placa. Placas contendo apenas as sementes de alface foram utilizadas como controle.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada uma representada por uma placa de Petri. As placas foram incubadas por 10 dias em câmaras de germinação com fotoperíodo de 12 horas. A suscetibilidade das variedades de alface e, a comparação do potencial patogênico das espécies de *Pythium* foram realizadas verificando-se o desenvolvimento das plântulas, por meio da medição (em cm) do comprimento dos hipocótilos e das radículas, e por meio da porcentagem das plântulas sobreviventes (Pinto *et al.* 2005, Teixeira *et al.* 2006). Os resultados foram analisados estatisticamente, utilizando-se para isso, a análise de variância e teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

Descrição dos patógenos utilizados nos experimentos

Pythium aphanidermatum (Edson) Fitzp., Mycologia 15: 168. 1923.

Figuras 1-4

Colônias com crescimento aéreo; hifas ramificadas, hialinas, de aspecto algodinoso. Zoosporângios filamentosos inflados, intercalares ou terminais. Zoósporos encistados de 7,5-12,5 µm diâm. Oogônios esféricos, lisos, hialinos, normalmente terminais, raramente intercalares, de 17,5-25 µm diâm. Anterídios presentes; ramos anteridiais monóclinos ou díclinos, alguns sésseis, 1-2 por oogônio, comumente 1; células anteridiais clavadas, saculiformes, em forma de sino ou irregulares; atracção geralmente apical. Oósporos esféricos, lisos, geralmente apleróticos, 15-20 µm diâm.

Material examinado: BRASIL. Rio de Janeiro: Rio de Janeiro, isolado de raízes sintomáticas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) hidropônico, 1-IV-2005, G. Oliveira *s.n.* (SPC2006).

As características apresentadas pelo isolado estão de acordo com a literatura utilizada para a identificação. Este táxon normalmente ocorre numa ampla variedade de hospedeiros ao redor do mundo (Plaats-Niterink 1981).

Em hidroponia, *Pythium aphanidermatum* destaca-se como uma das espécies mais comuns e destrutivas (Bates & Stanghellini 1984, Stanghellini & Rasmussen 1994, Cipriano *et al.* 2005, Menzies *et al.* 1996, Owen-Going *et al.* 2003, Punja & Yip 2003, Calvo-Bado *et al.* 2006, Sutton *et al.* 2006). Dentre as culturas hidropônicas afetadas por *P. aphanidermatum* estão salsa (*Petroselinum crispum* L.) (Gull *et al.* 2004), pepino (*Cucumis sativus* L.) (Jenkins & Averre 1983, Goldberg & Stanghellini 1990, Herrero *et al.* 2003, Postma *et al.* 2005), alface (Utkhede *et al.* 2000, Pinto *et al.* 2005), tomate (Jenkins & Averre 1983), espinafre (*Spinacea oleracea* L.) (Bates & Stanghellini 1984) e agrião (*Lepidium sativum* L.) (Pires-Zottarelli, dados não publicados).

Pythium dissotocum Drechsler, Journal of the Washington Academy of Science 20: 402. 1930

Figuras 5-8

Colônias sem padrão de crescimento definido; hifas ramificadas, hialinas; apressórios simples e curvados. Zoosporângios filamentosos, não inflados. Zoósporos encistados de 6-11 µm diâm. Oogônios esféricos, lisos, terminais ou intercalares, de 17,5-22,5 µm diâm. Anterídios presentes; ramos anteridiais monóclinos e díclinos, 1-3 por oogônio, geralmente curtos ou sésseis; células anteridiais tubulares, algumas clavadas, atracção apical. Tubo de fertilização presente. Oósporos esféricos, lisos, apleróticos, alguns pleróticos, de 12,5-17,5 µm diâm.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Pindamonhangaba, isolado de raízes sintomáticas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) hidropônico, 10-IX-2003, H.M. Takada *s.n.* (SPC1985).

