CONTROLE BIOLÓGICO, FÍSICO E QUÍMICO DE
Phytophthora parasitica DASTUR EM MUDAS DE CITROS

LOUISE LARISSA MAY

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. HIROSHI KIMATI

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiróz” da Universi-
dade de São Paulo, para obtenção de título de
Mestre em Agronomia, Área de concentra-
ção: Fitopatologia.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Setembro - 1994

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCLQ/USP

May, Louise Larissa

M466c Controle biológico, físico e químico de
Phytophthora parasitica Dastur em mudas de citros.
Piracicaba, 1994.
89p. ilustr.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Fruta cítrica - Doença - Controle 2. Fruta cítri
ca - Muda - Produção 3. Fungo fitopatogênico - Contro
le 4. Gomose em fruta cítrica - Controle I. Escola Su-
perior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 634.3
632.452

CONTROLE BIOLÓGICO, FÍSICO E QUÍMICO DE
Phytophthora parasitica DASTUR EM MUDAS DE CITROS.

LOUISE LARISSA MAY

Aprovada em: 30.09.94

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Hiroshi Kimati

ESALQ/USP

Prof^a Dr^a Lilian Amorim

ESALQ/USP

Prof^a Dr^a Maria Lúcia R. Z. da Costa Lima

UFPR

Prof. Dr. Hiroshi Kimati
Orientador

A minha querida mãe

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr Hiroshi Kimati, pela valiosa orientação e amizade;
- Aos Profs Dr.Vismar da Costa Lima Neto e Maria Lúcia R. Z. da Costa Lima pelo incentivo e apoio;
- Aos Docentes do Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP, pelos ensinamentos;

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida;

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia pelo auxílio na realização deste trabalho;

- Ao Eng^o Yataro Nagano pelo auxílio para execução do presente trabalho.
- Aos colegas do curso de Pós-graduação pelo convívio e amizade;
- À amiga Marise pela ajuda e incentivo em todos os momentos;
- Ao Rômulo pela compreensão e apoio durante todo o Mestrado;
- A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO.....	xii
SUMMARY.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Etiologia e sobrevivência de <i>Phytophthora</i> spp.....	3
2.2. Detecção e quantificação de <i>Phytophthora</i> spp.....	6
2.3. Esporulação e inoculação de <i>Phytophthora</i> spp.....	8
2.4. Controle de <i>Phytophthora</i> spp.....	10
2.4.1. Controle biológico.....	11
2.4.2. Controle físico.....	13
2.4.3. Controle químico.....	15

3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. Obtenção de isolados de <i>Phytophthora parasitica</i>	19
3.2. Obtenção de isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	20
3.3. Produção de inóculo de <i>P. parasitica</i>	21
3.3.1. Esporulação.....	21
3.3.2. Infestação do solo e quantificação do inóculo.....	22
3.4. Controle de <i>Phytophthora parasitica</i> dos citros.....	24
3.4.1. Controle biológico “in vitro” para avaliação da atividade antagônica do <i>Trichoderma</i> spp.....	24
3.4.2. Uso de antagonistas em forma de pellets e em farinha de arroz.....	26
3.4.3. Controle físico por Solarização em coletor solar e em sacos plásticos.....	26
3.4.4. Seleção de fungicidas “in vitro” para o controle químico de <i>P. parasitica</i>	29
3.4.5. Controle químico de <i>P. parasitica</i> em mudas de citros sob condições de casa de vegetação.....	31
4. RESULTADOS.....	34
4.1. Obtenção de isolados de <i>Phytophthora parasitica</i>	34
4.2. Obtenção de isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	35

4.3. Produção de inóculo de <i>P. parasitica</i>	35
4.4. Controle de <i>P. parasitica</i> em citros.....	37
4.4.1. Controle biológico “in vitro” para avaliação da atividade antagônica do <i>Trichoderma</i>	37
4.4.2. Uso de antagonistas em forma de pellets e em farinha de arroz.....	41
4.4.3. Controle físico por solarização em coletor solar e em sacos plásticos.....	44
4.4.4. Controle químico através da seleção de fungicidas “in vitro” para o controle de <i>P. parasitica</i>	50
4.4.5. Controle químico de <i>P. parasitica</i> em mudas de citros sob condições de casa de vegetação.....	55
5. DISCUSSÃO.....	62
5.1. Obtenção de isolados e produção de inóculo.....	62
5.2. Controle biológico de <i>P. parasitica</i>	64
5.3. Controle físico de <i>P. parasitica</i>	67
5.4. Controle químico de <i>P. parasitica</i>	69
6. CONCLUSÕES.....	73
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Crescimento de *Phytophthora parasitica* (isolado 1, isolado 7 e isolado 164) comparado à *P. capsici*, após 96 horas, em diferentes temperaturas..... 34
- Figura 2. *P. parasitica* crescendo em placa com meio BDA onde havia sido colocado papel celofane com ou sem *Trichoderma*. (T= testemunha sem *Trichoderma*, Is-71/6 e Is- 71/8= isolados de *Trichoderma* sobre o celofane por 48 horas..... 41
- Figura 3. Variação de temperatura do solo no experimento de solarização no inverno nos tratamentos em sacos plásticos e em coletor solar por 24 e 48 horas..... 45
- Figura 4. Variação da temperatura do solo no inverno e no verão em sacos plásticos e em coletor solar comparados com a temperatura ambiente..... 45
- Figura 5. Desenvolvimento de mudas produzidas em tubetes do porta-enxerto limão cravo com 2 meses de idade no experimento de controle físico através de solarização. (T.INOC = testemunha inoculada, TRICHO= *Trichoderma*, CS-48/TR= coletor solar + *Trichoderma*, SP-24 = Saco Plástico solarizado por 24

horas, CS-24 = coletor solar por 24 horas, TEST= testemunha, SP-48 = saco plástico solarizado por 48 horas, CS-48= coletor solar por 48 horas).....	49
Figura 6. Sensibilidade <i>in vitro</i> de 2 isolados de <i>P. parasitica</i> e cinco isolados de <i>Trichoderma</i> aos produtos químicos metalaxyl e chlorothalonil, na concentração de 100ppm comparados com a testemunha (apenas BDA).....	52
Figura 7. Peso de raízes de mudas de limão cravo e laranja caipira do experimento de controle químico em sementeira.....	57
Figura 8. Peso de parte aérea de mudas de limão cravo e laranja caipira do experimento de controle químico em sementeira....	57
Figura 9. Altura das mudas de limão cravo e laranja caipira do experimento de controle químico em sementeira.....	57
Figura 10. Número de mudas de limão cravo e laranja caipira do experimento de controle químico em sementeira.....	57
Figura 11. Altura de plantas, peso de parte aérea e peso de raiz de muda de limão cravo do experimento de controle químico em tubetes.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Amostras de solos de diferentes procedências para obtenção de isolados de <i>Trichoderma</i> antagônicos à <i>Phytophthora parasitica</i>	21
Tabela 2. Produtos químicos testados quanto a eficiência "in vitro" no controle de <i>P. parasitica</i> dos citros.....	31
Tabela 3. Produtos e dosagens utilizados no experimento de controle químico em sementeiras.....	32
Tabela 4. Produtos e dosagens utilizados no experimento de controle químico em tubetes.....	33
Tabela 5. Número de isolados de <i>Trichoderma</i> spp obtidos dos solos do campo de café e da mata com ou sem isca de <i>P. parasitica</i>	35
Tabela 6. Crescimento de colônia de <i>P. parasitica</i> a 28 °C e luz contínua em 5 meios de culturas avaliados em dois ensaios.....	36

Tabela 7. Crescimento e Esporulação de <i>P. parasitica</i> em diferentes concentrações do meio de cenoura, a 28°C e luz contínua.....	37
Tabela 8. Eficiência do antagonismo de isolados de <i>Trichoderma</i> pareados contra <i>P. parasitica</i> em meio BDA, incubados a 28°C e luz contínua por 72 horas.....	38
Tabela 9. Inibição “in vitro” de <i>P. parasitica</i> por substâncias antagonicas, através do teste do papel celofane, com cinco isolados de <i>Trichoderma</i> previamente selecionados por hiperparasitismo sob 28°C e luz contínua por 72 horas.....	39
Tabela 10. Potencial antagonico de cinco isolados de <i>Trichoderma</i> em teste de pareamento de colônias em meio BDA com 20 ppm de Benomyl, a 28 °C e luz contínua por 72 horas.....	41
Tabela 11. Recuperação de <i>P. parasitica</i> do solo do experimento de Controle Biológico em casa de vegetação, com mudas de limão cravo, após 3 meses do transplante, pelo teste de isca.....	42

- Tabela 12. Efeito de formulação e concentração de inóculo de *Trichoderma* sobre o desenvolvimento de mudas do porta - enxerto limão cravo transplantados para substratos de tubetes infestados com *P. parasitica*, avaliadas após 3 meses..... 43.
- Tabela 13. Recuperação de *P. parasitica* pelo teste de isca em solos solarizados em Coletor Solar (CS) e em Sacos Plásticos (SP) por 24 e 48 horas. Jaguariuna, junho/93..... 46
- Tabela 14. Eficiência dos tratamentos de solarização em sacos plásticos e coletor solar por 24 e 48 horas, do tratamento com rega de *Trichoderma* em suspensão de conídios e da associação coletor / *Trichoderma*, no controle de podridão de radículas provocada por *P. parasitica*..... 47
- Tabela 15. Efeito da duração da solarização em sacos plásticos transparentes sobre a sobrevivência de *P. parasitica* Jaguariuna, janeiro/94..... 48
- Tabela 16. Sensibilidade de *P. parasitica* e de *Trichoderma* spp a 15 produtos químicos na concentração de 100 ppm, a 25°C..... 50

Tabela 17. Inibição de <i>P. parasitica in vitro</i> por diversos fungicidas nas concentrações de 1 e 10 ppm.....	53
Tabela 18. Inibição de <i>P. parasitica in vitro</i> por diferentes formulações de metalaxyl nas concentrações de 1, 10 e 100 ppm.....	54
Tabela 19. Controle Químico de <i>P. parasitica</i> em mudas de Limão Cravo (LC) e de Laranja Caipira (Lar.) em sementeiras sob condições de casa de vegetação	56
Tabela 20. Controle Químico de <i>P. parasitica</i> em mudas de Limão Cravo em tubetes sob condições de casa de vegetação.....	58
Tabela 21. Rrecuperação de <i>P. parasitica</i> do solo (em duas épocas) e das raízes pelo teste de isca para no experimento de Controle Químico em tubetes.....	60
Tabela 22. Recuperação quantitativa de <i>P. parasitica</i> do solo pelo teste de isca do experimento de Controle Químico em tubetes.....	61

CONTROLE BIOLÓGICO, FÍSICO E QUÍMICO DE *Phytophthora parasitica* DASTUR EM MUDAS DE CITROS.

Autor: Louise Larissa May
Orientador: Prof. Dr. Hiroshi Kimati

RESUMO

No presente trabalho avaliou-se técnicas de controle biológico, físico e químico do principal agente causal da gomose dos citros, *Phytophthora parasitica* Dastur, no tratamento de substrato para produção de mudas de porta-enxerto de citros em tubetes. Tal estudo objetivou a produção de mudas de citros com alta qualidade fitossanitária.

Isolados de *Trichoderma*, com alto potencial antagonístico contra *P. parasitica*, foram obtidos pelo uso de iscas, sementes de trigo esterilizadas e previamente colonizadas com *P. parasitica*. Os mais promissores, produzidos em farinha de arroz, quando testado em mistura, mostraram-se eficientes em eliminar o patógeno de substrato de produção de mudas pré inoculada, propiciando, na dosagem mais baixa (2 g/tubete de 100 ml), bom desenvolvimento das plantas.

A solarização através da exposição ao sol do substrato pré-inoculado com *P. parasitica* em coletor solar e em sacos plásticos transparentes foi altamente eficiente eliminando o patógeno com 24 horas de solarização no

coletor solar tanto no inverno como no verão e, com 48 horas de solarização em sacos plásticos transparentes no verão.

Para o controle químico de *P. parasitica* testou-se a eficiência de controle de alguns produtos químicos *in vitro*. Os fungicidas selecionados, através do potencial de inibição ao patógeno, foram aplicados, sob condições de casa de vegetação em tubetes, ao substrato ou às mudas. O metalaxyl, aplicado sozinho ou em formulação mista com mancozeb e chlorothalonil foi altamente eficiente na erradicação de *P. parasitica* do substrato pré infestado, o que não ocorreu com propamocarb e fosetyl-Al.

BIOLOGICAL, PHYSICAL AND CHEMICAL CONTROL OF *Phytophthora parasitica* DASTUR IN CITRUS SEEDLINGS.

Author: Louise Larissa May
Adviser: Prof. Dr. Hiroshi Kimati

SUMMARY

This paper describes some techniques used for biological, physical and chemical control of gummosis, caused by *Phytophthora parasitica* Dastur, aiming the production of high quality seedlings of citrus rootstock in containers.

Potentially antagonistic isolates of *Trichoderma* obtained from baits (sterile wheat seeds colonized by *Phytophthora*) and grown on rice meal, were highly efficient to eradicate the pathogen from the previously inoculated substrate (compost) used for growing the rootstock seedlings .

Solarization of *P. parasitica*-inoculated substrate was also highly efficient, killing the pathogen within 24 hrs, with in summer and in winter in the solar collector, and withim 48 hrs in summer, when in transparent plastic bags.

For the Chemical control of *P. parasitica*, selected products were first tested “in vitro” to screen the ones with higher inhibition potentials; these were then used in the containers, under greenhouse conditions. The treatments done using metalaxyl eradicated the pathogen from the soil.

1. INTRODUÇÃO

A gomose, causada por *Phytophthora* spp, continua sendo um importante problema da citricultura brasileira, ocorrendo com bastante frequência e inviabilizando pomares comerciais mal implantados. Devido à falta de porta-enxertos altamente resistentes a esse patógeno, a produção de mudas cítricas, de alta qualidade fitossanitária, torna-se de fundamental importância como medida inicial de controle da doença, pois muitas mudas já vêm infectadas dos viveiros. Para garantir a sanidade das mudas cítricas contra os patógenos da gomose são preconizadas, entre outras medidas, a desinfestação do solo, o tratamento da água de irrigação, a escolha de solos com boa drenagem, a prevenção de ferimentos e outros fatores predisponentes. Hoje, viveiristas estão procurando novas tecnologias para obtenção de mudas, uma das quais consiste na produção de porta-enxerto em bandeja, em ambiente controlado, seguida de transplante para embalagem individual preenchida com substrato esterelizado. Esse método de formação facilita o isolamento do viveiro e confere melhor proteção não só contra gomose, mas também contra outros fungos e nematóides.

O presente trabalho analisa a possibilidade de controlar *Phytophthora parasitica*, espécie mais frequentemente associada à gomose dos citros no Brasil, de tais substratos, pré-infestados, através da aplicação de

Trichoderma, da solarização e de fungicidas sistêmicos. Na tentativa de eliminar problemas de especificidade de *Trichoderma* à espécie de *Phytophthora*, esforços foram feitos para isolar e selecionar este antagonista. Tais medidas de controle, caso comprovadas tecnicamente, são alternativas viáveis na substituição ao tratamento do substrato com brometo de metila.

2 . REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Etiologia e sobrevivência de *Phytophthora* spp

Segundo FEICHTENBERGER (1989), onze espécies de *Phytophthora* já foram descritas como capazes de induzir doença em plantas cítricas. Dessas, cinco já foram isoladas de plantas afetadas na América do Sul, quais sejam: *P. citrophthora* (Smith & Smith) Leonian, *P. nicotianae* var. *parasitica* (Dastur) Waterhouse, *P. cactorum* (Lebert & Cohn) Schroter, *P. palmivora* (Butler), e *P. cinnamomi* Rands. No Brasil, *P. citrophthora* e *P. nicotianae* var. *parasitica* são as mais encontradas nas principais regiões produtoras. Essas espécies estão classificadas dentro do grupo II, grupo "Palmivora" da chave de Waterhouse (WATERHOUSE, 1963), que têm algumas características básicas: o esporângio é apical e distintamente papilado, não prolifera internamente, normalmente é persistente e abundantemente produzido em ágar; possuem anterídio do tipo anfígeno, formam clamidósporos em diferentes posições e em geral são heterotáticas (RIBEIRO & VALDEBENITO-SANHUEZA, 1988). As principais espécies que ocorrem na cultura dos citros são basicamente diferenciadas pela curva de temperatura, sendo que *P. parasitica* cresce a temperaturas superiores a 35°C tendo como ótimo 30 - 32°C enquanto

P. citrophthora não cresce a 35°C e seu ótimo está em torno de 25 - 28°C (RIBEIRO, 1978).

De acordo com FEICHTENBERGER (1989), em condições favoráveis de temperatura e elevada umidade, esses fungos produzem esporângios, estruturas assexuais de formato globoso, papilados, formados geralmente na extremidade de uma hifa diferenciada chamada esporangióforo. Esses esporângios podem germinar diretamente ou indiretamente, em presença de água livre, através da liberação dos zoósporos produzidos no seu interior. Os zoósporos possuem dois flagelos o que lhes conferem mobilidade. Em meio líquido, essas estruturas movem-se em direção a partes suscetíveis do hospedeiro penetrando facilmente após encistarem, podendo, em alguns casos, alcançar regiões relativamente distantes. A infecção se completa em duas horas quando esporos do patógeno encontram-se sobre superfície úmida da planta. Eles podem ser atraídos por substâncias exsudadas pelas raízes, aumentando assim as chances de penetração. Os zoósporos encistados, quando em presença de aminoácidos, germinam. Do micélio desenvolvido por zoósporos ou esporângios surgem também outras estruturas como clamidósporos, geralmente formado em temperaturas mais baixas (18°C) que a ideal para crescimento de micélio, e oósporos, estruturas sexuais cujo aparecimento está possivelmente associado à falta de nutrientes.