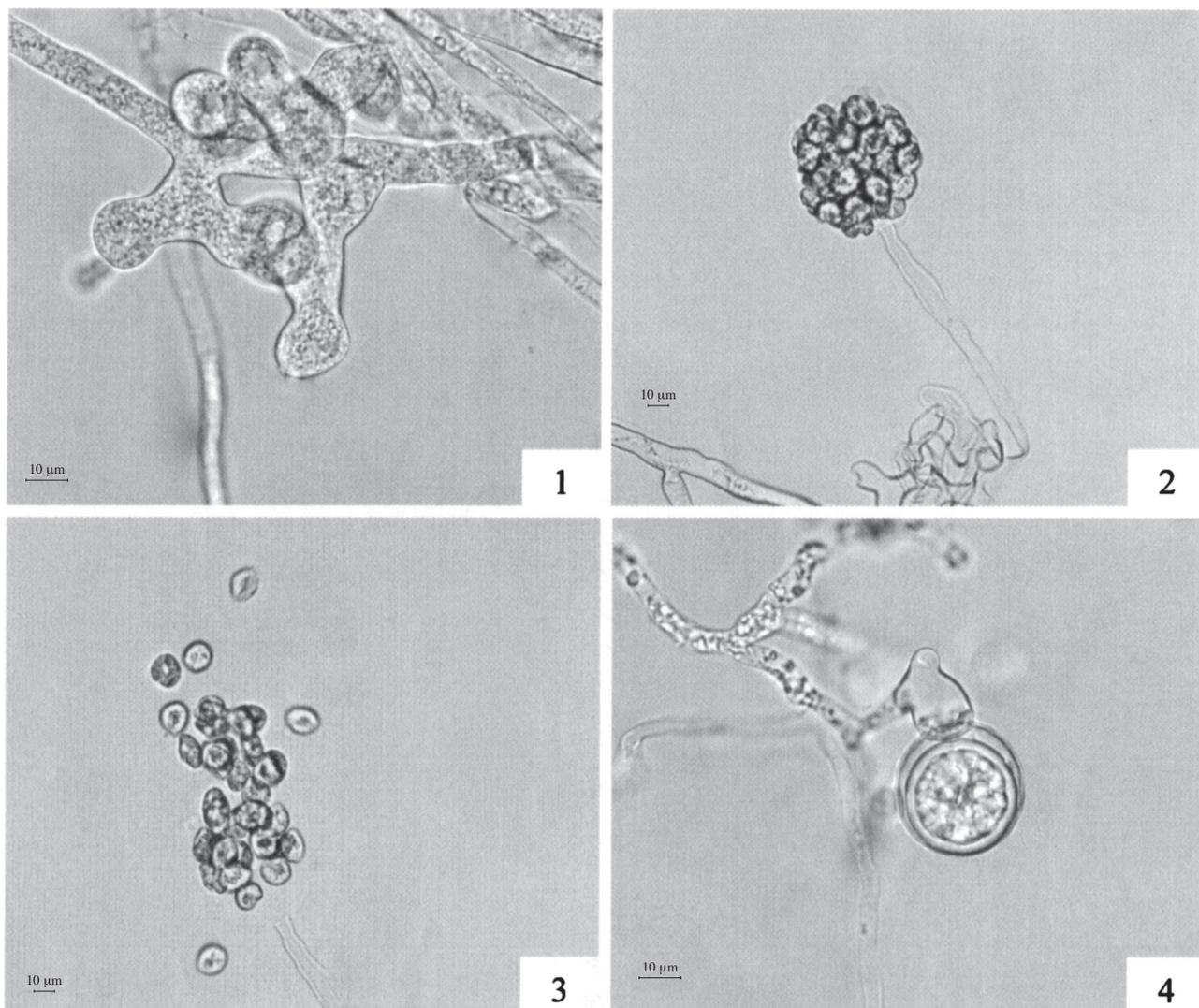
As características do espécime estudado concordam com as mencionadas na literatura específica utilizada. Há diversos relatos desta espécie de *Pythium* em plantas ao redor do mundo, sendo freqüente sua citação em culturas hidropônicas, juntamente com *P. aphanidermatum* (Plaats-Niterink

1981, Teixeira *et al.* 2006). Stanghellini & Kronland (1986) relataram que *P. dissotocum* causou prejuízos superiores a 50% em culturas hidropônicas de alface, mesmo na ausência de sintomas de podridão radicular, em decorrência de infecção subclínica. No Brasil, a primeira citação da espécie é de rúcula (*Eruca sativa* L.) hidropônica sintomática (Baptista 2007).

Verificação da temperatura ótima de crescimento dos isolados - Verificou-se a temperatura ótima de crescimento dos isolados pela avaliação da influência

da temperatura no crescimento micelial dos mesmos, realizada por meio da taxa de crescimento micelial (cm dia^{-1}) (figura 9) e crescimento por tempo de incubação (dias) (figura 10).

Para *Pythium aphanidermatum*, a temperatura ótima de crescimento foi de 31 °C e a máxima de 40 °C. O espécime não se desenvolveu na temperatura de 45 °C, considerada temperatura de morte para o mesmo. Para *P. dissotocum*, a temperatura ótima de crescimento foi de 26 °C e a máxima de 35 °C.