Esporângios e zoósporos, estruturas da reprodução assexual do fungo, são as principais responsáveis pela rápida infecção e desenvolvimento da doença, atuando como inóculo secundário, enquanto oósporos e clamidósporos, desempenham papel de maior importância na fase de sobrevivência do patógeno, responsáveis pelo inóculo primário. Tal observação foi anteriormente relatada em estudos epidemiológicos de VAN DER PLANK (1963).

Com relação a condições favoráveis para o desenvolvimento de epidemias, foram relatados que temperaturas superiores a 25°C e alta umidade favorecem a infecção, no entanto, extremos de temperatura limitam o desenvolvimento da doença por efeitos diretos no patógeno ou por redução da infecção (BENSON, 1982 e FELD *et alii*, 1990). STOLZY *et alii* (1965) determinaram que para a regeneração de raízes de citros atacadas por *Phytophthora* spp, é mais importante a quantidade de tempo que o solo fica saturado do que a frequência de saturação, provavelmente, pelo tempo necessário para a formação de zoósporos e para o seu movimento até as raízes. Baixas quantidades de oxigênio próximo das raízes, aumenta a podridão e a planta não consegue mais crescer ou regenerar suas raízes.

Quanto à sobrevivência, relata-se (FEICHTENBERGER, 1989) que fungos do gênero *Phytophthora* sobrevivem no solo tanto às custas de estruturas vegetativas como das reprodutivas, entre as quais incluem-se micélio, esporângios, zoósporos, cistos, clamidósporos e oósporos. Na forma de micélio, o fungo não sobrevive por muito tempo por ser facilmente atacado por bactérias do solo que provocam sua lise. Clamidósporos, estruturas assexuais com parede celular, sobrevivem em maior ou menor tempo no solo conforme a espessura de sua parede. Oósporos, também denominados esporos de dormência, germinam somente após várias estações de dormência, contribuindo assim, para a permanência do fungo no solo por longos períodos. Já os zoósporos, não apresentam parede celular como os clamidósporos, e seu período de vida é muito curto tornando esses propágulos mais vulneráveis, sendo sua sobrevivência por períodos mais prolongados somente em forma de zoósporos encistados. Já THOMSON & ALLEN (1976) afirmaram que zoósporos ou outras estruturas produzidas por eles, sobrevivem em água de irrigação por 40 - 60 dias podendo

permanecer móveis por cerca de 20 horas e são estimulados ao encistamento por qualquer agitação ou contato físico.

GERLACH *et alii* (1976) relataram que *Phytophthora citrophthora* sobrevive até uma temperatura de 21°C em vários meios de ágar nutrientes mesmo quando previamente incubados à 4°C por 4 dias. O patógeno sobreviveu por pelo menos 40 semanas em folhas infectadas estando em contato com solo não estéril. A sobrevivência foi severamente afetada pela umidade. O micélio do fungo, segundo os mesmos autores, sobrevive a baixos níveis de umidade nas folhas (níveis maiores ou iguais a 25% do peso fresco original).

2.2. Detecção e quantificação de *Phytophthora* spp

O uso de plantas hospedeiras e frutos como isca para o isolamento de espécies de *Phytophthora* é uma prática bem conhecida (CAMPBELL, 1949; KLOTZ & DE WOLFE, 1958; ZENTMYER *et alii* 1960; CHEE & FOONG, 1968 e MARKS & MITCHELL, 1970). Para as espécies patogênicas de *Phytophthora* dos citros, alguns autores (KLOTZ & DE WOLFE, 1958 e TSAO, 1960) relataram a eficiência do uso de frutos de citros como isca para detecção e isolamento do patógeno do solo. GRIMM & ALEXANDER (1973) desenvolveram um teste de isca com pedaços de folhas de citros flutuando em mistura de solo + água, para detectar *Phytophthora* no solo. Os autores ainda observaram que não houve diferença de reação do teste com as diferentes variedades de citros utilizadas como isca. Este teste substituiu aqueles com iscas de frutos anteriormente utilizados por CAMPBELL (1949). Em estudos preliminares de THOMSON & ALLEN (1976) clamidósporos, esporângios,

cistos e "germilings" não infectavam iscas de folhas num período de 10 horas, mas zoósporos podiam infectar em 10 minutos. A formação de esporângios nas bordas das iscas ocorria dentro de 36 horas a 24°C.

ZITKO *et alii* (1987) comparando a eficiência do uso de meio seletivo, desenvolvido por KANNWISHER & MITCHELL (1978), com o teste de isca, concluíram que ambos apresentam a mesma eficiência. JEFFERS & MARTIN (1986), utilizando meios seletivos para espécies de *Phytophthora* e *Pythium*, concluíram que o uso de himexazol (50mg/l) adicionado aos meios P₁₀VPH ("cornmeal ágar" modificado com 10mg/l de pimaricina, 200mg/l de vancomicina-HCl e 100mg/l de PCNB) e P₅ARPH ("cornmeal ágar", ampicilina e rifampicina) suprimiram o desenvolvimento de *Pythium* facilitando o isolamento de *Phytophthora*.

TIMMER *et alii* (1993) comparando a técnica de ELISA com métodos padrões de isolamento para detecção de *Phytophthora* spp em campos de citros, evidenciaram a eficiência do teste ELISA para comprovar a atividade do patógeno no campo em forma de propágulos do solo e/ou nas raízes. A escolha do método de detecção no entanto, dependerá do material e pessoal disponíveis, da facilidade de coletar e processar as amostras e, finalmente, do custo de operação.

Em relação à quantificação, TIMMER *et alii* (1988), estudando métodos de amostragem para determinar a população de *Phytophthora* no solo, relataram que solo seco reduz drasticamente o número de propágulos e que umedecer o solo não aumenta esta densidade. Concluíram também, que baixa temperatura (8°C) de incubação do solo para detecção ou quantificação de propágulos, reduz a recuperação do fungo.

TSAO (1960) propôs um método, utilizando teste de isca, para estimar o potencial de doença, causada por *Phytophthora* em solo, através do

ponto final de diluição. Comparou através desse método diferentes níveis de propágulos ou grau de infestação do solo. Recentemente, MATHERON & MATEJKA (1991) quantificaram inóculo através da contagem de esporângios em volta de discos de ágar, por observação no microscópio ótico.

2.3. Esporulação e inoculação de *Phytophthora* spp

Segundo WATERHOUSE (1931) existem 5 fatores que afetam a produção de esporângios: umidade, oxigênio, luz, temperatura e nutrição. Quanto ao oxigênio, TSAO (1971) demonstrou que *P. parasitica* forma apenas clamidosporo e não esporângios quando submerso em água, necessitando, portanto, do oxigênio da superfície. Lilly⁽¹⁾ (1966), citado por ZENTMYER & ERWIN (1970), concluiu que a esporulação de *Phytophthora* é maior em condições de luz contínua e/ou luz alternada com escuro do que escuro contínuo. HENDRIX (1964) reportou a importância da presença de esterol para produção de esporângios em *P. lateralis*, *P. cactorum*, *P. capsici*, *P. infestans*, *P. palmivora*, *P. parasitica* e *P. parasitica*. var. *nicotianae*. O autor comenta ainda, que nas espécies supra citadas, esporângios normais não se formam na ausência de esteróis. MATHERON & MATEJKA (1990) estudando o efeito da temperatura na esporulação de *Phytophthora*, concluíram que o máximo de esporulação ocorria a 25°C e que em temperaturas inferiores ou superiores, como 10 e 35°C respectivamente, a esporulação era mínima. A importância da

¹ LILLY, V.G. The effects of sterol and light on the production and germination of *Phytophthora* spores. Colston Papers nr. 18 18 th Symp. of Colston. Res. Soc. Univ. of Bristol Proc. (England) Butterworth p.259-71. 1966.

temperatura no crescimento do fungo foi relatada por FAWCETT (1936) e, na esporulação, afetando o desenvolvimento das doenças como gomose e podridão de raízes, por MATHERON & MATEJKA (1992). Com relação a meios de cultivo para melhor esporulação, a literatura relata o uso, principalmente, do meio V8 como o mais eficiente (MENYONGA & TSAO, 1966; MIRCETICH *et alii*, 1968; TSAO, 1971; THOMSON & ALLEN, 1976). Este meio foi primeiramente relatado por MILLER (1955).

Para inoculação de *Phytophthora*, normalmente utilizam-se discos de micélio como inóculo para reproduzir o efeito de gomose do tronco (FARIH *et alii*, 1981a; DAVIS, 1982; FEICHTENBERGER, 1990a). No caso de podridão de raízes, a rega com suspensão de zoósporos é um dos métodos de inoculação mais utilizados (SANDLER *et alii*, 1986). KLOTZ & DE WOLFE (1960) pesquisando formas de produção de inóculo, relataram que zoósporos de *P. parasitica* podem ser estimulados para liberação simplesmente pela troca da água onde estejam os esporângios, por água fresca na mesma temperatura. O autor salienta, entretanto, a importância de usar água sem cobre e, preferivelmente, deionizada. MENYONGA & TSAO (1966), testando metodologia para produção de suspensão de zoósporos de *P. parasitica*, concluíram que a alta concentração de suco V8 (utilizado como meio de cultura para *Phytophthora*), aumenta o crescimento micelial, porém reduz a produção de esporângios. Apresentam neste trabalho, como melhor resultado para produção de esporângios, e conseqüentemente de zoosporos, o uso de V8-CaCO₃ clarificado e diluído. No entanto, o método de produção massal de clamidósporos desenvolvido por TSAO (1971) é também bastante empregado para infestação de solo, embora com a desvantagem de utilizar meios específicos e ser de execução demorada e muito trabalhosa.

2.4. Controle de *Phytophthora* spp

O controle das doenças ocasionadas por fungos do gênero *Phytophthora* compreende o uso de produtos químicos (fungicidas), medidas culturais, escolha do porta-enxerto, esterilização de solos para produção de mudas, dentre outros. Geralmente, o que se usa é um conjunto de medidas, variando conforme o caso. No Estado de São Paulo, o índice de contaminação em viveiros é alto e vem se agravando diante da substituição de porta-enxertos após o aparecimento da Tristeza e do Declínio. Atualmente, o uso do limão cravo (resistente à Tristeza mas altamente suscetível ao Declínio), é superior a 90% e os porta enxertos indicados para substituição, por serem tolerantes ao Declínio, são: laranja Caipira, tangerina Cleópatra e tangerina Sunki (FEICHTENBERGER, 1990b). Limão Cravo e tangerina Cleópatra são moderadamente suscetíveis à *Phytophthora* e laranja Caipira e tangerina Sunki são altamente suscetíveis, principalmente à *P. parasitica* (FEICHTENBERGER *et alii*, 1992).

A produção de mudas com alta qualidade fitossanitária é fundamental para evitar perdas ocasionadas por fungos do gênero *Phytophthora* no pomar. Recentemente vem sendo preconizada a produção de mudas em tubetes preenchidos com substratos comerciais, como por exemplo o Plantmax, composto por vermiculita expandida, matéria orgânica, macronutrientes e micronutrientes (EUCATEX MINERAL, 1994). O controle do fungo sob tais circunstâncias vem sendo feito principalmente através da fumigação com brometo de metila. Segundo TUCKER & ANDERSON 1972, o uso deste produto tem provocado enfezamento das mudas em vários viveiros da Flórida. KLEINSCHMIDT & GERDEMANN (1972) observaram que em solos fumigados não havia colonização de micorrizas e o desenvolvimento das plantas era menor.

Novas técnicas como controle biológico com microorganismos antagônicos, controle físico por solarização ou uso de produtos químicos específicos podem ser alternativas viáveis na tentativa de obter um substrato supressivo ao patógeno.

2.4.1 Controle biológico

BAKER & COOK (1974) definem controle biológico como sendo "a redução da densidade do inóculo ou atividade produtora de doença de um patógeno ou parasita no seu estado ativo ou dormente por um ou mais organismos, ocorrendo naturalmente, por manipulação do ambiente, hospedeiro ou antagonistas, ou ainda por introdução massal de um ou mais antagonistas".

Sabe-se no entanto, que o sucesso do uso de microorganismo no controle biológico depende muito da forma de aplicação do antagônico e naturalmente da especificidade deste em relação ao patógeno. ADAMS (1990) descreveu que espécies de *Trichoderma* são micoparasitas pouco agressivas e pouco eficientes, e que só atuam quando aplicados em nichos ecológicos especiais, como solo ou substratos recém-vaporizados ou fumigados; nestes ambientes alterados e não competitivos proliferam e evitam a recolonização do patógeno. Algumas alternativas para obtenção de formulações de antagonistas adequadas para o controle do patógeno têm sido estudadas por vários autores.

WEINDLING (1934) reportou que culturas filtradas de *Trichoderma lignorum* (Tode) Harz foram tóxicas à *Rhizoctonia solani* Kuhn e a outros fungos até mesmo em altas diluições. DENNIS & WEBSTER (1971) verificaram a produção de substâncias não voláteis por *Trichoderma* através da

técnica do papel celofane observando que tais substâncias são mais importantes na inibição da hifa de patógenos durante intensa competição por nutrientes. BELL *et alii* (1982) estudaram o potencial "in vitro" de controle por hiperparasitismo de *Trichoderma* a várias espécies de patógenos. Esses autores concluíram que um *Trichoderma* pode ter ótimo efeito de controle para um isolado do patógeno, mas não ter efeito em outros isolados da mesma espécie.

BACKMAN & RODRIGUEZ-KABANA (1975) controlaram *Sclerotium rolfsii* Sacc em campos de amendoim pela aplicação de grânulos de *Trichoderma harzianum* na superfície. Para KELLEY (1976), no entanto, o uso de *T. harzianum* em grânulos (mistura de *Trichoderma*, melão e argila) não foi eficiente para o controle de *Phytophthora cinnamomi*, pois além de não controlar o patógeno o uso dos grânulos aumentou a doença. Possivelmente esse aumento da doença tenha sido devido a fonte extra de energia proveniente dos grânulos. WINDHAM *et alii* (1986) utilizaram farelo de turfa para cultivo de *T. harzianum* e *T. koningii* com finalidade de induzir crescimento de plantas de tomate e fumo. LEVIS & PAPAVIDAS (1987) obtiveram sucesso no controle de tombamento de algodão e beterraba por *Rhizoctonia* utilizando pellets com alginato de *Trichoderma* e *Gliocladium*. BESNARD & DAVET (1993) relataram aumento na velocidade da taxa de germinação de sementes de tomate e de cucurbitáceas com culturas filtradas de *Trichoderma* spp para controle de *Pythium ultimum* "in vitro" e dois dos isolados testados foram altamente eficientes no controle do patógeno em casa de vegetação.

Como se pode observar, a literatura sobre controle biológico, especificamente com *P. parasitica* em citros, é escassa e necessita de maior exploração.

2.4.2. Controle físico

Métodos físicos, químicos e biológicos têm sido utilizados, antes do plantio, para reduzir a densidade do inóculo ou o potencial do patógeno no solo. Atualmente, a desinfestação de solo é feita principalmente por meios drásticos como fumigação (químico) ou pelo vapor (físico). Tais estratégias são específicas para controlar doenças severas como as causadas pelo gênero *Phytophthora*, sendo necessários equipamentos sofisticados e pessoal treinado. Estes métodos são de alto custo, às vezes fitotóxico e facilitam a reinfestação do solo devido à intensa redução de microorganismos antagônicos (KATAN, 1980). A solarização, no entanto, é um método seguro, não químico, não produz resíduos fitotóxicos, é relativamente barato e fácil de usar (KATAN, 1980). Além disso, com a solarização pode-se ter outras vantagens pois geralmente a maioria dos patógenos são menos resistentes ao aumento de temperatura que muitos saprófitas (BAKER & COOK, 1974). Em concordância com esses autores STAPLETON & DeVAY (1982) observaram que a densidade de população de actinomicetes e fungos termoresistentes permanece relativamente alta após a solarização, ocorrendo um aumento nos níveis de população em comparação aos tratamentos não solarizados.

Em teste de sensibilidade térmica, algumas espécies de *Phytophthora* revelaram-se altamente sensíveis (PULLMAN et alii, 1981 e JUAREZ-PALACIOS et alii 1991). KAEWRUANG et alii (1989) obtiveram 50% de redução da infecção de *Phytophthora criptogea*, agente causal de podridão de raízes em *Gerbera*, através da solarização, sendo o patógeno erradicado até uma profundidade de 30 cm. GRISTEIN et alii (1979), solarizando campo infestado

com *S. rolfii* do amendoim, conseguiram aumentar a produção em 123%. KATAN *et alii* (1976) também obtiveram um aumento na produção de berinjela de 215% com o uso da solarização controlando *Verticillium dahliae* (duas semanas com cobertura plástica eliminou *V.dahliae* numa profundidade de 0 - 25 cm).

BARBERCHECK & VON BROEMBSSEN (1986) relataram que clamidósporos de *P. cinnamomi* foram completamente inativados pela exposição a 38 - 41°C por 20 minutos ou 44°C por 10 minutos. Em ensaios de campo, a solarização por três semanas eliminou 91% do patógeno. A completa erradicação ocorreu com seis semanas de solarização.

LUTZ *et alii* (1991), estudando a influência do aquecimento de solos no aumento da germinação de propágulos de *P.parasitica*, concluíram que a germinação desses propágulos estava diretamente correlacionada, ou seja, aumentava a germinação com o acúmulo de unidades de calor de 0 - 150 graus dias e indiretamente correlacionada, diminuía a germinação, quando o acúmulo era de 150 - 1650 graus dias onde, graus dia = (temperatura de incubação - 12) x nº de dias de incubação.

JUAREZ-PALACIOS *et alii* (1991) estudaram a sensibilidade térmica de três espécies de *Phytophthora* e o efeito da solarização na sobrevivência desses fungos. Através de experimentos de laboratório, relataram que a temperatura de inativação para *P. cactorum* e para *P. megaspora* (isolado de alta temperatura) foi de 45°C por 30 min, e para *P. megaspora* (isolado de baixa temperatura) foi de 45°C por 20 minutos. Tais resultados, segundo os autores, indicam a possibilidade do uso de solarização para o manejo desses patógenos.

O método de solarização normalmente empregado é o uso de cobertura plástica (KATAN *et alii*, 1976; BARBERCHECK & VON BROEMBSSEN, 1986). Alguns pesquisadores porém, propuseram algumas alternativas para esterilizar solo em menores quantidades. KAEWRUANG *et alii* (1989) pesquisaram a eficiência da solarização em sacos plásticos no controle de podridão de raízes de Gérbera (*Gerbera jamesonii* L.) e o aumento de nutrientes neste solo. Os autores relataram que a taxa de infecção das raízes foi zero a partir da 3ª semana de solarização e que houve um aumento da fertilidade dos solos. GHINI (1993) propõe o uso de Coletor Solar, tubos pretos de ferro galvanizado colocados paralelamente em uma caixa de madeira e cobertos com um plástico transparente, para desinfestação de solo. O tratamento de solo no coletor solar por um dia foi suficiente para controlar *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium solani* fp. *phaseoli* e *Pythium aphanidermatum*.

2.4.3. Controle químico

Segundo TIMMER (1977), até pouco tempo atrás, o uso de fungicidas para controle de *Phytophthora* spp era limitado a pincelamento de troncos em árvores jovens com fungicidas cúpricos ou captan; também eram feitos tratamentos cirúrgicos da área lesionada do tronco; mais recentemente, a partir da década de 70, surgiram os fungicidas sistêmicos altamente efetivos contra fungos de gênero *Phytophthora*. Atualmente a estratégia de controle químico concentra-se na redução da população do fungo através do uso de produtos sistêmicos como metalaxyl (RIDOMIL) e fosetyl-Al (ALIETTE) (FARIH *et alii*, 1981a; TIMMER & CASTLE, 1985).

COFFEY & BOWER (1984), comparando resposta de seis espécies de *Phytophthora* a metalaxyl "in vitro", observaram que *P. citrophthora* na concentração de 0,1 ppm do produto teve 5% de inibição e em 5 ppm a inibição foi mais de 90%. Para *P. parasitica*, em 0,1 ppm, obteve-se 50 % e a 1 ppm foi inibida em 100%.

FARIH *et alii* (1981a) não recuperaram propágulos de *Phytophthora* de solo nem de raízes quando trataram o solo com metalaxyl (nas doses 25, 50, 60 ou 100 mg/l). Os autores infestaram o solo com clamidósporos pela técnica de TSAO (1971). Ainda no mesmo trabalho, os autores encontraram que 3g/l de fosetyl-Al não foi suficiente para controlar podridão de raízes em plântulas de citros. ZENTMYER (1970) contudo relatou o uso de pulverizações semanais com Fosetyl-Al a 50 e 100 ppm controlando podridão de raízes em abacate ocasionados por *P. cinnamomi*.

TIMMER & CASTLE (1985) caracterizaram o metalaxyl como altamente efetivo no controle de infecção de *Phytophthora* dos citros quando utilizado em forma de rega ou pintura de tronco. A mesma conclusão foi obtida por outros pesquisadores (TIMMER, 1977; DAVIS, 1981; FARIH *et alii*, 1981a). MENGE (1986) constatou que o uso de metalaxyl em regas reduz a população de *Phytophthora* na rizosfera, aumenta o número de raízes e a produção de citros quando ocorre alta infestação com o patógeno. Seus dados mostraram que a população do patógeno é reduzida severamente em até 90% com o uso dos produtos sistêmicos fosetyl-Al e metalaxyl.

SANDLER *et alii* (1986), estudando a duração do efeito de fosetyl-Al e de metalaxyl, concluíram que até 30 dias após a aplicação dos fungicidas, os produtos foram eficientes na redução da área da lesão e na taxa de severidade da doença, mas não foram eficientes a 60 ou 100 dias após a aplicação. O tratamento

com metalaxyl resultou um menor percentual de recuperação do fungo, indicando alguma atividade fungicida. MATHERON & MATEJKA (1988) relataram que após 117 dias de aplicação, metalaxyl, fosetyl-Al, H_3PO_3 e oxadixyl inibiram o crescimento do fungo em troncos de citros mas, propamocarb e ethazol não interferiram no crescimento de nenhuma das espécies testadas (*P. parasitica* e *P. citrophthora*). A atividade antifúngica do fosetyl-Al foi comparada com ácido fosforoso (H_3PO_3), produto de transformação do fosetyl-Al na planta, e concluiu-se que o H_3PO_3 tem uma eficiência geralmente maior na redução da infecção da haste em plântulas de *Persea indica* por *Phytophthora citricola* (FENN & COFFEY, 1984).

MATHERON & MATEJKA (1991) testando a eficiência de tetratiocarbamato de sódio para controlar *Phytophthora* dos citros, observaram que o produto tem boa ação sobre a motilidade de zoósporos (reduzindo para 3-4 minutos) e também capacidade para matar os zoósporos encistados restantes (na dosagem de $12\mu\text{g/ml}$). Porém, na mesma concentração não inibem formação de esporângios e crescimento micelial. Em outro trabalho, FULLER & GISI (1985) concluíram que o metalaxyl causou 90% de redução de crescimento micelial e formação de esporângios nas concentrações de $0,7\mu\text{g/ml}$ e $1,4\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

MUSUMECI *et alii* (1982) relataram que a absorção e translocação de metalaxyl em plântulas de laranja doce, aplicado no solo, foi constante e durou por todo o período estudado (20, 40 e 60 dias). Em estudos com limão cravo observou-se que de 2,6% do metalaxyl que translocou de uma solução nutritiva para planta, 1,5% se concentrou na raiz, 0,2% no caule e 0,9% nas folhas. Fosetyl-Al é translocado para as raízes e previne infecção (DAVIS, 1981), mas provavelmente não tem efeito sobre os propágulos do fungo no solo (SANDLER

et alii, 1988). Ao contrário de fosetyl-Al, o metalaxyl pode matar diretamente o fungo (DAVIS, 1982 e FARIH *et alii*, 1981b) e reduz o número de propágulos por unidade de área (SANDLER *et alii*, 1988).

FEICHTENBERGER (1990a), em concordância com outros pesquisadores (FARIH *et alii*, 1981a; MENGE, 1986), relatou que fosetyl-Al foi mais efetivo na redução do tamanho das lesões no tronco provocadas por *P. citrophthora* do que as provocadas por *P. parasitica*. Também afirma que fosetyl-Al é mais eficiente quando usado em pulverização foliar, já o metalaxyl é mais eficiente em rega que em pulverização para *P. citrophthora* e tanto em rega como em pulverização para *P. parasitica*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção de isolados de *Phytophthora parasitica*

Os isolados de *P. parasitica* utilizados nos experimentos foram obtidos, a partir de solos de pomares cítricos, pela técnica de isca para detecção de *Phytophthora* no solo, proposta por GRIMM & ALEXANDER (1973). A técnica consiste, resumidamente, na utilização de 100 ml de solo em recipiente com capacidade de 473 ml, sendo colocado água suficiente para inundar o solo com 1 - 2 cm. Em seguida, são colocados pedaços de 3 - 5 mm² de folhas de citros que flutuam na superfície da água. Este conjunto é deixado a temperatura ambiente (22 - 28°C) e após, aproximadamente, 36 horas, avalia-se a formação de esporângios do fungo nos bordos dos pedaços de folhas.

O isolamento foi feito com a transferência de pedaços de folhas infectadas com *Phytophthora* em ágar-água (conforme técnica descrita acima) e, logo em seguida, com auxílio de agulha histológica, esporângios do fungo foram transferidos para uma nova placa de ágar-água. Com o início do desenvolvimento do fungo, observado em microscópio estereoscópico, extremidades de hifa foram repicadas para meio BDA (batata-dextrose-agar), suplementado com estreptomicina e/ou benomyl. Os isolados purificados foram mantidos em tubo de ensaio com BDA na geladeira.

Além dos isolamentos provenientes de solos de pomares cítricos, foi feito isolamento de material vegetal infectado com *Phytophthora* proveniente de consultas da Clínica Fitopatológica da ESALQ/USP. Para o isolamento do patógeno adotou-se a mesma metodologia descrita para o solo, substituindo-o por pedaços de tecido infectados (raízes ou tronco).

Os isolados foram identificados através da curva de crescimento em diferentes temperaturas (RIBEIRO, 1978) e por características morfológicas do fungo, através da chave de classificação de Waterhouse (WATERHOUSE, 1963).

3.2. Obtenção de isolados de *Trichoderma* spp

A obtenção de isolados de *Trichoderma* foi feita pelo método de isca desenvolvido por GHINI & KIMATI (1989), sendo utilizado *Phytophthora parasitica* para colonização de iscas de semente de trigo. As sementes de trigo + 40 % de água (v/v) foram autoclavadas por 20 min a 1 atm. de pressão em dois dias consecutivos. Esse trigo tinalizado foi inoculado com *P. parasitica* e incubado por 30 dias a temperatura ambiente (22 - 28°C).

Amostras de 40 ml de solo, coletados de diferentes procedências, como mostra a Tabela 1 para obtenção dos isolados de *Trichoderma*, foram colocadas em placa de petri com 20 sementes de trigo colonizadas com o patógeno. As placas foram mantidas no laboratório a temperatura ambiente por uma semana e as sementes foram recuperadas, lavadas levemente em água corrente e em seguida plaqueadas em ágar-água. O micélio de *Trichoderma*, crescido sobre a isca, foi transferido para meio BDA e posteriormente armazenado em tubo de BDA invertido na geladeira. Além das placas com isca de

grão de trigo colonizado com *Phytophthora*, foram feitas placas testemunhas, onde era colocado apenas grão de trigo esterilizado.

Tabela 1 - Amostras de solos de diferentes procedências para obtenção de isolados de *Trichoderma* antagonicos à *Phytophthora parasitica*.

Número da Amostra	Local de Coleta
1	Campo do Feijão(Fitopatologia)*
2	Horta de Pimentão e Rúcula*
3	Mata*
4	Jardim com Hortênci*
5	Pomar de Citros com <i>Phytophthora</i>
6	Campo de Algodão (Agricultura)*
7	Campo de Café*
8	Pastagem 1*
9	Pastagem 2*
10	Área com sorgo*
11	Pomar de Maçã*
12	Pomar de citros sem <i>Phytophthora</i>
13	Seringueira*
14	Mata - Restaurante dos professores*

* Amostras coletadas dentro do Campus da ESALQ/USP

3.3. Produção de inóculo de *P. parasitica*

3.3.1. Esporulação

Conforme observado em literatura, a esporulação de fungos de gênero *Phytophthora* geralmente é obtida pela utilização do meio V8 CaCO₃ (MILLER, 1955), de fabricação americana e dificilmente encontrado no Brasil.

Na tentativa de substituição do meio V8, foram testados meios com cenoura (200g de cenoura, 20g de dextrose e 20g de ágar/l d' água), farinha de milho (200g fubá, 20g dextrose e 20g ágar/l d' água), tomate (200g de tomate, 20g de ágar, 3g de CaCO_3 /l d' água) e meio com folhas de citros (200g de folhas de citros fervidas, 20g de dextrose e 20g de ágar/l d' água). Os meios foram avaliados pelo crescimento, em centímetros, do diâmetro da colônia, medido em dois sentidos perpendiculares entre si quando a colônia atingia 2/3 da placa. Para o meio de cenoura, foi instalado um experimento inteiramente casualizado com 4 repetições e 6 tratamentos, os quais foram: 1) 200g de cenoura, 20g de dextrose e 20g de ágar; 2) 200g de cenoura, 10g de dextrose e 20g de ágar; 3) 100g de cenoura, 20g de dextrose e 20g de ágar; 4) 100g de cenoura, 10g de dextrose e 20g de ágar; 5) 50g de cenoura, 20g de dextrose e 20g de ágar; 6) 50g de cenoura, 10g de dextrose e 20g de ágar. Para avaliação, foram tomadas medidas de crescimento de colônia e esporulação, através da contagem do número de esporângios em quatro pontos dispostos, de maneira equidistante, numa das linhas que corta a placa pelo centro. A contagem foi feita com auxílio de microscópio ótico com aumento de 100x.

3.3.2 Infestação do solo e quantificação de inóculo

O solo foi infestado com pedaços de folhas de citros (aproximadamente 3 x 3 mm) colonizadas previamente com *P. parasitica*. Quarenta desses pedaços de folhas foram colocados em placa de Petri contendo 30 ml de água destilada e dois discos de micélio (4 mm de diâmetro) de *Phytophthora* retirados próximo ao centro da colônia do fungo com 7 dias de

idade, crescidas em meio de cenoura (50g de cenoura, 10g de dextrose e 20g de ágar/l d'água). As placas foram mantidas sob luz fluorescente branca contínua durante uma semana a 28°C de temperatura. Após esta semana de incubação os pedaços de folhas inteiramente rodeados por esporângios foram colocados a 4°C por 20 minutos na geladeira para liberação dos zoósporos. Em seguida, o conteúdo de cada placa (30 ml) foi misturado com 200 ml de plantmax esterilizado (substrato utilizado para produção de mudas de citros em tubetes).

Para quantificação do inóculo contou-se o número de esporângios ao redor dos pedaços de folhas de citros (foi considerada uma amostra dos discos infectados usados na mistura com o plantmax), adaptação da metodologia utilizada por MATHERON & MATEJKA (1991) que contaram o número de esporângios em volta de discos de ágar colonizados com *Phytophthora* para quantificação de inóculo.

Além da quantificação do patógeno pela contagem do número de esporângios, utilizou-se um método para estimar o potencial da doença através do ponto final de diluição, idealizado por TSAO (1960). O método consiste em uma diluição em série do solo infestado (uma parte desse solo em duas de solo esterilizado, 1:4, 1:8, 1:16 etc.) até o ponto máximo de diluição ou seja quando não se recuperava mais o patógeno. O autor utilizou frutos de limão como isca para recuperação da *Phytophthora* (25 ml do solo diluído, 150 ml de água e 2 frutos). Os frutos com lesões típicas (manchas marrom-parda de odor característico) após 6 dias de incubação a 25°C, eram considerados resposta positiva (+) quanto à presença do fungo, caso contrário, resposta negativa (-), estabelecia-se o ponto final da diluição.

Para o presente trabalho, os frutos utilizados por TSAO (1960) foram substituídos por pedaços de folhas de citros e o teste foi montado da

seguinte maneira: 20 pedaços de folha (3 mm), 30 ml de água e 5 g de solo para cada diluição. Quanto maior o ponto final de diluição ou melhor, uma pequena quantidade de solo contaminado era diluído em solo esterilizado e mesmo assim o patógeno era recuperado, maior o número de propágulos no solo. A presença de esporângios ao redor dos pedaços de folhas era considerada resposta positiva (+) e, ausência de esporângios ao redor das folhas, resposta negativa (-).

3.4. Controle de *Phytophthora parasitica* dos citros

3.4.1. Controle biológico "in vitro" para avaliação da atividade antagônica do *Trichoderma* spp

Foram feitos dois tipos de avaliação para verificar a atividade antagônica dos isolados de *Trichoderma* "in vitro". Uma das avaliações foi quanto ao hiperparasitismo ou seja, o potencial do *Trichoderma* em crescer sobre o patógeno impedindo seu desenvolvimento, e a outra avaliação foi para verificar a produção de substâncias antagônicas que inibam ou prejudiquem o desenvolvimento do patógeno.

Para o primeiro caso, hiperparasitismo, os isolados de *Trichoderma* foram confrontados, em cultura pareada, com isolados do patógeno. Um disco de micélio com 0,4 cm de diâmetro da colônia do patógeno (*P. parasitica*) de um lado da placa contra outro disco de micélio dos diferentes isolados de *Trichoderma* (4 placas por isolado) no lado oposto da mesma placa. A avaliação, para estabelecer os graus de antagonismo por hiperparasitismo, foi feita

utilizando-se uma escala de notas desenvolvida por BELL *et alii* (1982), porém com algumas modificações ficando como segue:

Nota 1 - *Trichoderma* completamente crescido sobre o patógeno.

Nota 2 - *Trichoderma* crescendo 2/3 sobre o patógeno.

Nota 3 - *Trichoderma* crescendo 1/2 sobre o patógeno

Nota 4 - *Trichoderma* crescendo 1/3 sobre o patógeno.

Nota 5 - *Trichoderma* sem crescimento sobre o patógeno.