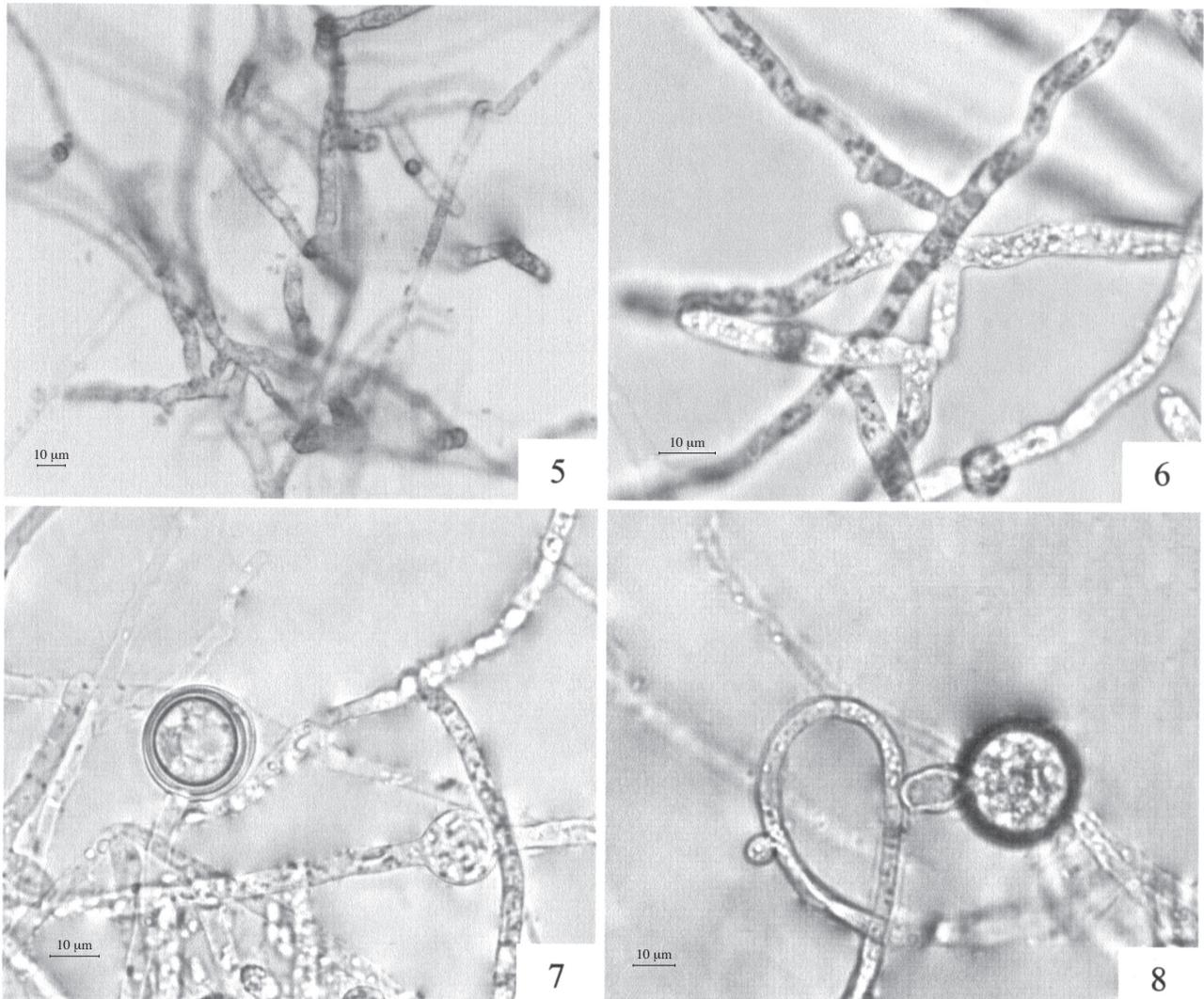
Figuras 1-4. *Pythium aphanidermatum*. 1. Zoosporângio filamentosso inflado. 2. Vesícula evanescente. 3. Liberação de zoósporos. 4. Oogônio, óosporo e anterídio séssil com célula anteridial em forma de sino.

Figures 1-4. *Pythium aphanidermatum*. 1. Inflated filamentous zoosporangium. 2. Evanescent vesicle. 3. Zoospores liberation. 4. Oogonium, oospore and sessile antheridium with bell-shaped antheridial cell.

O isolado não se desenvolveu na temperatura de 40 °C, considerada temperatura de morte. Observou-se na avaliação do crescimento micelial por tempo de incubação (dias) (figura 9), um comportamento semelhante aos isolados em 15, 20, 25 e 30 °C. Em 25 e 30 °C o crescimento dos espécimes ocorreu em apenas um dia, tendo atingido o crescimento total nas placas; entretanto, em 15 e 20 °C, houve um decréscimo no desenvolvimento, sendo necessários três e dois dias, respectivamente, para o crescimento

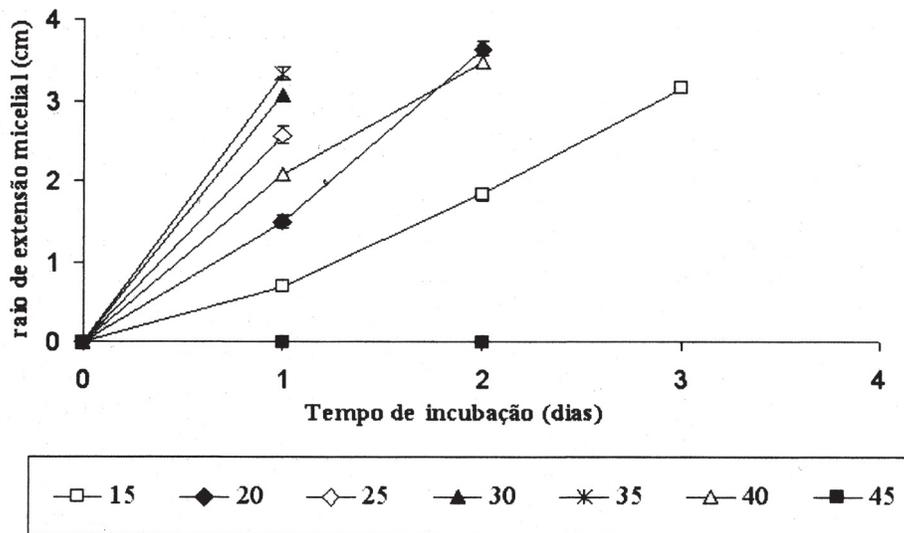
total. Observou-se um crescimento superior do isolado de *P. aphanidermatum* em 35 °C, evidenciado pelo crescimento micelial total na placa em apenas um dia, enquanto para *P. dissotocum*, o crescimento total ocorreu em dois dias.

Na avaliação da influência da temperatura de incubação sobre a taxa de extensão micelial diária (figura 10), verificaram-se valores superiores para o isolado de *P. aphanidermatum* nas temperaturas de 20, 25, 30 e 35 °C, demonstrando maior capacidade

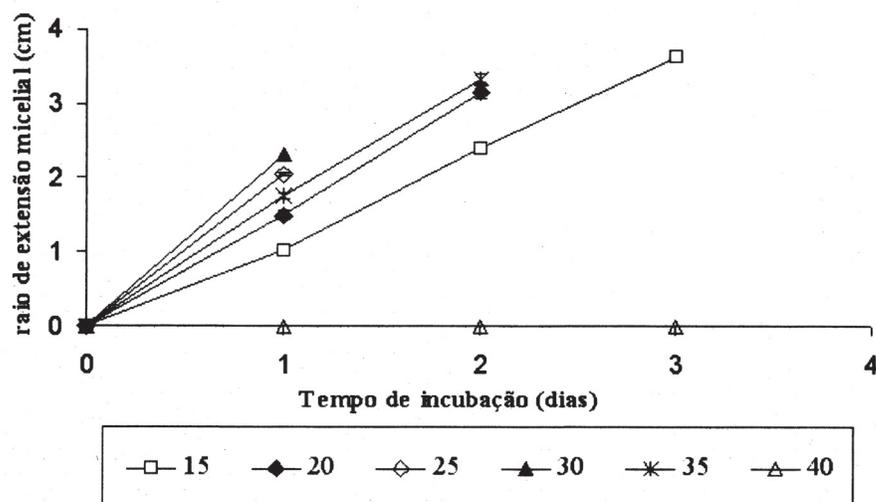


Figuras 5-8. *Pythium dissotocum*. 5-6. Zoosporângios filamentosos não inflados. 7. Oogônio terminal com oósporo. 8. Oogônio intercalar com anterídio diclino.

Figures 5-8. *Pythium dissotocum*. 5-6. Non-inflated filamentous zoosporangium. 7. Terminal oogonium with oospore. 8. Intercalar oogonium with diclinous antheridium.

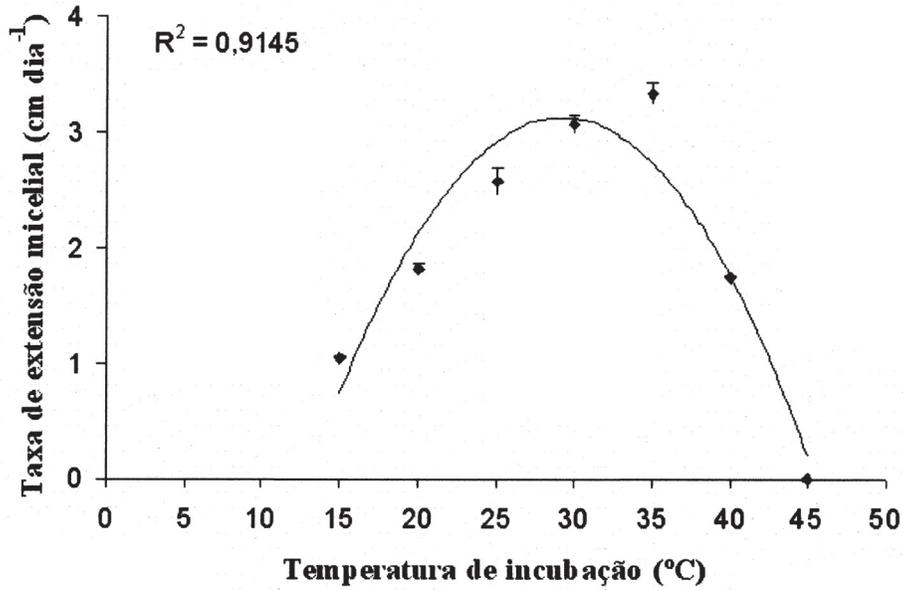


a



b

Figura 9. Crescimento micelial de *Pythium aphanidermatum* (A) e *Pythium dissotocum* (B) por tempo de incubação (dias).
 Figure 9. Mycelial growth of *Pythium aphanidermatum* (A) and *Pythium dissotocum* (B) by time of incubation (days).



a

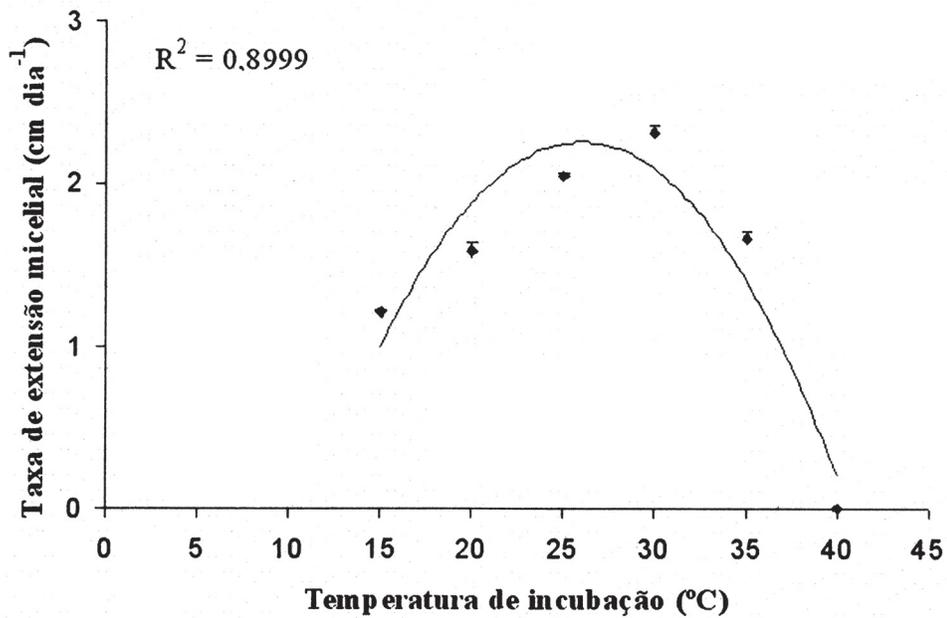


Figura 10. Influência da temperatura de incubação sobre a taxa de extensão micelial diária de *Pythium aphanidermatum* (A) e *Pythium dissotocum* (B).