No segundo caso, foram selecionados cinco isolados de *Trichoderma* quanto ao potencial de hiperparasitismo para verificar a produção de substâncias antagônicas à *Phytophthora* e então avaliados por duas metodologias. Em uma delas utilizou-se o método do celofane descrito por DENNIS & WEBSTER (1971) que consiste em crescer o isolado antagonista (*Trichoderma*) sobre um papel celofane autoclavado e depositado na superfície de um meio ágar (BDA). Após 48 horas de crescimento retirou-se cuidadosamente o celofane colonizado e para o meio de cultura transferiu-se discos (4 mm de diâmetro) de micélio do patógeno, retirados da borda da colônia com 72 horas de crescimento. Foi instalado um experimento inteiramente casualizado com 4 repetições e 6 tratamentos, os quais foram: 1) *Trichoderma* IS - 718; 2) *Trichoderma* IS - 716; 3) *Trichoderma* IS - 714; 4) *Trichoderma* IS - 7115; 5) *Trichoderma* IS - 7112 e 6) testemunha (apenas foi colocado o papel celofane sem *Trichoderma*). A outra metodologia foi baseada em um trabalho desenvolvido por LEDERER *et alii* (1992) utilizando incorporação de benomyl a 20 ppm em meio de cultura BDA para inibir crescimento micelial do *Trichoderma* sem, no entanto, interferir na produção das substâncias antagônicas. O patógeno foi confrontado com o antagonista colocando-se um disco de micélio de 4 mm de diâmetro do patógeno

e do *Trichoderma* em lados opostos de uma placa de Petri contendo meio de BDA com 20 ppm de benomyl. Os tratamentos foram os mesmos do experimento com papel celofane e a avaliação foi feita medindo-se o crescimento do patógeno em direção ao isolado de *Trichoderma*.

3.4.2. Uso de antagonistas em forma de pellets e em farinha de arroz

Foi desenvolvido um experimento, para testar a eficiência da mistura de 5 isolados de *Trichoderma* formulados em pellets de alginato (1 g de alginato de sódio para 37 g de micélio úmido do fungo/ 100 ml de água, esta solução gotejada em $\text{CaCl}_2(0,25\text{M})$ formavam os pellets)(KNUDSEN *et alii*, 1990) e em colonização de farinha de arroz. Para o primeiro caso, foram preparados frascos com 100 ml de BD + 2 discos de micélio de *Trichoderma* (4 mm) da borda da colônia para cada um dos 5 isolados e, após 20 dias esse BD com micélio do antagônico era coado, pesando-se 37 g da mistura de micélio dos isolados para confecção dos pellets. Para o segundo caso, foram retirados 5 discos de 4 mm da borda de colônias de *Trichoderma* e colocados em frascos contendo 100 ml da farinha de arroz previamente tinalizados para cada isolado.

O experimento foi em blocos ao acaso com 6 tratamentos e 4 repetições. Foram preenchidos tubetes com capacidade de 100 cm^3 (6 por parcela) com plantmax pré inoculado com *Phytophthora* (aproximadamente 27 propágulos/ml de solo). Os tratamentos foram: 1 - testemunha (plantmax esterelizado em autoclave), 2 - testemunha inoculada com *Phytophthora* (plantmax inoculado), 3 - plantmax inoculado + 2g/tubete de *Trichoderma* pelletizado, 4 - plantmax inoculado + 2 g/tubete da mistura de 5 isolados

crescidos no substrato de farinha de arroz, 5 - plantmax inoculado + 4 g/tubete da mistura de 5 isolados crescidos no substrato de farinha de arroz, 6 - plantmax inoculado + 6 g/tubete da mistura de 5 isolados crescidos no substrato de farinha de arroz. Logo após o preparo dos tubetes, foram transplantadas plântulas de limão cravo e, decorrido 3 meses, o experimento foi avaliado medindo-se alturas das plantas, comprimento da raiz, peso da parte aérea e peso de raiz. Além disso, precedeu-se a uma avaliação da infestação do solo através do teste de isca para recuperação do patógeno.

3.4.3. Controle físico por solarização em coletor solar e em sacos plásticos

O delineamento experimental para verificar a eficiência da solarização em coletor solar comparado com sacos plásticos, foi em blocos ao acaso com 8 tratamentos e 4 repetições sendo cada parcela constituída de 15 plantas. As plantas foram pré-germinadas em bandeja contendo solo estéril e após germinarem, foram transferidas para os tubetes. Cada tubete foi preenchido da seguinte forma: inicialmente, colocou-se o volume equivalente a um terço do total do tubete de plantmax esterilizado; em seqüência, na porção mediana do tubete, onde ficariam a maior concentração de radículas da plântula, colocou-se o inóculo, ou seja, mistura de plantmax e *P. parasitica* em seus diferentes tratamentos sendo 30 ml da mistura por tubete; e, por último o tubete foi preenchido, ao seu volume total, com plantmax esterilizado.

Além dos tratamentos com solarização, testou-se *Trichoderma* aplicado através da rega com 100 ml da suspensão/ 2 litros de solo contendo 10^7

conídios de *Trichoderma*/ml de água (utilizou-se a mistura dos cinco melhores isolados). Os tratamentos foram: (1) testemunha sem inóculo; (2) testemunha inoculada; (3) solarização em sacos plásticos por 24 horas; (4) solarização em sacos plásticos por 48 horas; (5) solarização em coletor solar por 24 horas; (6) solarização em coletor solar por 48 horas; (7) solarização em coletor solar por 48 horas + *Trichoderma*; (8) *Trichoderma*. O coletor utilizado foi o de tubos de 10 cm de diâmetro. Nestes tubos, preenchidos com solo, eram colocados 4 saquinhos de nylon contendo 500 ml de plantmax inoculado com *Phytophthora*, aleatoriamente dispostos dentro do tubo. Os sacos plásticos mediam 20 x 25 x 4 cm, onde foi colocado 2 litros de inóculo (plantmax esterilizado + *P. parasitica*).

O experimento recebeu rega diária e a avaliação foi feita primeiramente pela contagem do número de plantas sobreviventes ao final de três meses (% de sobrevivência), e após a retirada das plantas dos tubetes quantificou-se o comprimento de raiz, a altura de cada planta e o peso de parte aérea e das raízes, por parcela. Além disso, avaliou-se a infestação do solo pelo teste de isca com pedaços de folhas de citros para recuperação de *Phytophthora parasitica*.

O experimento de solarização descrito acima foi realizado durante o inverno, dias 25 e 26 de julho de 1993, tendo-se portanto temperaturas mais baixas comparativamente com os outros meses do ano. Outro experimento foi montado no verão onde solarizou-se o mesmo tipo de inóculo (plantmax + *Phytophthora*) no mesmo local porém apenas em sacos plásticos (idênticos aos do experimento realizado no inverno). O experimento contou com cinco tratamentos: 1) solo solarizado em sacos plásticos por 24 horas; 2) solos solarizados em sacos plásticos solarizados por 48 horas; 3) solos solarizados em sacos plásticos por uma semana; 4) solos solarizados em sacos plásticos por 2 semanas; 5) testemunha deixada à sombra. Os sacos plásticos foram preenchidos com plantmax esterilizado, sendo

distribuídos aleatoriamente em seu interior 6 saquinhos contendo 5 gramas de inóculo por tratamento. A avaliação foi feita pelo teste de isca, utilizando-se o conteúdo de cada saquinho de nylon para recuperação do patógeno ao final do experimento. A presença de esporângios ao redor dos pedacinhos de folhas, utilizados como isca, sobre o plantmax inoculado dos respectivos tratamentos, indicava resposta positiva (+) e a ausência era considerada resposta negativa (-).

3.4.4. Seleção de fungicidas "in vitro" para o controle químico de *P. parasitica*

Foram testados diversos fungicidas, de diferentes ingredientes ativos e preferencialmente aqueles recomendados para Oomycetes, como por exemplo os produtos sistêmicos fosetyl-Al e metalaxyl e também alguns fungicidas protetores.

Inicialmente, os produtos foram testados na concentração de 100 ppm e os melhores fungicidas selecionados nesta primeira etapa foram novamente testados em outras concentrações menores (1 e 10 ppm). Concomitante a esses ensaios, avaliou-se a interferência dos produtos químicos para controle de *Phytophthora*, com isolados previamente selecionados de *Trichoderma*. Os cinco isolados de *Trichoderma* selecionados por teste de hiperparasitismo (Is-71/8, Is-71/4, Is-71/6, Is-71/12 e Is 71/15) foram plaqueados em meio contendo fungicidas na concentração de 100 ppm para verificar a interferência no crescimento da colônia do antagonico. Na avaliação considerou-se resposta positiva (+) quando havia redução acentuada ou inibição de crescimento de colônia e resposta negativa (-) quando o produto químico não interferia no crescimento. Esta etapa

teve o intuito de verificar a possibilidade do uso simultâneo de produtos químicos e controladores biológicos.

Primeiramente, testou-se metalaxyl, chlorothalonil, propamocarb, vinclozolin, fluazinan, tebuconazole, prochloraz, diniconazole, difenoconazole, tachigaren, captan, mancozeb, dodine, carboxin + thiram e oxadixyl a 100 ppm sendo utilizados dois isolados de *P. parasitica* (Isolado 164 e Isolado 1). Em seguida avaliou-se a potencialidade dos melhores produtos para inibição de *Phytophthora* a 1 e 10 ppm onde foram utilizados metalaxyl, chlorothalonil, mancozeb, fluazinan, oxadixyl, dodine, tebuconazole, captan e prochloraz. Posteriormente, analisou-se também diferentes formulações do metalaxyl (Ridomil 25%, Ridomil Mancozeb, Ridomil Chlorothalonil, Ridomil 50 GR e Apron) nas concentrações de 1, 10 e 100 ppm. A testemunha constou de meio BDA sem fungicida. A instalação dos ensaios seguiu metodologia de avaliação de eficiência de produtos químicos "in vitro" relatada por diversos autores (TORGESON, 1967; MARINGONI *et alii*, 1992). Sucintamente, o método consiste em misturar fungicidas em meio ágar fundente (BDA) a 45 - 55°C e verter numa placa de Petri previamente esterilizada. A concentração final do produto deve levar em consideração o volume do meio a ser utilizado. A avaliação é feita tomando-se medidas perpendiculares no diâmetro da colônia, quando a colônia da testemunha atingia 2/3 da placa.

O primeiro ensaio com dois isolados e uma concentração (100 ppm comisolados 7 e 164) foi analisado como parcela subdividida, o segundo (concentração 1 e 10 ppm, com isolado 164) delineado inteiramente ao acaso e, o terceiro (com diferentes formulações de metalaxyl) a 1, 10 e 100 ppm, também com isolado 164 foi um experimento fatorial. Em todos os ensaios considerou-se a testemunha sem fungicida e 4 repetições por tratamento. Na Tabela 2, segue

relação dos produtos utilizados para a primeira seleção e suas principais características.

Tabela 2 - Produtos químicos testados quanto à eficiência "in vitro" no controle de *P. parasitica* dos citros.

Nome Comercial	Nome Técnico	Porcentagem de ingrediente ativo
APRON	Metalaxyl	350 g/kg
CAPTAN 750 TS	Captan	709 g/kg
DACONIL BR	Chlorothalonil	750 g/kg
DITHANE PM	Mancozeb	800 g/kg
FOLICUR CE	Tebuconazole	250 g/l
FROWCIDE	Fluazinan	500 g/kg
PREVICUR N	Propamocarb	722 g/l
RONILAN 500	Vinclozolin	500 g/l
SCORE	Difenoconazole	----
SPORTAK 45 CE	Prochloraz	450 g/kg
SPOTLESS	Diniconazole	125 g/kg
VENTUROL	Dodine	650 g/kg
TACHIGAREN	Hymexazol	700 g/kg
----	Oxadixyl	---
VITAVAX/THIRAM 200 SC	Carboxin/Thiram	200 g/l (cada)

3.4.5. Controle químico de *P.parasitica* em mudas de citros sob condições de casa de vegetação

Para esta etapa foram instalados 2 experimentos em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP. Um deles foi delineado em parcelas subdivididas com 9 tratamentos, 4 repetições e 2 variedades de porta-enxerto (laranja caipira e limão cravo). As sementes dos

porta-enxertos foram obtidas dos frutos provenientes da Estação Experimental de Cordeirópolis. O experimento foi montado em caixas com 27 x 39 cm de dimensão e preenchidas com solo esterilizado. A inoculação foi feita com solo infestado como previamente descrito (com pedaços de folhas rodeados com esporângios). Em cada bandeja foram plantadas as duas variedades de citros (subparcela). Na ocasião do plantio foi feita a inoculação (500ml de Plantmax infestado/bandeja). As sementes foram dispostas em quatro linhas, 2 de laranja caipira (15 sem./linha) e 2 de limão cravo (20 sem./linha). Os tratamentos com os fungicidas foram feitos junto com a inoculação e repetidos a cada 30 dias após a semeadura, durante 3 meses. Os tratamentos foram : 1) testemunha; 2) testemunha inoculada; 3) Fosetyl-Al (rega no plantio e pulverização após 30 dias); 4) Metalaxyl granulado 2,5 gpc/m²; 5) Metalaxyl granulado 5,0 gpc/m²; 6) Metalaxyl granulado 10,0 gpc/m²; 7) Metalaxyl granulado 20 gpc/m²; 8) Metalaxyl granulado 2,5 gpc/m² + Fosetyl-Al (pulverização.); 9) Propamocarb. A descrição dos produtos e a dosagem aplicada estão sumariados na Tabela 3.

Tabela 3 - Produtos e dosagens utilizados no experimento de controle químico em sementeiras.

Nome Comercial	Nome técnico	Dosagem (produto comercial)
ALIETTE 80 PMb	Fosetyl-Al	2,5 g/l
RIDOMIL 50 GR	Metalaxyl	2,5 g/m ²
		5,0 g/m ²
		10,0 g/m ²
		20,0 g/m ²
PREVICUR N	Propamocarb	3,0 ml/l

O segundo experimento em casa de vegetação foi delineado em blocos ao acaso com 9 tratamentos e 4 repetições. Cada parcela sendo composta de 10 tubetes com uma planta/tubete. Sementes de limão cravo foram pré-germinadas, em bandejas com solo esterilizado, e transplantadas para os tubetes. Os tubetes foram preenchidos, com o inóculo no meio, da mesma forma que no experimento com solarização. Os tratamentos com propamocarb, metalaxyl-chlorothalonil e metalaxyl-mancozeb foram feitos em regas de 30 em 30 dias, iniciando no plantio. A aplicação de fosetyl-AI foi efetuada com pulverização foliar e também reaplicada a cada 30 dias. Nos tratamentos com metalaxyl granulado, o produto foi incorporado ao solo na ocasião do preenchimento dos tubetes antes do plantio. Os tratamentos foram: 1) testemunha sem inóculo; 2) testemunha inoculada; 3) Propamocarb; 4) Metalaxyl + Chlorothalonil; 5) Metalaxyl + Mancozeb; 6) Metalaxyl granulado (5,0 gpc/m²); 7) Metalaxyl granulado (10,0 gpc/m²); 8) Metalaxyl granulado (20,0 gpc/m²); 9) Fosetyl-AI. A avaliação dos experimentos foi feita da mesma forma descrita para experimento com solarização. A descrição dos produtos e as respectivas dosagens utilizadas estão na Tabela 4.

Tabela 4 - Produtos e dosagens utilizados no experimento químico em tubetes.

Nome Comercial	Nome técnico	Dosagem (produto comercial)
ALIETTE 80 PM	Fosetyl-AI	2,5 g/l
RIDOMIL 50 GR	Metalaxyl	5,0 g/m ²
		10,0 g/m ²
		20,0 g/m ²
RIDOMIL CT	Metalaxyl + Chlorothalonil	3,0 g/l
RIDOMIL MANCOZEB	Metalaxyl + Mancozeb	3,0 g/l
PREVICUR N	Propamocarb	3,0 ml/l

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção de isolados de *Phytophthora parasitica*

Os isolados obtidos de solos ou material vegetal contaminados foram identificados como Isolado - 164 (Is-164), Isolado - 7 (Is-7) e Isolado - 1 (Is-1) enquadrando-se na descrição de *P. parasitica* através de observações morfológicas, características da cultura e por apresentarem curva de crescimento nas temperaturas cardinais semelhantes às descritas para a espécie. Abaixo segue a curva de temperatura dos isolados (Figura 1).

Figura 1 - Crescimento de *Phytophthora parasitica* (isolado 1, isolado 7 e isolado 164) comparado a *P. capsici*, após 96 horas, em diferentes temperaturas.

4.2. Obtenção dos isolados de *Trichoderma* spp

O antagonista *Trichoderma* foi isolado de dois dos 14 solos amostrados: solo de mata e solo do café, sendo deste último o maior número de isolados (Tabela 5). Nas placas onde o grão de trigo não tinha sido previamente inoculado com *Phytophthora* (segundo a técnica de recuperação de antagonistas com iscas de trigo colonizadas com o patógeno descrita por GHINI & KIMATI, 1989), a recuperação do antagonista foi significativamente menor.

Tabela 5 - Número de isolados de *Trichoderma* spp obtidos dos solos do campo de café e da mata com ou sem isca de *P. parasitica*.

Local de Coleta	Isolados Obtidos	
	com isca	sem isca
Mata*	2	-
Campo de Café*	31	13

* Amostras coletadas dentro do Campus da ESALQ/USP

4.3. Produção de inóculo de *P. parasitica*

O crescimento de colônia de *P. parasitica* nos meios de cenoura, tomate, BDA, farinha de milho e folhas de citros estão sumarizados na Tabela 6.

Tabela 6 - Crescimento de colônia de *P. parasitica* a 28 °C e luz contínua em 5 meios de culturas avaliados em dois ensaios.