Figure 10. The influence of incubation temperature on the rate of mycelial extension daily of *Pythium aphanidermatum* (A) and *Pythium dissotocum* (B)

de desenvolvimento em diversas temperaturas. Na temperatura de 35 °C, a taxa de extensão micelial para *P. aphanidermatum* foi de 3,3 cm dia⁻¹, enquanto na temperatura de 15 °C foi encontrada a menor taxa de extensão micelial para o isolado, de 1,1 cm dia⁻¹. Para *P. dissotocum*, a maior taxa de extensão foi obtida na temperatura de 30 °C, de 2,3 cm dia⁻¹ e a menor taxa, foi exibida na temperatura de 15 °C, de 1,2 cm dia⁻¹.

O efeito da temperatura no crescimento micelial de *Pythium* spp. foi avaliado por Middleton (1943), constatando-se, em meio BDA (batata-dextrose-agar), bom desenvolvimento em 25 °C. Para *P. dissotocum*, foi determinada a temperatura ótima em 28 °C e a máxima em 34 °C. Não houve diferença considerável entre as temperaturas apresentadas pelo autor e o espécime de *P. dissotocum* aqui estudado. Para *P. aphanidermatum*, o autor verificou a temperatura ótima de 34 °C e a máxima, em alguns isolados, de 46 °C, temperatura máxima não corroborada no presente estudo.

Plaats-Niterink (1981) avaliou o crescimento micelial de *Pythium* spp. em BCA (batata-cenoura-agar), verificando que a temperatura ótima para *P. dissotocum* esteve entre 20-25 °C e a máxima de 35 °C e, para *P. aphanidermatum*, entre 35-40 °C e a máxima 40 °C. Tojo *et al.* (2006), ao avaliar o crescimento de *P. aphanidermatum* em BCA, encontraram a temperatura ótima de 37 °C e a máxima de 40 °C. Provavelmente, as diferenças apresentadas com relação às temperaturas ótimas dos isolados aqui estudados e os citados em literatura, devem-se ao emprego de diferentes meios de cultivo e diferentes linhagens estudadas.

Triki *et al.* (2001) avaliaram a influência da temperatura sobre o crescimento de *Pythium aphanidermatum*, verificando a temperatura ótima de 30 °C e a máxima entre 37-40 °C, não havendo diferença considerável entre as temperaturas apresentadas pelos autores e as obtidas no presente estudo.

Verificou-se em isolado de *Pythium dissotocum*, proveniente de cultivo hidropônico de rúcula, a temperatura ótima de crescimento de 27 °C e a máxima de 35 °C (Baptista 2007), não diferindo muito das encontradas para o espécime aqui estudado.

Serrano *et al.* (2008), estudando a influência da temperatura sobre o desenvolvimento de *Pythium aphanidermatum*, verificaram que a temperatura ótima está entre 28-34 °C e a máxima de 40 °C, sendo as temperaturas encontradas no presente estudo semelhantes às obtidas pelos autores.

Avaliação da patogenicidade *in vitro* de *Pythium aphanidermatum* e *P. dissotocum* nas variedades estudadas - Avaliando-se o comprimento da radícula, em 20 °C, para *Pythium dissotocum*, não foram obtidas diferenças, ao nível de 5%, entre as variedades, e quando avaliado o comprimento do hipocótilo, a variedade Mimosa foi a menos suscetível, enquanto diferenças estatísticas não foram encontradas entre as variedades mais suscetíveis, Vera, Tainá e Elisa. Para *P. aphanidermatum*, quando analisado o comprimento da radícula, houve diferença estatística entre as variedades, sendo a variedade Elisa a mais suscetível, diferindo estatisticamente de Vera e Tainá, menos suscetíveis. Quando avaliado o hipocótilo, a variedade Mimosa foi a menos suscetível e as variedades Vera, Tainá e Elisa, as mais suscetíveis, com obtenção de diferença estatística entre Vera e Tainá. Observou-se, por meio da análise do comprimento da radícula, que os espécimes apresentaram patogenicidade nas variedades, visto que os tratamentos inoculados com tais espécimes diferiram estatisticamente da testemunha controle, o mesmo não acontecendo em relação ao hipocótilo (tabela 1). Nenhum dos espécimes ocasionou a morte das plântulas, mas detectou-se pequena necrose da raiz principal e inibição de raízes laterais, com desenvolvimento normal no tratamento controle.

Tabela 1. Avaliação patogênica *in vitro* de *Pythium dissotocum* e *P. aphanidermatum* em 20 °C.

Table 1. Pathogenic evaluation *in vitro* of *Pythium dissotocum* and *P. aphanidermatum* at 20 °C.

Variedades	Comprimento da radícula (cm)			Comprimento do hipocótilo (cm)		
	Controle	<i>P. dissotocum</i>	<i>P. aphanidermatum</i>	Controle	<i>P. dissotocum</i>	<i>P. aphanidermatum</i>
Mimosa	5,47aB	2,07aA	1,96abA	0,78bA	0,89bA	0,96cA
Vera	7,36bB	2,85aA	2,99bA	0,46aA	0,43aA	0,45aA
Tainá	5,29aB	2,27aA	2,73bA	0,94bB	0,51aA	0,70bA
Elisa	8,64bC	2,61aB	1,25aA	0,48aA	0,53aA	0,54abA

*Minúscula comparada na vertical e maiúscula comparada na horizontal
Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste de Tukey

Na temperatura de 26 °C, ótima para *P. dissotocum*, avaliando-se o comprimento da radícula, Mimosa e Tainá foram as mais suscetíveis e, Vera e Elisa, as menos suscetíveis. Em relação ao hipocótilo, Vera e Elisa foram as mais suscetíveis, enquanto Mimosa e Tainá, as menos suscetíveis. O espécime não ocasionou a morte das plântulas, somente redução no comprimento das radículas (tabela 2), com pequena necrose, e inibição da formação de raízes laterais, havendo diferença entre este e o tratamento controle.