Meios de Cultura	Diâmetro médio (cm) da colônia	
	1º Ensaio ¹	2º Ensaio ²
Cenoura	5,43 a	6,30 a
Tomate	5,40 a	---
BDA	4,10 b	---
Farinha de Milho	----	5,70 b
Folhas de Citros	----	3,00 c
Parâmetros Estatísticos		
CV=	8.944 %	5.762 %
DMS (5%)=	0.6670	0.3946

* Diâmetro medido após 72 horas de crescimento.

** Diâmetro medido após 96 horas de crescimento.

Diante da análise da tabela acima nota-se que o meio de Cenoura e o de Tomate mostraram-se superiores em relação aos demais, no entanto, foi observada uma maior esporulação no meio de cenoura.

Testou-se novas concentrações de cenoura (100, 50 e 25 g/l) e de dextrose (20 e 10 g/l), sendo os resultados, de crescimento de colônia e de esporulação, apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Crescimento e esporulação de *P. parasitica* em diferentes concentrações do meio de cenoura, a 28°C e luz contínua.

Conc. do meio de Cenoura	Diâmetro médio da colônia *	Nº de esporângios ** da borda da colônia ¹	Nº de esporângios** do centro da colônia ¹
50 /10	7.28 a ²	0.70 b	58.6 a
100/10	6.20 b	0.30 b	25.4 ab
200/10	5.70 c	0.30 b	17.9 b
50 /20	5.60 c	2.00 a	66.1 a
100/20	5.50 c	0.50 b	17.6 bc
200/20	6.10 b	0.50 b	0.7 c
Parâmetros estatísticos			
CV:=	3.222 %	107.66 %	41.267 %
DMS (5%)=	0.3486	1.2084	3.1094

* Média de dois diâmetros perpendiculares entre si após 72 horas de incubação.

** Número médio de esporângios médios de dois campos (aumento de 100 vezes do microscópio ótico), distantes 3 cm do centro da placa em sentidos opostos.

⁽¹⁾ A contagem do número de esporângios ocorreu após 10 dias de incubação.

⁽²⁾ Médias com letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste Tukey.

4.4. Controle de *P. parasitica* em citros

4.4.1. Controle biológico "in vitro" para avaliação da atividade antagônica do *Trichoderma*.

Os isolados de *Trichoderma* foram selecionados pelo teste de pareamento de colônias (*Trichoderma* X *Phytophthora*) e avaliados por notas, variando de 1 a 5, de hiperparasitismo como mostra a Tabela 8.

Tabela 8 - Eficiência do antagonismo de isolados de *Trichoderma* pareados contra *P. parasitica* em meio BDA, incubados a 28°C e luz contínua por 72 horas. Avaliação segundo escala de BELL *et alii* (1982).

Isolado de <i>Trichoderma</i> ⁽¹⁾	Nota Média de 4 Repetições	Isolado de <i>Trichoderma</i> ⁽¹⁾	Nota Média de 4 Repetições
71/1	3.0	72/8	3.3
71/2	2.0	72/9	5.0
71/3	2.3	72/10	3.0
71/4	1.0*	72/11	5.0
71/5	3.0	72/12	5.0
71/6	1.0*	72/13	4.0
71/7	2.3	72/14	2.6
71/8	1.3*	72/15	3.6
71/9	2.3	7T1	4.6
71/10	2.0	7T2	4.0
71/11	4.0	7T3	4.0
71/12	1.3*	7T4	4.0
71/13	1.8	7T5	4.0
71/14	3.0	7T6	5.0
71/15	1.3*	7T7	3.0
71/16	2.0	7T8	5.0
72/1	2.3	7T9	5.0
72/2	4.0	7T10	5.0
72/3	4.6	7T11	5.0
72/4	4.6	7T12	3.0
72/5	3.6	7T13	4.0
72/6	2.0	311	5.0
72/7	3.0	312	5.0

* Isolados selecionados quanto a agressividade sobre o patógeno.

⁽¹⁾ Os isolados numerados com o início "71" e "72" foram provenientes da amostra de solo do café obtidos com iscas de *Phytophthora*, os "7T" obtidos do mesmo solo porém sem a isca e os 311 e 312 foram obtidos da amostra do solo da mata.

Os cinco isolados selecionados quanto ao melhor desempenho no controle de *Phytophthora* por hiperparasitismo foram submetidos a novos testes com intuito de verificar o potencial de produção, por esses isolados, de

metabólitos ou substâncias antagônicas ao patógeno. Os resultados dos testes do papel de celofane e do meio BDA contendo benomyl, estão sumarizados nas tabelas 9 e 10, respectivamente.

Tabela 9 - Inibição “in vitro” de *P. parasitica* por substâncias antagônicas, através do teste do papel celofane, com cinco isolados de *Trichoderma* previamente selecionados por hiperparasitismo, a 28°C e luz contínua por 72 horas.

Tratamento	Diâmetro	da colônia	(cm) nas	repetições*	Média	% de Inibição
	1	2	3	4		
Testemunha	3.2	3.6	3.5	3.4	3.42 a	--
Is - 71\4	-	0.4	-	-	0.10 b	96.8
Is - 71\6	-	0.3	-	-	0.07 b	97.4
Is - 71\12	-	0.8	-	-	0.20 b	97.6
Is - 71\15	0.2	-	-	-	0.05 b	99.4
Is - 71\8	-	-	-	-	0.00 b	100

* Dados originais. Para efeito de análise esses dados foram transformados em raiz quadrada de $x + 0,01$, médias seguidas com a mesma letra não diferem entre si ao nível de 5 % de significância pelo teste de Tukey.

A tabela acima comprova a eficiência de isolados selecionados por hiperparasitismo como bons produtores de substâncias ou metabólitos antagônicos. A Figura 2 ilustra o crescimento da *P. parasitica* em uma placa onde havia crescido anteriormente um isolado de *Trichoderma* sobre papel celofane, comparado a um crescimento em BDA normal.

Figura 2 - *P. parasitica* crescendo em placa com meio BDA onde havia sido colocado papel celofane com ou sem *Trichoderma*. (T= testemunha sem *Trichoderma*; Is-71/6 e Is- 71/8= isolados de *Trichoderma* sobre o celofane por 48 horas).

Tabela 10 - Potencial antagonístico de cinco isolados de *Trichoderma* em teste de pareamento de colônias em meio BDA com 20 ppm de Benomyl, a 28 °C e luz contínua por 72 horas.

Tratamentos	Crescimento Médio da Colônia (cm)*	% de Inibição
Testemunha	3.4 a**	--
Is - 71\12	2.7 b	20.6
Is - 71\8	2.6 bc	23.5
Is - 71\15	2.6 bc	23.5
Is - 71\6	2.5 bc	26.5
Is - 71\4	2.3 c	29.4
Parâmetros Estatísticos		
CV=	5.84 %	
DMS (5%)=	0.36041	

* Crescimento medido do centro da colônia de *P. parasitica* para o lado oposto da placa em direção ao antagonista.

** Médias com as mesmas letras não diferem entre si ao nível de 5 % de significância pelo teste Tukey.

4.4.2. Uso de antagonistas em forma de pellets e em farinha de arroz

No experimento de controle biológico em casa de vegetação estudou-se a eficiência de *Trichoderma* em pellets e em farinha de arroz com duas avaliações: Recuperação do patógeno do solo ao final do experimento (Tabela 11) e medição de comprimento de raiz, altura de cada planta, peso de parte aérea e de raiz/parcela (Tabela 12).

Os resultados de recuperação pelo teste de isca, da Tabela 11, nos confirma a presença do patógeno na testemunha inoculada e no tratamento com *Trichoderma* pelletizado, nos tratamentos com farinha de arroz não foi recuperado patógeno.

Tabela 11 - Recuperação de *P. parasitica* do solo do experimento de controle biológico em casa de vegetação, com mudas de limão cravo, após 3 meses do transplante, pelo teste de isca.

Tratamentos	Discos com esporângios nas repetições			
	1	2	3	4
Testemunha	-*	-	-	-
T. Inoculada	10	10	6	8
Pellets	7	2	6	5
FA - 1	-	-	-	-
FA - 2	-	-	-	-
FA - 3	-	-	-	-

* Número de discos de folhas de citros com *P. parasitica* num total de 10 avaliados.

** (-) ausência e (+) presença do patógeno. A avaliação foi feita após 3 meses do transplante.

Tabela 12 - Efeito de formulação e concentração de inóculo de *Trichoderma* sobre o desenvolvimento de mudas do porta-enxerto limão cravo transplantados para substratos de tubetes infestados com *P. parasitica*, avaliadas após 3 meses.

Tratamento	Peso Raiz (g)	Peso Parte Aérea (g)	Altura de plantas (cm)	Comprimento Raiz (cm)	Nº Plantas** sobreviventes
Testemunha	4.75 a*	4.50 ab	11.75 ab	13.75 a	16
T. Inoculada	2.25 b	2.00 c	9.25 b	12.5 a	14
Pellets	3.75 ab	4.50 ab	11.50 ab	14.25 a	15
FA - 1	5.00 a	5.75 a	13.25 a	14.00 a	16
FA - 2	2.00 b	2.50 bc	10.25 ab	12.5 a	12
FA - 3	2.25 b	2.50 bc	10.25 ab	12.5 a	10
Parâmetros	Estatísticos				
CV=	28.636	25.308	12.983	18.315	
DMS (5%)=	2.1854	2.1100	3.3219	5.5814	

* Médias seguidas com a mesma letra não diferem entre si ao nível da 5% de significância.

** Número de plantas sobreviventes num total de 16 plantas/tratamento.

Observa-se na tabela acima, que o tratamento com FA - 1 (2 g/tubete da mistura farinha de arroz + *Trichoderma*) mostrou-se superior aos demais em peso de raiz, peso de parte aérea e altura de planta, não havendo, no entanto, diferenças entre os tratamentos quanto ao comprimento de raiz. O número de plantas sobreviventes foi reduzido nos tratamentos FA -2 e FA - 3 (4 e 6 g/tubete da mistura farinha de arroz + *Trichoderma* respectivamente).

4.4.3. Controle físico por solarização em coletor solar e em sacos plásticos

No experimento de solarização no inverno, comparou-se a eficiência do coletor solar e do saco plástico em 24 e 48 horas de exposição ao sol. As temperaturas atingidas em cada tratamento estão representadas na Figura 3. A solarização nos meses de verão teve finalidade de conhecer o tempo (duração da solarização) mais adequado de exposição dos sacos plásticos ao sol. A Figura 4 ilustra as variações de temperatura nos tratamentos em sacos plásticos e em coletor solar, no inverno e no verão, comparadas às do meio ambiente.

Na Tabela 13 estão os resultados do teste de isca para recuperação de *P. parasitica* do solo dos diferentes tratamentos do experimento de controle físico do solo de tubetes na produção de mudas de porta-enxerto (limão cravo) em condições de casa de vegetação. Na Tabela 14 estão os resultados da avaliação das mudas retiradas dos tubetes após 3 meses do transplante, medindo-se: altura e comprimento de raiz de cada planta, peso de parte aérea e de raiz por parcela. Observou-se também a porcentagem de sobrevivência ao final do experimento. A Figura 5 ilustra o desenvolvimento das mudas de limão cravo, nos diversos tratamentos de solarização, com meses de idade nos tubetes em casa de vegetação.

Figura 3 - Variação de temperatura no experimento de inverno nos tratamentos em saco plástico e em coletor solar por 24 e 48 horas.

Figura 4 - Variação de temperatura no inverno e no verão em saco plástico e em coletor solar comparado com a temperatura ambiente.

Tabela 13 - Recuperação de *P. parasitica* pelo teste de isca em solos solarizados em coletor solar (CS) e em sacos plásticos (SP) por 24 e 48 horas. Jaguariuna, junho/93.

Tratamentos	Avaliação Quantitativa	
	Após a Solarização	Final do Experimento
Testemunha	-	-
Testemunha Inoculada	10.0*	8.75
S.P. - 24 horas	10.0	9.5
S.P. - 48 horas	9.2	7.2
C.S. - 24 horas	-	-
C.S. - 48 horas	-	-
C.S/48 + <i>Trichoderma</i>	-	-
<i>Trichoderma</i>	10.0	8.75

* Número de pedaços de folhas contaminados com *P. parasitica*, resultado da média de 4 repetições (10 pedaços de folhas avaliados para cada repetição)

Tabela 14 - Eficiência dos tratamentos de solarização em sacos plásticos e coletor solar por 24 e 48 horas, do tratamento com rega de *Trichoderma* em suspensão de conídios e da associação coletor/*Trichoderma*, no controle de podridão de radículas provocada por *P. parasitica*.

Tratamentos	Porcentagem * Sobrevivência	Comp. ⁽¹⁾ Raiz(cm)	Peso Parte Aérea(g) ⁽²⁾	Peso de Raiz (g) ⁽²⁾	Altura Parte Aérea (cm) ⁽¹⁾
Testemunha	100 a	15.75 a	14.25 a	11.00 a	10.90 ab
T. Inoculada	73.5 c	13.00 b	7.50 b	6.75 c	8.25 c
S.P. 24 horas	82.1 bc	13.25 b	9.00 b	6.75 c	8.75 bc
S.P 48 horas	94.3 abc	13.25 b	10.25 ab	7.75 bc	9.25 abc
C.S 24 horas	100 a	13.00 b	14.00 a	10.25 ab	10.75 ab
C.S 48 horas	99.5 ab	12.75 b	14.5 a	10.50 ab	10.75 ab
CS.48/ <i>Tricho</i>	99.5 ab	13.50 b	14.25 a	10.50 ab	11.00 a
<i>Trichoderma</i> **	83.0 bc	12.75 b	10.50 ab	7.75 bc	9.25 abc
Parâmetros Estatísticos					
CV=	11.979 %	5.437 %	15.292%	15.292%	9.595 %
DMS (5%)=	21.977	1.7301	1.7301	4.2764	2.246

* Para comparação de médias os dados originais foram transformados em arco seno da raiz de x/100.

** Foi aplicado 100 ml da suspensão de 10^7 conídios/ml para cada 2 litros de solo. Utilizou-se a mistura de 5 isolados.

⁽¹⁾ Foi medido altura e comprimento de cada planta sendo o valor apresentado a média das 4 repetições por tratamento. ⁽²⁾ Na avaliação do peso de parte aérea e de raiz considerou-se o peso por parcela e então a média das 4 repetições.

A Tabela 15 retrata os dados de recuperação de *P. parasitica* pelo teste de isca na solarização de verão.

Tabela 15 - Efeito da duração da solarização em sacos plásticos transparentes sobre a sobrevivência de *P. parasitica* - Jaguariuna, janeiro/94.

Solarização em dias	Recuperação na				Avaliação			
	1 ^{a**}				2 ^{a***}			
0	+	+	+	+	+	+	+	+
1	-	-	-	-	-	-	+	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-

* Cada sinal representa uma repetição, ou seja uma placa de petri contendo solo e pedaços de folhas de citros (foram avaliados 20 discos de folha por placa)

** O teste foi feito logo após a retirada do último saco plástico do sol e a leitura feita após 48 horas.

*** O teste foi realizado 25 dias após a retirada de todos os tratamentos da exposição ao sol.

Os tratamentos de solarização em sacos plásticos transparentes (20 x 25 x 4 cm) contendo 2 litros de solo, durante o verão, foram eficientes para a erradicação do patógeno do solo. A avaliação após 25 dias comprovou a eficiência dos tratamentos solarizados por 48 horas, uma e duas semanas, no solo exposto por apenas 24 horas houve recuperação do patógeno em uma das repetições.

Figura 5 - Desenvolvimento de mudas produzidas em tubetes do porta-enxerto limão cravo com 2 meses de idade no experimento de controle físico através de solarização.(T.INOC = testemunha inoculada, TRICHO = Trichoderma, CS-48/TR = coletor solar + Trichoderma, SP-24 = solarização em saco plástico por 24 horas, CS-24 = coletor solar por 24 horas, TEST= testemunha, SP-48 = solarização em saco plástico por 48 horas, CS-48= coletor solar por 48 horas).

4.4.4. Controle químico através da seleção de fungicidas "in vitro" para o controle de *P. parasitica*

Inicialmente avaliou-se a eficiência de 15 ingredientes ativos para o controle *in vitro* de *P. parasitica* na concentração de 100 ppm, sendo também observado a interferência desses produtos nos cinco isolados de *Trichoderma* selecionados para controle biológico. Os resultados estão sumarizados na Tabela 16.

Tabela 16 - Sensibilidade de *P. parasitica* e de *Trichoderma* spp a 15 produtos químicos na concentração de 100 ppm, a 25°C.

Produtos	% de Inibição de <i>P. parasitica</i> a 100 ppm		Média*	Interferência no Crescimento de <i>Trichoderma</i> ⁽¹⁾
	Isolado 164	Isolado 1		
Mancozeb	100 a	100.0 a	100 a	+
Metalaxyl	98.0 ab	100.0 a	99.5 ab	-
Oxadixyl	93.7 bc	93.9 b	93.8 bc	+
Dodine	89.8 bc	88.7 b	89.3 cd	+
Fluazinan	85.8 bcd	90.9 b	88.5 cd	+
Tebuconazole	84.6 cd	91.7 b	88.4 cd	+
Carboxin/Thiram	87.7 bc	82.0 bc	84.9 cd	-
Prochoraz	80.5 cd	87.8 b	84.4 cd	+
Chlorothalonil	66.4 d	87.4 b	77.8 d	-
Captan	85.6 cd	66.9 c	76.9 d	-
Difenoconazole	31.2 e	39.4 d	35.2 e	+
Diniconazole	14.3 e	40.1 d	26.1 e	+
Propamocarb	0.2 f	1.8 e	0.8 f	-
Hymexazol	0.0 f	0.9 e	0.2 f	-
Vinclozolin	0.0 f	0.0 e	0.0 f	+

*Dados originais. Para efeito de análise estatística os dados foram transformados em arco seno da raiz x/100.