Para *P. aphanidermatum*, em 31 °C, avaliando-se o comprimento da radícula, diferenças significativas não foram encontradas entre as variedades, entretanto, estes tratamentos diferiram dos tratamentos controle. Quando avaliado o comprimento do hipocótilo, a variedade Tainá foi a menos suscetível e a variedade Vera, a mais suscetível. A temperatura parece ter sido responsável pela baixa porcentagem de plântulas sobreviventes entre as variedades, sendo que, a menor porcentagem, 62,85 %, foi verificada em Vera (tabelas 3, 4). Observou-se um aumento significativo na severidade da doença, expressa pela porcentagem de plântulas sobreviventes, com inibição da formação de

raízes laterais, necrose das pontas das raízes principais e laterais e, necrose acentuada nas raízes principais.

As plântulas não inoculadas apresentaram bom desenvolvimento, porém, foram menores que aquelas cultivadas a 20 °C, e exibiram uma menor quantidade de raízes laterais, demonstrando que, com a elevação da temperatura, as plântulas de alface apresentam menor índice de desenvolvimento (tabelas 1, 3).

Neste estudo, utilizou-se a temperatura ótima de crescimento dos espécimes para selecionar o isolado de *Pythium* mais patogênico, considerando-se a porcentagem de plântulas sobreviventes, uma vez que os mesmos praticamente não apresentaram diferenças estatísticas entre si quando avaliados em 20 °C. Assim, *P. aphanidermatum*, foi considerado o isolado mais patogênico. As variedades mais e menos suscetíveis, foram selecionadas na temperatura ideal para a alface (20 °C), na qual as plântulas possuem maior resistência natural e melhores condições para o desenvolvimento, tendo sido o comprimento da radícula, o parâmetro considerado, por ser a estrutura mais afetada, quando do ataque por *Pythium* spp. A variedade Elisa foi a mais suscetível, e as variedades Vera e Tainá as menos suscetíveis (tabela 1).

Tabela 2. Avaliação patogênica *in vitro* de *Pythium dissotocum* em 26 °C.

Table 2. Pathogenic evaluation *in vitro* of *Pythium dissotocum* at 26 °C.

Variedades	Comprimento da radícula (cm)		Comprimento do hipocótilo (cm)	
	Controle	<i>P. dissotocum</i>	Controle	<i>P. dissotocum</i>
Mimosa	4,45aB	2,56aA	1,04bA	1,01bA
Vera	7,64cbB	4,16bA	0,50aA	0,43aA
Tainá	6,68bB	2,74aA	1,04bA	0,94bA
Elisa	8,68cB	4,23bA	0,64aA	0,49aA

*Minúscula comparada na vertical e maiúscula comparada na horizontal
Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste de Tukey

Tabela 3. Avaliação patogênica *in vitro* de *Pythium aphanidermatum* em 31 °C.

Table 3. Pathogenic evaluation *in vitro* of *Pythium aphanidermatum* at 31 °C.

Variedades	Comprimento da radícula (cm)		Comprimento do hipocótilo (cm)	
	Controle	<i>P. aphanidermatum</i>	Controle	<i>P. aphanidermatum</i>
Mimosa	2,09aB	0,88aA	1,05bA	0,90bcA
Vera	3,85cB	0,55aA	0,53aB	0,25aA
Tainá	2,88bB	1,10aA	1,30bA	1,06cA
Elisa	4,54cB	0,74aA	0,67aA	0,58abA

*Minúscula comparada na vertical e maiúscula comparada na horizontal
Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste de Tukey

Tabela 4. Percentagem de plântulas sobreviventes na avaliação patogênica in vitro de *Pythium aphanidermatum* em 31 °C.Table 4. Percentage of seedlings surviving in the pathogenic evaluation in vitro of *Pythium aphanidermatum* at 31 °C.

Variedades	Plântulas sobreviventes (%)	
	Controle	<i>P. aphanidermatum</i>
Mimosa	100aB	85,71bA
Vera	100aB	62,85aA
Tainá	100aA	97,14bA
Elisa	100aA	88,57bA

*Minúscula comparada na vertical e maiúscula comparada na horizontal
Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste de Tukey

Pinto *et al.* (2005) estudaram a suscetibilidade de variedades de alface a *Pythium helicoides*, verificando que variedades crespas foram mais suscetíveis, quando comparadas com as do tipo mimosa e lisa, dados corroborados por Baptista (2007) para *P. middletonii* e *P. dissotocum*. Provavelmente, a suscetibilidade das variedades é diretamente proporcional à patogenicidade do fungo estudado.

O potencial patogênico de *Pythium aphanidermatum* tem sido constantemente citado em literatura. Herrero *et al.* (2003) estudando a patogenicidade de *Pythium* spp. e *Phytophthora* spp. em plântulas de pepino, obtiveram *P. aphanidermatum* como uma das espécies mais agressivas. Howell (2002) testou a patogenicidade de espécies de *Pythium* em plântulas de algodão e verificou que *P. aphanidermatum* ocasionou a morte de 47% das plântulas, após 7 dias de incubação em 25 °C. Punja & Yip (2003) estudaram o potencial patogênico de *Pythium aphanidermatum* em plântulas de pepino, verificando após três semanas de incubação, a mortalidade de mais de 80% das plântulas inoculadas.