⁽¹⁾ (+) com grande inibição, (-) crescimento normal.

Observando a Tabela 16 podemos verificar a eficiência dos produtos mancozeb e metalaxyl seguidos de oxadixyl, dodine, fluazinan,

tebuconazole, hymexazol, prochloraz e chlorothalonil. Verifica-se os isolados 164 e 1 têm a mesma tendência quanto a sensibilidade aos fungicidas. Em relação ao *Trichoderma* lista-se o metalaxyl, carboxin/thiram, chlorothalonil, captan, propamocarb e himexazol como produtos que não interferem no desenvolvimento do antagonista sendo assim produtos com potencial para serem recomendados em manejo integrado. A Figura 6 ilustra a sensibilidade de *P. parasitica* e de *Trichoderma* spp a produtos químicos.

Figura 6 - Sensibilidade *in vitro* de 2 isolados de *P. parasitica* e 5 isolados de *Trichoderma* aos produtos químicos metalaxyl e chlorothalonil, na concentração de 100 ppm comparados com a testemunha (apenas BDA). (Pp= Testemunha de *P. parasitica*; Pp/M= *P. parasitica* em meio contendo metalaxyl; Pp/C= contendo chlorothalonil; TR/M= cinco isolados de *Trichoderma* em meio com metalaxyl; TR/C= com Chlorothalonil).

Em outro experimento *in vitro*, com os fungicidas selecionados a 100 ppm, foram testadas as concentrações 1 e 10 ppm, cujos resultados estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 - Inibição de *P. parasitica in vitro* por diversos fungicidas nas concentrações de 1 e 10 ppm.

Produtos	% de inibição de <i>P. parasitica</i> ⁽¹⁾	
	a 1 ppm	a 10 ppm
Metalaxyl	82.4 a	100 a*
Chlorothalonil	47.1 b	73.8 b
Mancozeb	26.9 c	57.5 c
Fluazinan	-----	53.3 c
Oxadixyl	16.3 d	48.4 cd
Dodine	12.6 de	40.2 d
Tebuconazole	7.4 ef	26.4 e
Captan	4.6 f	21.6 e
Prochloraz	0.0 gh	0.4 f
Parâmetros Estatísticos		
CV=	7.556	10.24
DMS (5%)=	7.8986	6.4580

*Dados originais. Para efeito de análise estatística os dados foram transformados em arco seno da raiz x/100.

⁽¹⁾ Porcentagem obtida em relação à testemunha quando esta atingia 2/3 da placa de petri.

Diante da análise das Tabelas 16 e 17 pudemos observar que o metalaxyl tem melhor controle sobre o patógeno em relação os demais e, em

virtude deste fato, foi realizado um experimento *in vitro* para testar diferentes formulações do produto. Os resultados obtidos estão na Tabela 18.

Tabela 18 - Inibição de *P. parasitica in vitro* por diferentes formulações de metalaxyl nas concentrações de 1, 10 e 100 ppm.

Produtos	% de inibição de <i>P. parasitica</i> ⁽¹⁾		
	1 ppm	10 ppm	100 ppm
Metalaxyl (trat.sem.)	88.7 a	91.3 c	100 a*
Metalaxyl/ Mancozeb	33.7 d	94.4 ab	100 a
Metalaxyl/ Chlorothalonil	83.1 c	96.4 a	98.0 b
Metalaxyl granulado	87.6 ab	92.4 bc	96.4 bc
Metalaxyl 25 %	83.9 bc	92.3 bc	96.0 c
Parâmetros Estatísticos			
CV=	2,217 %		
DMS (5%) =	1.8984		

*Dados originais. Para efeito de análise estatística os dados foram transformados em arco seno da raiz x/100.

⁽¹⁾ Porcentagem obtida em relação à testemunha quando esta atingia 2/3 da placa de petri.

Observando as formulações testadas notamos alto potencial de inibição (acima de 90%) nas concentrações de 10 e 100 ppm. Na concentração de 1 ppm todos os produtos com exceção do metalaxyl/ mancozeb foram capazes de inibir mais que 80% do crescimento fúngico em relação à testemunha.

4.4.5. Controle químico de *P. parasitica* em mudas de citros sob condições de casa de vegetação

O experimento em sementeiras foi avaliado tomando-se o peso de raiz e de parte aérea por parcela, a altura das plantas e o número de plantas sobreviventes em cada tratamento para as duas variedades testadas: limão cravo e laranja caipira. Além disso procedeu-se o teste de isca para recuperação de *Phytophthora* das raízes das mudas. Os dados mencionados constam na Tabela 19 e estão ilustrados nas Figuras 7, 8, 9 e 10. Não houve diferenças significativas entre as médias dos tratamentos para peso de raiz, peso da parte aérea e para altura das plantas. O número de plantas sobreviventes por tratamento diferiu estatisticamente entre as duas testemunhas (inoculada e não inoculada) porém, não diferiu entre os demais tratamentos. Os dados de recuperação do patógeno pelo teste de isca foi positivo ou seja, recuperou o fungo, nos tratamentos com fosetyl-Al, propamocarb e testemunha inoculada. Nos tratamentos com metalaxyl não foi possível recuperar *P. parasitica*.

No experimento em tubetes foi utilizado o porta-enxerto limão cravo e para a avaliação das mudas, após 3 meses do transplante para o tubete, mediu-se a altura das plantas, o peso das raízes e o peso da parte aérea em cada tratamento (Tabela 20). Além disso foi analisada a infestação do solo e das raízes em duas épocas: (1) Recuperação de *Phytophthora* do solo e das raízes logo após a retirada das mudas dos tubetes; (2) Recuperação de *Phytophthora* do solo após 3 meses da retirada das mudas (Tabelas 21 e 22). A tabela 22 mostra os dados quantitativos da recuperação pelo teste de isca de *Phytophthora* do solo logo após a retirada das mudas dos tubetes.

Tabela 19 - Controle químico de *P. parasitica* em mudas de Limão Cravo (LCr) e de Laranja Caipira (LCa) em sementeiras sob condições de casa de vegetação.

Tratamentos	Peso de Raiz		Peso de P. Aérea		Altura		Plantas		Número		Teste de isca	
	LCr	LCa	LCr	LCa	LCr	LCa	LCr	LCa	LCr	LCa	LCr	LCa
Testemunha	13.65	17.07	22.39	24.44	6.82	5.96	31.5 ab	33.2 a	-	-	-	-
T. inoculada	10.85	9.35	18.34	16.73	6.77	5.27	26.5 ab	27.0 ab	+	+	+	+
Fosetyl-AI**	13.83	8.52	23.73	13.53	8.91	5.31	26.0 ab	21.5 ab	+	+	+	+
Propanocarb***	12.95	9.77	22.30	15.62	7.19	5.75	26.0 ab	21.2 ab	+	+	+	+
Metalaxyl 2,5 gpc/m ² *	12.48	12.89	20.26	22.30	7.63	6.24	26.7 ab	28.5 ab	-	-	-	-
Metalaxyl 2,5gpc/m ² + Fosetyl	9.85	8.86	18.08	16.44	7.86	6.09	18.7 b	19.5 b	-	-	-	-
Metalaxyl 5,0 gpc/m ² *	15.13	13.89	24.06	19.46	8.55	6.05	24.5 ab	22.7 ab	-	-	-	-
Metalaxyl 10,0 gpc/m ² *	14.48	12.22	20.73	19.57	7.26	5.88	27.0 ab	25.0 ab	-	-	-	-
Metalaxyl 20,0 gpc/m ² *	11.52	13.71	19.42	20.36	8.17	6.81	21.2 ab	28.0 ab	-	-	-	-
Parâmetros estatísticos												
CV(fung)=	21.07 %		17.93 %		13.431 %							
CV(var.)=	3.049 %		27.10 %		14.036 %							

* Produto incorporado no solo antes da semeadura e repetido a cada 30 dias. ** Produto aplicado em pulverização aérea a cada 30 dias.

*** Aplicado em rega a cada 30 dias.

Figura 7 - Peso de raízes de mudas de limão cravo e laranja caipira do experimento de controle químico em sementeira.

Figura 8 - Peso de Parte Aérea de mudas de limão cravo e laranja caipira do experimento de controle químico em sementeira.

Figura 9 - Altura das mudas de limão cravo e laranja caipira do experimento de controle químico em sementeira.

Figura 10 - Número de mudas de limão cravo e laranja caipira do experimento de controle químico em sementeira.

Tabela 20 - Controle químico de *P. parasitica* em mudas de Limão Cravo em tubetes sob condições de casa de vegetação.

Tratamentos	Peso de Raiz (g) ⁽¹⁾	Peso de Parte Aérea (g) ⁽²⁾	Altura das plantas (cm) ⁽³⁾
Testemunha	18.18	16.28	11.77 a
Testemunha Inoculada	13.66	11.18	8.78 b
Fosetyl Al**	14.43	12.44	9.11 b
Propamocarb*	13.85	11.82	8.95 b
Metalaxyl + Mancozeb*	16.45	14.11	10.80 ab
Metalaxyl + Chlorothalonil*	16.27	14.24	10.00 ab
Metalaxyl granulado 5,0 gpc/m2***	13.57	11.75	8.77 b
Metalaxyl granulado 10,0 gpc/m2***	14.15	12.52	9.30 b
Metalaxyl granulado 20,0 gpc/m2***	13.85	12.08	8.96 b
Parâmetros Estatísticos			10,363 5
CV=			2,3945
DMS (5%)=			

⁽¹⁾ Média do peso das raízes de cada parcela com 4 repetições.

⁽²⁾ Média do peso da parte aérea com 4 repetições.

⁽³⁾ Média da altura de 10 plantas / parcela num total de 4 repetições.

* Produtos aplicados em rega a cada 30 dias com início no transplante.

** Produto aplicado em pulverização de parte aérea a cada 30 dias com início no transplante.

***Incorporado ao solo dos tubetes antes do transplante. Aplicação única

Figura 11 Altura de plantas, peso de parte aérea e peso de raiz de mudas de limão cravo do experimento de controle químico em tubetes.

Tabela 21 - Recuperação de *P. parasitica* do solo (em duas épocas) e das raízes pelo teste de isca no experimento de controle químico em tubetes.

Tratamento	Recuperação após retirada das mudas		Recuperação após 3 meses da retirada das mudas
	Raízes	Solo	
Testemunha	-	-	-
Testemunha Inoculada	+	+	+
Fosetyl Al**	+	+	+
Propamocarb*	+	+	+
Metalaxyl + Mancozeb*	-	-	-
Metalaxyl +Chlorothalonil*	-	-	-
Metalaxyl 5,0 gpc/m ² ***	+	-	-
Metalaxyl 10,0 gpc/m ² ***	-	-	-
Metalaxyl 20,0 gpc/m ² ***	-	-	-

⁽¹⁾ Avaliação de 5 g de raízes por placa com 20 discos de folha de citros por tratamento e 4 repetições. ⁽²⁾ Avaliação de 5 g de solo por placa com 20 discos de folha de citros por tratamento 4 repetições. ⁽³⁾ Resposta positiva (+) indicando presença do patógeno e resposta negativa (-) ausência.

* Produtos aplicados em rega a cada 30 dias com início no transplante. ** Produto aplicado em pulverização de parte aérea a cada 30 dias com início no transplante. ***Incorporado ao solo dos tubetes antes do transplante. Aplicação única

Tabela 22 - Recuperação quantitativa de *P. parasitica* do solo pelo teste de isca do experimento de controle químico em tubetes.

Tratamento	Recuperação de <i>P. parasitica</i> nas repetições			Média
	1	2	3	
Testemunha	-(1)	-	-	-(2)
Testemunha Inoculada	19	20	19	19.6
Fosetyl Al**	20	10	18	16.3
Propamocarb*	20	1	18	13.0
Metalaxyl + Mancozeb*	-	-	-	-
Metalaxyl + Chlorothalonil*	-	-	-	-
Metalaxyl granulado 5,0 gpc/m ² ***	-	-	-	-
Metalaxyl granulado 10,0 gpc/m ² ***	-	-	-	-
Metalaxyl granulado 20,0 gpc/m ² ***	-	-	-	-

(1) Total de pedaços de folhas de citros contaminadas num total de 20 avaliadas por repetição.

(2) Média das três repetições

* Produtos aplicados em rega a cada 30 dias com início no transplante.

** Produto aplicado em pulverização de parte aérea a cada 30 dias com início no transplante.

***Incorporado ao solo dos tubetes antes do transplante. Aplicação única

5 - DISCUSSÃO

5.1 Obtenção de isolados e produção de inóculo

A Figura 1 ilustra o crescimento dos isolados em diferentes temperaturas (16, 20, 24, 28, 32 e 36°C) evidenciando uma mesma tendência entre os isolados (Isolado 1, Isolado 7 e Isolado 164) de *Phytophthora* quanto ao crescimento de colônia em BDA, diferindo do comportamento do isolado de *P. capsici* cedido pelo Instituto Biológico de Sorocaba. Podemos ainda observar que o máximo de crescimento ocorreu em torno de 28°C porém, a 32°C houve uma boa taxa de crescimento caindo um pouco a 36°C. Tal fato não ocorreria para a espécie *P. citrophthora* cujo máximo de crescimento micelial seria em torno de 25°C com acentuada diminuição com temperaturas superiores a 30°C e total inibição a 35°C (VANDERWEYEN, 1983 e MATHERON & MATEJKA, 1992). Os isolados 1, 7 e 164 de *Phytophthora* tinham esporângio ovalado, apical e distintamente papilado, do tipo persistente e com anterídio tipo anfigeno. Diante dessas características, e com os dados de crescimento em diferentes temperaturas, foi possível classificar os isolados dentro do grupo II (Grupo “Palmivora”) da Chave de Waterhouse (1963) como *P. parasitica*. Outras características como forma e crescimento de colônia, descritas por VANDERWEYEN (1983), e a

especificidade do método de isolamento (teste de isca) contribuíram para a identificação dos isolados.

Com relação à obtenção de antagonistas, o maior número de isolados de *Trichoderma* foram recuperados do solo de mata e de uma área com café. Ambos os solos tinham alto teor de matéria orgânica, fator preponderante para a sobrevivência deste antagonista. Notamos que os isolados de *Trichoderma* provenientes das iscas com *Phytophthora* apresentaram melhor desempenho como antagonista quando comparados com aqueles recuperados com grão de trigo testemunha (sem o patógeno). Concluiu-se então que o micélio de *Phytophthora* foi atrativo ao *Trichoderma*. Tal resultado foi também obtido por DENNIS & WEBSTER (1971) que visualizaram hifas de *Trichoderma* se enrolando em hifas de *Pythium ultimum* e por CHET & ELAD (1983) que observaram hifas de *T. harzianum* crescendo em direção ao micélio de *Rhizoctonia solani*. GHINI & KIMATI (1989) descreveram a atratividade dos isolados de *Trichoderma* por iscas colonizadas com *Botrytis cinerea*, confirmando mais uma vez, a importância de utilizarmos técnicas seletivas no processo de isolamento de antagonistas.

Com relação à produção de inóculo de *P. parasitica*, no presente trabalho testou-se o comportamento do patógeno em diferentes meios de cultura para selecionar aquele capaz de proporcionar bom crescimento micelial e abundante esporulação (Tabelas 5 e 6). O meio de cenoura foi o mais eficiente no crescimento radial de *Phytophthora* e também propiciou maior esporulação. MENYONGA & TSAO, 1966 relataram que alta concentração do meio pode aumentar o crescimento da colônia mas não a esporulação. Os nossos resultados foram semelhantes em experimento com diferentes concentrações de cenoura (Tabela 7), onde a menor concentração utilizada resultou na produção de maior número de esporângios.

Para infestação do solo com propágulos de *Phytophthora* utiliza-se a produção de clamidósporos, metodologia desenvolvida por TSAO (1971). No entanto, este método de produção de inóculo é demorado e trabalhoso. Nos experimentos realizados nesta pesquisa foi proposta uma nova metodologia de infestação de solo, baseada em experimentos de MATHERON & MATEJKA (1991) que utilizaram discos de folhas de citros infectadas com esporângios para contaminar o solo. O nível de infestação obtido variou de 27 a 85 esporângios/g de solo, um índice considerado alto, sendo capaz de proporcionar perdas significativas no sistema radicular das plantas conforme afirmações de MENGE (1986) e SANDLER *et alli* (1987) que relataram como alta, populações de 10 - 20 propágulos /cm³ de solo. Ainda relacionado com o método de infestação de solo utilizado neste trabalho, além da quantificação do inóculo pela contagem do número de esporângios ao redor dos pedaços de citros, foi feita uma diluição serial dos solos infestados com solo esterilizado, onde recuperou-se o patógeno até em altas diluições (1/64).

O uso de pedaços de folhas de citros para produção de inóculo (esporângios) teve a finalidade de conservar a patogenicidade dos isolados e provavelmente possibilitar a formação de outras estruturas do patógeno, deixando o solo ou substrato infestado em condições semelhantes a uma contaminação natural. Este método mostrou-se eficiente, proporcionando altos índices de infecção da doença. Isto pode ser observado pela Tabela 14 e Figura 5.