Dos fatores que interferem na patogenicidade das espécies de *Pythium*, a temperatura é apontada como um dos mais significativos (Bates & Stanghellini 1984, Stanghellini & Kim 1998, Stanghellini & Rasmussen 1994, Owen-Going *et al.* 2003, Sutton *et al.* 2006, Baptista 2007). Plaats-Niterink (1981) relata que, quando condições são favoráveis para o fungo, mas são desfavoráveis para o hospedeiro, espécies de *Pythium* podem tornar-se muito patogênicas. Em revisão realizada por Sutton *et al.* (2006), os autores ressaltam que, geralmente, altas temperaturas

predispõem as plantas às doenças radiculares. A agressividade de *Pythium aphanidermatum* é altamente influenciada pela temperatura, apresentando maior potencial patogênico nas épocas quentes do ano, quando a temperatura eleva-se acima de 23 °C (Bates & Stanghellini 1984, Herrero *et al.* 2003, Cipriano *et al.* 2005).

Teixeira *et al.* (2006) estudaram o efeito da temperatura no potencial patogênico de espécies de *Pythium* na variedade de alface Verônica, verificando que isolados de *P. helicoides*, considerados os mais patogênicos, ocasionaram, em 30 °C, a mortalidade de 100 % das sementes logo após sua germinação, enquanto a 21 °C induziram o subdesenvolvimento de plântulas, acompanhado ou não de necrose dos tecidos radiculares. Stirling *et al.* (2004) observaram diferença na patogenicidade de *Pythium aphanidermatum* e *P. myriotylum* em plantas de pimenta, sob diferentes temperaturas. Segundo os autores, a podridão radicular causada por estes patógenos foi significativamente mais severa em 35 °C e 40 °C do que em 30 °C. Baptista (2007) estudou a patogenicidade de *Pythium middletonii* e *P. dissotocum* em variedades de alface, verificando grande influência da temperatura no potencial patogênico de *P. dissotocum*, isolado mais agressivo. Em 20 °C, o espécime ocasionou a inibição da formação de raízes laterais e necrose acentuada da raiz principal, na ausência de morte das plântulas; enquanto que em 27 °C, além da sintomatologia verificada na temperatura de 20 °C, houve uma baixa porcentagem de plântulas sobreviventes entre as variedades inoculadas.

Verificou-se no presente estudo que as variedades de alface estudadas apresentaram diferenças de suscetibilidade aos patógenos e temperaturas avaliadas; e que a temperatura foi fator decisivo no potencial patogênico dos isolados de *Pythium* nas variedades de alface, com *P. aphanidermatum* mostrando maior eficiência como fitopatógeno. Estes resultados evidenciam a necessidade da busca de variedades resistentes aos patógenos normalmente encontrados nos sistemas hidropônicos, bem como, do controle da temperatura nestes sistemas.

Agradecimentos

Ao CNPq (PIBIC), pelo auxílio financeiro sob a forma de concessão de bolsa de iniciação científica à primeira autora e ao Filipe Rosa Baptista, pelos ensinamentos referentes à metodologia utilizada.