5.2. Controle biológico de *P. parasitica*

Os cinco isolados de *Trichoderma* spp antagônicos à *P. parasitica* selecionados por hiperparasitismo com o teste de pareamento de colônia (Tabela 8) também foram eficientes no controle do patógeno “in vitro” produzindo antibióticos em meio BDA (Tabelas 9 e 10). Tal resultado foi também observado por WEINDLING (1934) com *T. lignorum* (Tode) HARZ, selecionado por ser hiperparasita e produtor de antibióticos contra *Phytophthora* spp. O método de pareamento de colônia, no presente estudo, possibilitou uma boa seleção dos isolados. Os de melhor desempenho foram aqueles selecionados pelo teste de isca de grão de trigo colonizado com *Phytophthora*, comprovando assim, a importância da seleção com especificidade. Em 1982, BELL *et alii* citaram que para seleção “in vitro” deve-se observar a especificidade para o sucesso de controle do patógeno para aplicação do antagônico “in vivo”.

A Tabela 9 revelou uma porcentagem de inibição, dos cinco isolados de *Trichoderma* contra *P. parasitica* acima de 95% em relação à testemunha, devido à liberação de substâncias antagônicas ao meio através do papel celofane. Nas placas onde o crescimento do patógeno foi inibido totalmente, o mesmo não foi capaz de crescer em novo meio de BDA sem a presença dos antibióticos. DENNIS & WEBSTER (1971) observaram o mesmo fato estudando as propriedades antagonísticas de grupos de espécies de *Trichoderma* spp. Provavelmente a toxidez das substâncias liberadas ao meio foi capaz de inativar totalmente o processo vital do patógeno pois, mesmo em teste com disco de colônia de isolados de *Trichoderma*, a liberação de substâncias antagônicas sem crescimento micelial atingiu 20 - 30 % de inibição do patógeno em relação à testemunha (Tabela 10. Neste experimento, foi utilizado BDA contendo 20 ppm

de benomyl, o qual, nesta concentração, inibe o crescimento micelial do antagonico mas não o inativa totalmente, permitindo liberação de antibióticos ao meio. Este efeito foi possível de ser observado devido a insensibilidade da *Phytophthora* ao benomyl.

A potencialidade dos isolados de *Trichoderma* spp “in vitro” foi confirmada com a utilização da mistura de cinco isolados, formulados em farinha de arroz adicionados à mudas transplantadas para tubetes preenchidos com substrato pré-infestado em casa de vegetação. O tratamento com menor dosagem (2g da mistura de farinha da arroz + *Trichoderma*/ tubete de 100 ml) foi o melhor, evidenciando maior peso de raiz, de parte aérea e altura de plantas em relação a testemunha não tratada (Tabela 12). A suplementação com nutrientes na fase inicial é muito importante para o estabelecimento do antagonico (DEACON & BERRY, 1993). Por outro lado KELLEY (1976) chamou atenção para o fato de resíduos de nutrientes utilizados para colonização de antagonicos beneficiar o patógeno e resultar numa maior incidência da doença. No experimento da Tabela 12, notamos que nas dosagens mais altas, com maior disponibilidade de nutrientes em forma de farinha de arroz, os tratamentos não diferiram estatisticamente da testemunha inoculada.

Apesar dos resultados positivos neste trabalho com o uso de um agente biológico para controle de *P. parasitica* em citros não se deve esquecer das limitações para que este controle se torne viável e acessível como por exemplo: falta de adaptabilidade dos agentes ao processo industrial, baixa eficiência de preparo comparado com o custo, falta de conhecimento sobre os riscos à saúde e ao ambiente e relutância dos agricultores em utilizar novas tecnologias (LEVIS & PAPAVIZAS, 1991). Apesar disso, a pesquisa inicial é essencial para que um dia a tecnologia de produção de controladores biológicos adaptados às nossas

condições se concretizem, e assegurem produção saudável e com rentabilidade econômica.

Pelo presente podemos ressaltar a importância de conhecimento das formas de antagonismos, bem como a necessidade de identificação dos antibióticos ou estratégia responsáveis pelo controle e adequação das formulações para produção econômica em larga escala dos agentes biológicos.

5.3. Controle físico de *P. parasitica*

A desinfestação de substratos para produção de mudas é um problema comum a muitos viveiristas. Usualmente é feita pelo aquecimento a vapor ou por agentes químicos como brometo de metila.

Áreas fumigadas, segundo RIDDINGS *et alii* (1977) podem ser rapidamente reinfestadas com *P. parasitica* quando há uma fonte de inóculo do patógeno próximo ao local do viveiro. No presente trabalho, foi proposta a erradicação desse patógeno através da solarização em coletor solar e/ou em sacos plásticos. Em coletor solar, como já era esperado obteve-se temperaturas superiores às do saco plástico. Apenas 24 horas de solarização no inverno em coletor solar foi suficiente para eliminar totalmente a *P. parasitica*, em concordância com dados obtidos por GHINI (1993) que obteve a mesma eficiência para os patógenos *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum* f sp. *phaseoli* e *Pythium aphanidermatum*.

Em sacos plásticos (Figuras 2 e 3) o fungo não foi controlado durante o inverno, por 24 ou 48 horas, provavelmente por que a temperatura no

pico mais alto de cada dia ficou apenas na faixa dos 40°C, temperatura incapaz de inativar o patógeno em questão.

Segundo HOUGH *et alii* (1979) a sensibilidade de *P. parasitica* ao tratamento térmico, através do uso de uma máquina para aquecimento das bordas da lesão no tronco da árvore, é similar às temperaturas para eliminação do patógeno de semente e de frutos relatados por KLOTZ & DeWOLFE (1961) e KLOTZ *et alii* (1960). O primeiro trabalho concluiu que temperatura de 60°C ou acima eliminou *P. parasitica*, impedindo o crescimento da lesão no tronco. Os dados do presente trabalho nos confirmaram a mesma faixa de temperatura como letal ao patógeno (Tabelas 13 e 15). Comparando a Figura 3, temperaturas em sacos plásticos, coletor solar e ambiente às 15 horas, no inverno, com a Tabela 13, recuperação de *P. parasitica* pelo teste de isca após a solarização, podemos concluir que apenas as temperaturas acima de 60°C (em coletor solar) foram capazes de eliminar o fungo. No verão, a solarização em sacos plásticos (Tabela 14) mostrou-se totalmente eficiente com exposição dos mesmos por 2 ou mais dias, onde a temperatura no horário mais quente atingia 60°C.

Em experimento em casa de vegetação para produção de mudas de porta-enxerto de citros com substrato pre-infestado com *P. parasitica* e submetido à solarização, foram obtidas diferenças significativas nos tratamentos com coletor solar por 24 e 48 horas, conferindo aumento de peso de parte aérea, peso de raiz e altura de plantas (Tabela 14). Os tratamentos coletor solar por 48 horas mais o *Trichoderma* e o coletor solar por 48 horas não diferiram entre si e o tratamento apenas com *Trichoderma* não foi eficiente. Tal fato ocorreu provavelmente pela forma de aplicação do antagônico, rega de suspensão, pois esta não propicia energia necessária para o desenvolvimento e colonização inicial do *Trichoderma*, como descrito em literatura por KELLEY (1976) e DEACON & BERRY (1993).

Propõe-se para um próximo trabalho, avaliar melhor a interação de métodos de solarização com controle biológico pois, segundo KATAN (1980), durante e após a solarização, o controle biológico pode atuar através da redução da população do patógeno ou na atividade de microorganismos antagônicos cujo efeito é aumentado com o processo de aquecimento ou através de uma mudança no equilíbrio biológico prevenindo a reinfestação pelo patógeno.

5.4. Controle químico de *P. parasitica*

Nos testes de controle químico “in vitro”, os dados obtidos indicaram o metalaxyl como o produto de maior efeito sobre a *Phytophthora*, com inibição superior a 80 % na concentração de 1 ppm e com 100% a 10 ppm. FARIH *et alii* (1981b) também relataram alta capacidade inibitória do metalaxyl ao crescimento micelial de *P. parasitica* “in vitro”. Farih ainda observou que a ED50 do produto após 7 dias foi de 0,04 mg/l. Segundo COFFEY & BOWER (1984), 1 ppm de metalaxyl foi capaz de inibir 100% do crescimento de *P. parasitica*.

Além do metalaxyl, com os dados deste trabalho (Tabela 16), observamos que chlorothalonil e mancozeb, produtos não sistêmicos, foram eficientes inibindo 73,8 e 57,5% do patógeno a 10 ppm, respectivamente. Tais produtos poderiam ser então recomendados, em formulações mistas com metalaxyl para minimizar o possível aparecimento de raças resistentes.

Analizando a eficiência dos produtos químicos em relação aos dados de casa de vegetação, no experimento de controle químico em sementeira (Tabela 19), não obtivemos diferenças estatísticas entre os tratamentos. Porém,

em testes de isca, o fungo não foi recuperado na testemunha e nos tratamentos onde havia sido utilizado metalaxyl granulado (Tabela 19).

Os dados referentes ao controle químico em tubetes (Tabela 20 e Figura 11) evidenciaram uma tendência de superioridade aos tratamentos de formulação mista (metalaxyl + mancozeb e metalaxyl + chlorothalonil), apesar da estatística não comprovar. Não houve também diferenças estatísticas entre a testemunha sadia e a inoculada, acredita-se que a provável causa tenha sido a temperatura muito elevada durante a condução do experimento, com níveis superiores a 45°C no solo por vários dias. ZENTMYER (1970), BENSON (1982) e FELD *et alii* (1990) observaram que extremos de temperatura limitam o desenvolvimento da doença por efeitos diretos no patógeno ou por redução da infecção. Recentemente, MATHERON & MATEJKA (1992), comprovaram o efeito da temperatura inativando ou reduzindo o desenvolvimento da doença, dispensando, em muitos casos, o uso de fungicidas.

Através de recuperação de patógeno pelo teste de isca, no experimento de controle químico em tubetes, pudemos observar a alta capacidade de erradicação da *Phytophthora* do substrato nos tratamentos com metalaxyl logo após a retirada das mudas (3 meses do transplantio) mantendo-se este efeito por mais 3 meses quando foi feita nova tentativa de recuperação do fungo. Nos demais tratamentos (fosetyl Al, propamocarb) bem como na testemunha inoculada, o fungo foi sempre recuperado. Na literatura encontramos uma divergência de opiniões a respeito do efeito do metalaxyl. LE ROUX *et alii* (1991) reportaram que ocorre redução no número de unidades de colônias do solo quando este recebe tratamento com metalaxyl e que o mesmo não ocorre com fosetyl-Al. SANDLER *et alii* (1989) ressaltaram o efeito do metalaxyl, contrário ao do Fosetyl-Al, matando diretamente o fungo do solo e reduzindo o número de

propágulos por unidade de volume do solo. No entanto, outros pesquisadores como MENGE (1986) e FEICHENBERGER (1989) afirmam que o produto tem apenas ação fungistática, sendo incapaz de matar totalmente o fungo. ZITKO et alii (1987) afirmam que o uso de metalaxyl no viveiro para controle de *Phytophthora* reduz a podridão de raiz e a população do patógeno mas não o erradica.

O teste de isca realizado para recuperação de *Phytophthora parasitica* do solo mostrou alta correlação com os dados obtidos em casa de vegetação nos experimentos de controle biológico (Tabela 11) e nos de controle por solarização (Tabela 13) indicando ser um teste confiável e com alto nível de precisão. Tal fato tem suporte diante de vários relatos na literatura internacional. Segundo MASAGO et alii (1977), DANCE et alii (1975) e KLOTZ et alii (1959) as técnicas de iscas são largamente utilizadas tanto em ensaios qualitativos como quantitativos de *Phytophthora* no solo. Além desses, YANNOU & GROGAN (1984) salientaram a importância do uso de iscas, apesar do desenvolvimento de meios seletivos, pois estas selecionam a espécie patogênica excluindo outros patógenos como *Pythium* por exemplo. ZITKO et alii (1987) descreveram que os dois métodos têm a mesma eficiência.

Com os dados obtidos neste trabalho, recomenda-se a utilização das técnicas testadas de forma integrada, com finalidade de se obter uma condição de supressividade ao patógeno no substrato para produção de mudas. O uso da solarização aliado à adição de microorganismos antagônicos como *Trichoderma* spp seguido da utilização de produtos como metalaxyl e chlorothalonil que não interferem no desenvolvimento do antagônico, podem melhorar o processo de obtenção de um substrato supressivo à *Phytophthora* e que conseqüentemente terá capacidade para formação de mudas sadias.

Conceitualmente, controle integrado é uma abordagem flexível e multidimensional de combate à doença utilizando vários componentes de controle tais como estratégias biológicas, culturais e químicas necessárias para manter a doença abaixo do limiar de dano econômico sem provocar desequilíbrios.

O sistema de produção de mudas em tubetes de plástico rígido é uma tendência atual para obtenção de plantas saudáveis num tempo menor (GOMES *et alii*, 1985). Esta técnica, aliada às alternativas de controle aqui propostas, pode vir a ajudar o produtor na implantação de pomares com mudas de alta qualidade fitossanitária.

6. CONCLUSÕES

- 6.1. O uso do meio de cenoura (50 g de cenoura, 10 ou 20 g de dextrose e 20 g de ágar) foi eficiente para colonização de pedaços de folhas de citros com esporângios na produção de inóculo para infestação do solo.
- 6.2. a) O método de iscas (semente de trigo pré-colonizadas com *Phytophthora parasitica*) é altamente eficiente no isolamento de linhagens de *Trichoderma* com grande potencial antagônico à *P. parasitica*.
- b) Os isolados de *Trichoderma* selecionados, produzidos em farinha de arroz, são eficientes em eliminar *P. parasitica* de substrato pré inoculado, conferindo na dose mais baixa (2 g/tubete de 10 ml) bom desenvolvimento das mudas.
- 6.3. A solarização do substrato para produção de mudas elimina eficientemente a *P. parasitica*, quando exposta por 24 horas, em coletor solar (tubos com 15 cm de diâmetro), tanto no inverno como no verão, ou por 48 horas, em sacos

plásticos transparentes (20 x 25 x 4 cm³) no verão. Os tratamentos com coletor solar propiciaram os melhores desenvolvimentos das mudas.

- 6.4. O melhor fungicida selecionado *in vitro*, o metalaxyl, aplicado sozinho ou em formulações mistas com mancozeb ou com chlorothalonil é altamente eficiente na erradicação de *P. parasitica* de substrato para produção de mudas; o que não sucede com propamocarb e fosetyl-Al.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, P.B. The potencial of mycoparasites for biological control of control of plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, **28**: 59-72, 1990.
- BACKMAN, P.A. & RODRIGUEZ-KABANA, R. A system for the growth and delivery of biological control agents to the soil. **Phytopathology**, St.Paul, **65**: 819-21, 1975.
- BAKER, K.H. & COOK, R.J. **Biological Control of Plant Pathogens**. San Francisco, W.H.Freeman, 1974. 433p.
- BARBERCHECK, M.E. & Von BROEMBSSEN, S.L. Effects of soil solarization on plant-parasitic nematodes and *Phytophthora cinnamomi* in south Africa. **Plant Disease**, St.Paul, **70**(10): 945-50, 1986.
- BELL, D.K.; WELLS, H.D.; MARKHAM, C.R. In vitro antagonist of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, St.Paul, **72**(4): 379-82, 1982.

- BENSON, D.M. Cold inactivation of *Phytophthora cinnamomi*. **Phytopathology**, St.Paul, **72**: 560-3, 1982.
- BESNARD, O. & DAVET, P. Mise en évidence de souches de *Trichoderma* spp à la fois antagonistes de *Pythium ultimum* et stimulatrices de la croissance des plantes. **Agronomie**, **13**:413-21, 1993.
- CAMPBELL, W.A. A method of isolating *Phytophthora cinnamomi* directly from soil. **Plant Disease Reporter**, Washington, **33**: 134-5, 1949.
- CHEE, K.H. & FOONG, K.M. Use of cocoa pod for recovering *Phytophthora* species pathogenic to *Hevea brasiliensis*. **Plant Disease Reporter**, Washington, **52**:5, 1968.
- CHET, I. & ELAD, Y. Mechanism of mycoparasitism. In: Les antagonismes microbiens; **24^e Colloque de la Société Française de Phytopathologie**. Bordeaux, p.35-40, 1983.
- COFFEY, M.D. & BOWER, L.A. In vitro variability among isolates of six *Phytophthora* species in response to metalaxyl. **Phytopathology**, St.Paul, **74**(4): 502-6, 1984.
- DANCE, M. H.; NEWHOOK, F.J.; COLE, J.S. Bioassay of *Phytophthora* spp in soil. **Plant Disease Reporter**, Washington, **59**:523-7, 1975.

- DAVIS, R.M. *Phytophthora* foot rot control with the systemic fungicides metalaxyl and fosetyl aluminium. **Procedure International Citriculture.**, **1**: 349-351, 1981.
- DAVIS, R.M. Control of *Phytophthora* root foot rot of citrus with systemic fungicides metalaxyl and phosetyl aluminium. **Plant Disease**, St.Paul, **66**(3): 218-20, 1982.
- DEACON, J.W. & BERRY, L.A. Biocontrol of Soil Borne Plant Pathogens: Concepts and their application. **Pesticide Science**, **37**: 417-26, 1993.
- DENNIS, C. & WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I Production of non-volatile antibiotics. **Transation British. Mycology Society.**, **57**(1): 25-39, 1971.
- EUCATEX MINERAL Ltda. **Sistemas e Insumos Plantmax para a agricultura**. 1994, 5p.
- FARIH, J.A.; MENGE, J.A.; TSAO, P.H.; OHR, H.D. Metalaxyl and efosite aluminium for control of *Phytophthora* gummosis and root rot of citrus. **Plant Disease**, St.Paul, **65**(8): 654-7, 1981a.
- FARIH, J.A.; TSAO, P.H.; MENGE, J.A. In vitro effects of metalaxyl on growth, sporulation, and germination of *Phytophthora parasitica* and *P. citrophthora*. **Plant Disease**, St.Paul, **65**(8): 651-4, 1981b.