Literatura citada

- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W. & Blackwell, M.** 1996. Introductory Mycology. 4 ed. John Wiley & Sons, New York.
- Baptista, F.R.** 2007. *Pythium middletonii* Sparrow e *Pythium dissotocum* Drechsler em alface (*Lactuca sativa* L.): avaliação patogênica e controle biológico. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo.
- Bates, M.L. & Stanghellini, M.E.** 1984. Root rot of hydroponically grown spinach caused by *Pythium aphanidermatum* and *P. dissotocum*. Plant Disease 68: 989-991.
- Calvo-Bado, L.A., Petch, G., Parsons, N.R., Morgan, J.A.W., Pettit, T.R. & Whipps, J.M.** 2006. Microbial community responses associated with the development of oomycete plant pathogens on tomato roots in soilless growing systems. Journal of Applied Microbiology 100: 1194-1207.
- Carvalho, Y. & Milanez, A.I.** 1989. Efeitos da temperatura e umidade do solo sobre *Pythium splendens*. Revista de Microbiologia 20: 477-482.
- Cipriano, M.A.P., Santos, A.S., Patricio, F.R.A., Freitas, R.P. & Pires-Zottarelli, C.L.A.** 2005. Potencial de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Pythium aphanidermatum* em sistemas hidropônicos. Arquivos do Instituto Biológico 72 (supl.): 1-63.
- Dick, M.W.** 2001. Straminipilous Fungi. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Figueiredo, M.B.** 1967. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas. O Biológico 33: 9-13.
- Frezzi, M.J.** 1956. Especies de *Pythium* fitopatogénas identificadas en la República Argentina. Revista de Investigaciones Agrícolas 10: 113-241.
- Furlani, P.R.** 1996. Hidroponia. Boletim Técnico 100. Instituto Agronômico de Campinas, Campinas.
- Furlani, P.R.** 1999. Hydroponic vegetable production in Brazil. Acta Horticulturae 481: 777-778.
- Goldberg, N.P. & Stanghellini, M.E.** 1990. Ingestion-egestion and aerial transmission of *Pythium aphanidermatum* by shore flies (Ephydrinae: *Scatella stagnalis*). Phytopathology 80: 1244-1246.
- Gull, C., Labuschagne, N. & Botha, W.J.** 2004. *Pythium* species associated with wilt and root of hydroponically grown crops in South Africa. African Plant Protection 10: 109-116.
- Herrero, M.L., Hermansen, A. & Elen, O.N.** 2003. Occurrence of *Pythium* spp. and *Phytophthora* spp. in Norwegian greenhouses and their pathogenicity on cucumber seedlings. Journal of Phytopathology 151: 36-41.
- Howell, C. R.** 2002. Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. Phytopathology 92: 177-180.
- Jenkins, S.F. & Averre, C.W.** 1983. Root diseases of vegetables in hydroponic culture systems in North Carolina greenhouses. Plant Disease 67: 968-970.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C. & Stalpers, J.A.** 2001. Dictionary of Fungi. CABI Bioscience, Wallingford.
- Lopes, M.C., Freier, M., Matte, J.C., Gärtner, M., Franzener, G., Nogarolli, E.L. & Sevigiani, A.** 2003. Acúmulo de nutrientes por cultivares de alface em cultivo hidropônico no inverno. Horticultura Brasileira 21: 211-215.
- Menzies, J.G., Ehret, D.L. & Stan, S.** 1996. Effect of inoculum density of *Pythium aphanidermatum* on the growth and yield of cucumber plants grown in recirculating nutrient film culture. Canadian Journal of Plant Pathology 18: 50-54.
- Middleton, J.T.** 1943. The taxonomy, host range and geographic distribution of the genus *Pythium*. Memoirs of the Torrey Botanical Club 20: 1-171.
- Milanez, A.I.** 1989. Fungos de águas continentais. In: O. Fidalgo & V.L. Bononi (coords.). Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico. Instituto de Botânica, São Paulo.
- Nascimento, W.M. & Cantliffe, D.J.** 2002. Germinação de sementes de alface sob altas temperaturas. Horticultura Brasileira 20: 103-106.
- Owen-Going, N., Sutton, J.C. & Grodzinski, B.** 2003. Relationships of *Pythium* isolates and sweet pepper plants in single-plant hydroponic units. Canadian Journal of Plant Pathology 25: 155-167.
- Pinto, Z.V., Sousa, A.L.O.P., Silva, C.P., Duarte, D.G., Patrício, F.R.A., Santos, A.S. & Teixeira-Yañez, L.D.T.** 2005. Reação de cultivares de alface à podridão de raízes, causada por *Pythium helicoides*, em sistemas hidropônicos. Summa Phytopathologica 31(supl.): 96.
- Plaats-Niterink, A.j. van der.** 1981. Monograph of the genus *Pythium*. Studies in Mycology 21: 1-242.
- Postma, J., Geraats, B.P.J., Pastoor, R. & Elsas, J. D.** 2005. Characterization of the microbial community involved in the suppression of *Pythium aphanidermatum* in cucumber grown on rockwool. Phytopathology 95: 808-818.
- Punja, Z.K. & Yip, R.** 2003. Biological control of damping-off and root rot caused by *Pythium aphanidermatum* on greenhouse cucumbers. Canadian Journal of Plant Pathology 25: 411-417.
- Rodrigues, L.R.F.** 2002. Técnicas de cultivo hidropônico e de controle ambiental no manejo de pragas, doenças e nutrição vegetal em ambiente protegido. FUNEP, Jaboticabal.
- Serrano, Y., Guirado, M.L., Carmona, M.P. & Gómez, J.** 2008. First report of root and crown necrosis of bean

- caused by *Pythium aphanidermatum* in Spain. Plant Disease 92: 174.
- Silva, M.S.C. & Lima Neto, V.C.** 2007. Doenças em cultivos hidropônicos de alface na região metropolitana de Curitiba/PR. Scientia Agraria 8: 275- 283.
- Stanghellini, M.E. & Kim, D.H.** 1998. First report of root rot of hydroponically grown lettuce caused by *Pythium myriotylum* in a commercial production facility. Phytopathology 74: 796.
- Stanghellini, M.E. & Kronland, W.C.** 1986. Yield loss in hydroponically grown lettuce attributed to subclinal infection of feeder rootlets by *Pythium dissotocum*. Plant Disease 70: 1053-1056.
- Stanghellini, M.E. & Rasmussen, S.J.** 1994. Hydroponics: a solution for zoosporic pathogens. Plant Disease 78: 1129-1137.
- Stirling, G.R., Eden, L.M. & Ashley, M.G.** 2004. Sudden wilt of capsicum in tropical and subtropical Australia: a severe form of *Pythium* root rot exacerbated by high soil temperatures. Australasian Plant Pathology 33: 357-366.
- Sutton, J.C., Sopher, C.R., Owen-Going, T.N., Liu, W., Grodzinsk, B., Hall, J.C. & Benchimol, R.L.** 2006. Etiology and epidemiology of *Pythium* root rot in hydroponic crops: Current knowledge and perspectives. Summa Phytopathologica 32: 307-321.
- Teixeira, L.D.D., Pires-Zottarelli, C.L.A. & Kimati, H.** 2006. Efeito da temperatura no crescimento micelial e patogenicidade de *Pythium* spp. que ocorrem em alface hidropônica. Summa Phytopathologica 32: 221-226.
- Tojo, M., Yonemoto, K. & Kawamura, A.** 2006. First report of *Pythium aphanidermatum* on *Basella rubra* in Japan. Plant Disease 90: 830.
- Triki, M.A., Priou, S., El Mahjoub, M. & Baudry, A.** 2001. Leak syndrome of potato in Tunisia caused by *Pythium aphanidermatum* and *Pythium ultimum*. Potato Research 44: 221-231.
- Utkhede, R.S., Levesque, C.A. & Dinh, D.** 2000. *Pythium aphanidermatum* root rot in hydroponically grown lettuce and the effect of chemical and biological agents on its control. Canadian Journal of Plant Pathology 22: 138-144.