FAWCETT, H.S. **Citrus diseases and their control**. New York, Mc Graw-Hill, 1936. 656p.

FEICHTENBERGER, E. Doenças induzidas por fungos do gênero *Phytophthora* em citros e seu controle. **Laranja**, Cordeirópolis, **10**(2): 359-78, 1989.

FEICHTENBERGER, E. Control of *Phytophthora* gummosis of citrus with systemic fungicides in Brazil. **Bulletin OEPP** , **20**: 139-48, 1990a.

FEICHTENBERGER, E. Resistência de combinações varietais cítricas a fungos do gênero *Phytophthora*. In: **INTERNATIONAL SEMINAR ON CITRUS ROOTSTOCKS**, 1, Bebedouro , 1990b, 233-42p.

FEICHTENBERGER, E.; ROSSETI, V.; POMPEU JR, J.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; FIGUEIREDO, J.O. Evaluation of tolerance of citrus in Brazil - A review. **Proceedings of International. Society of Citriculture**. 1992.

FELD, S.J.; MENGE, J.A.; STOLZY, L.H. Influence of drip and furrow irrigation on *Phytophthora* root rot of citrus under field and greenhouse conditions. **Plant Disease**, St.Paul, **74**: 21-7, 1990.

FENN, M.E. & COFFEY, M.D. Studies on the in vitro and in vivo antifungal activity of fosetyl-Al and phosphorous acid. **Phytophthology**, St Paul, **74**(5): 606 - 11, 1984.

- FULLER, M.S. & GISI, U. Comparative studies of the in vitro activity of fungicides oxadixyl and metalaxyl. **Micologia**, 77: 424-32, 1985.
- GERLACH, W.W.P.; HOITINK, H.A.J.; SCHMITTHENNER, A.F. Survival and host range of *Phytophthora citrophthora* in Ohio nurseries. **Phytopathology**, St.Paul, 66: 309-11, 1976.
- GHINI, R. A solar collector for soil disinfestation. **Netherland Journal of Plant Pathology**, 99: 45-50, 1993.
- GHINI, R. & KIMATI, H. **Método de isca para obtenção de isolados de *Trichoderma* antagônicos a *Botrytis cinerea***. Jaguariuna, CNPDA, 1989. 13p. (Boletim de Pesquisa, 3).
- GOMES, J.M.; COUTO, L.; PEREIRA, A.R. Uso de diferentes substratos na produção de mudas de *Eucaliptus grandis* em tubetes e em bandejas de isopor. **Revista Árvore**, 9(1):58:86, 1985.
- GRIMM, G.R. & ALEXANDER, A.F. Citrus leaf pieces as traps for *Phytophthora parasitica* from soil slurries. **Phytopathology**, St.Paul, 63: 540-1, 1973.
- GRINSTEIN, A.; KATAN, J.; ABDUL-RAZIK, A.; ZEYDAN, O.; ELAD, Y. Control of *Sclerotium rolfsii* and weeds in peanuts by solar heating of soil. **Plant Disease Reporter**., Washington , 63: 1056-9, 1979.

- HENDRIX, J.W. Sterol induction of reproduction and stimulation of growth of *Pythium* and *Phytophthora*. **Science**, **144**: 1028-9, 1964.
- HOUGH, A.; MULDER N.J.; LA GRANGE, J.M. Heat treatment for the control of *Phytophthora* Gummosis in citrus. **Plant Disease Reporter**, Washington, **63**(1):40-3, 1979.
- IANNON, N. & GROGAN, R.G. Water requirements for sporangium formation by *P. parasitica* in relation to bioassay in soil. **Plant Disease**, St. Paul, **68**:1043-8, 1984.
- JEFFERS, J.N. & MARTIN, S.B. Comparison of two medio selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. **Plant Disease**, St Paul, **70**(11): 1043-46, 1986.
- JUAREZ-PALACIOS, C.; FELIX-GASTELUM, R.; WAKEMAN, R.J.; PAPLOMATAS, E.J.; DEVAY, J.E. Thermal sensitivity of three species of *Phytophthora* and the effect of soil solarization on their survival. **Plant Disease**, St.Paul, **75**(11): 1160-4, 1991.
- KAEWRUNG, W.; SIVASITHAMPARAM, K.; HARDY, G.E. Effect of solarization of soil within plastic bags on root of Gerbera (*Gerbera jamesonii* L.). **Plant and Soil**, **120**:303-306, 1989.

- KANNWISHER, M.E. & MITCHELL, D.J. The influence of a fungicide on the epidemiology of black shank of tobacco. **Phytopathology**, St.Paul, **68**: 1760-65, 1978.
- KATAN, J. Solar pasteurization of soils for disease. **Plant Disease**, St.Paul, **64**(5): 450-4, 1980.
- KATAN, J.; GREENBERGER, A.; ALON, H.; GRINSTEIN, A. Solar heating by polyethylene mulching for the control of disease caused by soil-borne pathogens. **Phytopathology**, St.Paul, **66**: 683-8, 1976.
- KELLEY, W.D. Evaluation of *Trichoderma harzianum* impregnated clay granules as a biocontrol for *Phytophthora cinnamomi* causing damping-off of pine seedlings. **Phytopathology**, St.Paul, **66**: 1023-7, 1976.
- KLEINSCHMIDT, G.D. & GERDEMANN J.W. Stunting of citrus seedlings in fumigated nursery soil related to the absence of Endomycorrhizae. **Phytopathology**, St. Paul, **62**:1447-53, 1972.
- KLOTZ, L.J. & De WOLFE, T.A. Technique for isolating *Phytophthora* spp which attack citrus. **Plant Disease Reporter**., Washington, **42**: 675-6, 1958.
- KLOTZ, L.J. & De WOLFE, T.A. The production and use of zoospores suspensions of *Phytophthora* spp for investigations on diseases of citrus. **Plant Disease Reporter**, Washington, **44**(7): 572-3, 1960.

KLOTZ, L.J. & De WOLFE, T.A. Brow rot contact infection of citrus fruits prior to hot water treatment. **Plant Disease Reporter**, Washington, **45**: 268-71, 1961.

KLOTZ, L.J.; De WOLFE, T.A.; OISTACHER, C.N.; NAVAR, E.M.; CARPENTER, J.B. Heat treatments to destroy fungi in infected seeds and seedlings of citrus. **Plant Disease Reporter**, Washington, **44**: 858-61, 1960.

KLOTZ, L.J.; WONG, P.P.; De WOLFE, T.A. Survey of irrigation water for the presence of *Phytophthora* spp pathogenic to citrus. **Plant Disease Reporter**, Washington, **43**:830-2, 1959.

KNUDSEN, G.R; JOHNSON, J.B.; ESCHEN D.F. Alginate Pellet Formulation of *Beauveria bassiana* (Fungi: Hyphomycetes) isolate pathogenic to cereal aphids. **Journal of Economic Entomology**, Moscow, **83**(6):2225-8, 1990.

LEDERER, W.; LORENZ, K.H.; SEEMÜLLER, E. Estudios on antagonistic effects of *Trichoderma* isolates against *Phytophthora cactorum*. **Journal of Phytopathology**, **136**(2): 154-64, 1992.

LE ROUX, H.F.; WEHNER, F.C.; KOTZE, J.M.; GREECH, N.M. Combining fosetyl-Al trunk injection or metalaxyl soil drenching with soil application of aldicarb for control of citrus decline. **Plant Disease**, St. Paul, **75**:1233-6, 1991.

- LEVIS, S.A. & PAPAIVIZAS, G.C. Application of *Trichoderma* and *Gliocladium* in alginate pellets for control of *Rhizoctonia* damping-off. **Plant Pathology**, **36**: 438-46, 1987.
- LEVIS, S.A. & PAPAIVIZAS, G.C. Biocontrol of plant diseases: The approach for tomorrow. **Crop Protection**, **10**:95-105, 1991.
- LUTZ, A.L. & MENGE, J.A. Population fluctuations and the number and types of propagules of *Phytophthora parasitica* that occurs in irrigated citrus groves. **Plant disease**, St.Paul, **75**(2): 173-9, 1991.
- LUTZ, A.L.; MENGE, J.A.; FERRIN, D.M. Increased germination of propagules of *Phytophthora parasitica* by heating citrus soils sampled during winter. **Phytopathology**, St.Paul, **81**(8): 865-72, 1991.
- MARINGONI, A.C.; TOFOLI, J.G.; FREGONESE, L.H. Ação de fungicidas "in vitro" sobre *Rhizoctonia solani* e no controle de tombamento do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, **18**(3/4): 269-75, 1992.
- MARKS, G.C. & MITCHELL, J.E. Detection, isolation, and pathogenicity of *Phytophthora megasperma* from soils and estimation of inoculum levels. **Phytopathology**, St.Paul, **60**: 1687-90, 1970.

- MASAGO, H.; YOSHIKAWA, A. FUKADA, M.; NAKANISHI, H. Seletive inhibition of *Pythium* spp on a medium for direct isolation of *Phytophthora* spp from soils and plants. **Phytopathology**, St. Paul, **67**:425-8, 1977.
- MATHERON, M.E. & MATEJKA, J.C. Persistence of systemic activity for fungicides applied to citrus trunks to control *Phytophthora* gummosis. **Plant Disease**, St.Paul, **72**(2): 170-4, 1988.
- MATHERON, M.E. & MATEJKA, J.C. Influence of temperature on development of *Phytophthora* gummosis and root rot on citrus. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, **80**(10):1024, 1990. (Resumo)
- MATHERON, M.E. & MATEJKA, J.C. Effect of tetrathiocarbamate, metalaxyl and fosetyl-Al on development and control of *Phytophthora* root rot of citrus. **Plant Disease**, St.Paul, **75**: 264-8, 1991.
- MATHERON, M.E. & MATEJKA, J.C. Effects of temperature on sporulation and growth of *Phytophthora citrophthora* and *Phytophthora parasitica* and development of foot and root rot on citrus. **Plant Disease**, St.Paul, **76**(11): 1103-9, 1992.
- MENGE, J.A. A use of new systemic fungicides on citrus. **Citrograph**, **71**(2): 245-52, 1986.
- MENYONGA, J.M. & TSAO, P.H. Production of zoospore suspensions of *Phytophthora parasitica*. **Phytopathology**, St.Paul, **56**(1): 359-60, 1966.

- MILLER, P.M. V-8 juice agar as a general-purpose medium for fungi and bacteria. **Phytopathology**, St.Paul, **45**: 461-2, 1955.
- MIRCETICH, S.M.; ZENTMYER, G.A.; KENDRICK, J.B.JR. Physiology of germination of chlamydospores of *P. cinnamomi*. **Phytopathology**, St.Paul, **58**: 666-71, 1968.
- MUSUMECI, R.M.; FEICHTENBERGER, E.; RUEGG, E.F.; CAMPACCI, C.A. Absorção e translocação sistêmica de metalaxyl -¹⁴C por plântulas de *Citrus sinensis* (L.)(Osbeck) após aplicações em diferentes solos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, **7**: 393-400, 1982.
- PULLMAN, G.S.; DeVAY, J.E. ; GARBER, R.H. Soil solarization and thermal death: A logarithmic relationship between time and temperature for soilborne plant pathogens. **Phytopathology**, St. Paul, **71**:959-64, 1981.
- RIBEIRO, O.K. **A Source Book of the Genus *Phytophthora***. J. Cramer, Vaduz, 1978, 417 p.
- RIBEIRO, O.K. & VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. **I *Phytophthora* Identification Workshop**. Pelotas, 1988, 68p.
- RIDDINGS, W.H.; SCHENCK, N.C.; SNELL, R.R.; KEEN, W.M.; CORNELL, J.A. Reinvasion of methyl bromide treated soil by soilborne growth. **Proceedings of Florida State Horticultural Society**, **90**:70-4, 1977.

- SANDLER, H.A.; TIMMER, L.W.; GRAHAM, J.H. Effect of fosetyl-Al and metalaxyl applications on foot rot incidence and growth of young citrus trees under field conditions. **Procedure Florida State Horticultural Society**, **101**: 10-2, 1988.
- SANDLER, H.A.; TIMMER, L.W.; GRAHAM, J.H. Effect of systemic fungicides on *Phytophthora* populations, feeder root densities and yield of citrus. **Phytopathology**, St. Paul, **77**: 1691, 1987. (Resumo)
- SANDLER, H.A.; TIMMER, L.W.; GRAHAM, J.H. Timing of application of metalaxyl and fosetyl-Aluminium for control of *Phytophthora* foot rot. **Proceedings of Florida State Horticultural Society**, **99**: 57-9, 1986.
- SANDLER, H.A.; TIMMER, L.W.; GRAHAM, J.H.; ZITKO, S.E. Effect of fungicide applications on populations of *Phytophthora parasitica* and on feeder root densities and fruit yields of citrus trees. **Plant Disease**, St. Paul, **73**(11):902-6, 1989.
- STAPLETON, J.J. & DeVAY, J.E. Effect of soil solarization on populations of selected soilborne microorganisms and growth of deciduous fruit tree seedlings. **Phytopathology**, St. Paul, **72**:323-6, 1982.
- STOLZY, L.H.; LETEY, J.; KLOTZ, L.J.; LABANAUSKAS, C.K. Water and aeration as factors in root decay of *Citrus sinensis*. **Phytopathology**, St. Paul, **55**: 270-5, 1965.

- THOMSON, S.V. & ALLEN, R.M. Mechanisms of survival of zoospores of *Phytophthora parasitica* in irrigation water. **Phytopathology**, St.Paul, **66**: 1198-202, 1976.
- TIMMER, L.W. Preventive and curative trunk treatments for control of *Phytophthora* foot rot of citrus. **Phytopathology**, St.Paul, **67**: 1149-54, 1977.
- TIMMER, L.W. & CASTLE, W.S. Effectiveness of metalaxyl and fosetyl-Al against *Phytophthora parasitica* on sweet orange. **Plant Disease**, St.Paul, **69**(9): 741-3, 1985.
- TIMMER, L.W.; MENGE, J.A.; ZITKO, S.E.; POND, E.; MILLER, S.A.; JOHNSON, E.L.V. Comparison of ELISA techniques and standard isolation methods for *Phytophthora* detection in citrus orchards in Florida and California. **Plant Disease**, St.Paul, **77**(8): 791-6, 1993.
- TIMMER, L.W.; SANDLER, H.A.; GRAHAM, J.H.; ZITKO, S.E. Sampling citrus orchards in Florida to estimate populations of *Phytophthora parasitica*. **Phytopathology**, St.Paul, **78**(7): 940-4, 1988.
- TORGESON, D.C. Determination and measurement of fungitoxicity. In: TORGESON, D.C. **Fungicides an Advanced Treatise**. New York, Academic Press, 1967. v.1, cap.4, p.93-124.

- TSAO, P.H. Seletive media for isolation of pathogenic fungi . **Annual review of Phytopathology**, Palo Alto, **8**:157-86, 1970.
- TSAO, P.H. A serial dilution end-point method for estimating disease potentials of citrus *Phytophthoras* in soil. **Phytopathology**, St.Paul, **50**: 717-24, 1960.
- TSAO, P.H. Chlamidospore formation in sporangium-free liquid cultures of *Phytophthora parasitica*. **Phytopathology**, St.Paul, **61**(2): 1412-3, 1971.
- TUCKER, C.P.H. & ANDERSON, C.A. Correction of citrus seedling stunting on fumigated soils by phosphate application. **Proceedings of Florida State Horticultural Society**, **85**:10-12, 1972.
- VAN DER PLANK, J.E. **Plant Diseases; Epidemics and Control**. New York, Academic Press, 1963. 349p.
- VANDERWEYEN, A. Conntribution à l'étude de la Gommose à *Phytophthora* des agrumes au Maroc. **Fruits**, Bruxelles, **38**(2): 83-118, 1983.
- WATERHOUSE, G.M. The production of conidia in the genus *Phytophthora*. **British Mycology of Society. Transations.**, **47**: 455-8, 1931.
- WATERHOUSE, G.M. **Key to the species of Phytophthora de Bary**. Davis, Conn. Myc. Papers, 1963. 22p.

- WEINDLING, R. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. **Phytopathology**, St.Paul, **24**: 1153-79, 1934.
- WINDHAM, M.T.; ELAD, Y. & BAKER, R.A. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, St.Paul, **76**: 518-21, 1986.
- ZENTMYER, G.A. The effect of temperature on growth and pathogenesis of *P. cinnamomi* and on growth of its avocado host. **Phytopathology**, St.Paul, **60**: 1120-7, 1970.
- ZENTMYER, G.A. & ERWIN, D.C. Development and reproduction of *Phytophthora*. In: **The Tucker memorial symposium on *Phytophthora***, 1970.
- ZENTMYER, G.A.; GILPATRICK, J.D.; THORN, W.A. Methods of isolating *Phytophthora cinnamomi* from soil and host tissue. **Phytopathology**, St Paul, **50**:87, 1960.
- ZITKO, S.E., TIMMER, L.W.; CASTLE, W.S. Survey of Florida citrus nurseries for *Phytophthora* spp. **Proceedings of Florida Horticultural Society**, **100**:82-5, 1987.