

Danilo Reis Gonçalves

Levantamento de espécies de *Pythium sensu lato* de sistemas hidropônicos da região metropolitana de São Paulo

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2016

Danilo Reis Gonçalves

Levantamento de espécies de *Pythium sensu lato* de sistemas hidropônicos da região metropolitana de São Paulo

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: Dra. Carmen Lidia Amorim Pires-Zottarelli

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Gonçalves, Danilo Reis

G635L Levantamento de espécies de *Pythium sensu lato* de sistemas hidropônicos da região metropolitana de São Paulo / Danilo Reis Gonçalves -- São Paulo, 2016.
87p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2016.

Bibliografia.

1. Hidroponia. 2. Oomycota. 3. Taxonomia. I. Título.

CDU: 582.281

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP processo 2014/03499-9) pelo apoio e financiamento deste trabalho por meio da concessão de bolsa de Mestrado. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida no período inicial do Mestrado.

Ao Instituto de Botânica de São Paulo e ao Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, pela infraestrutura e apoio oferecidos.

À minha orientadora Dra. Carmen Lidia Amorim Pires-Zottarelli pela excelente orientação e por toda a dedicação na realização deste trabalho, por toda a atenção a mim dispensada e por ter sido sempre muito paciente e receptiva em todos os momentos. Agradeço imensamente pela oportunidade que me foi dada e por ter aberto as portas do seu laboratório sem mesmo me conhecer.

A todos os produtores hidropônicos da região metropolitana de São Paulo que abriram suas propriedades para a realização das coletas, em especial ao Sr. Hideo Kuramoto, que sem dúvida tornou possível a realização deste trabalho. Agradeço também a Sra. Sheigri e a Eng. Agrônoma Cristiane que muito ajudaram nas coletas nos municípios de Vargem Grande Paulista, Cotia, Biritiba-Mirim e São Roque.

Aos meus queridos amigos de laboratório: Ana Lucia de Jesus, Agostina Virginia Marano, Gustavo Henrique Jerônimo, Marcela Castilho Boro e Sarah Cristina de Oliveira Rocha, pela ótima convivência durante estes dois anos. Desejo um futuro profissional de muitas realizações para vocês!

Aos amigos que conquistei no Instituto de Botânica que levarei pra sempre comigo: Ricardo Matheus Pires, que acabou se tornando um grande amigo da vida, quem me escutou quando eu mais precisei, me deu suporte durante estes dois anos em SP, quem me apresentou o SESC e acabou se tornando meu parceiro do vôlei, tenho certeza que essa amizade é pra vida toda!; Gustavo Henrique Jerônimo, pelas parcerias nos cafés de todas as manhãs e tardes, pelos churrascos, obrigado por toda a ajuda que a mim foi dispensada!; Ana Lucia de Jesus, o meu muito obrigado pela imensa ajuda no

desenvolvimento deste trabalho, por sempre ter sido tão prestativa, por todas as caronas, rs!; Viviana Motato Vasquez, obrigado pelas conversas de corredor, por ter sido sempre simpática quando precisei, adorei ter te conhecido e com certeza ainda vou te visitar na Colômbia!; Stefano Zorzal de Almeida, obrigado pela parceria e por ter aceito morar comigo mesmo sem me conhecer, por ter sido compreensivo em diversos momentos; Ana Lívia Negrão Ribeiro e Alan Borges de Souza, por todas as festinhas e momentos de confraternização; Pryscilla Denise Almeida e Aluísio Fernandes, agradeço muito por ter tido a oportunidade de conhecer vocês, obrigado por me ouvirem e por estarem ao meu lado, desejo o melhor para vocês!

Aos amigos do Núcleo de Pesquisa em Micologia: Alex Almeida, Ana Cristina Bolanões, Ana Lúcia Vardiero, Larissa Bernardino Moro, Leonice Pedrosa, Luci Okino, Mauro Westphalen, pela companhia durante estes dois anos, pelas conversas de corredores, cafés, e discussões que tornaram estes dois anos mais prazerosos.

Aos pesquisadores e funcionários do Núcleo de Pesquisa em Micologia: Dra. Adriana de Mello Gugliotta, Dra. Iracema Helena Schoenlein-Crusius, Marli Gomes Lima do Nascimento, Dr. Michel Navarro Benatti, Dra. Rosely Ana Piccolo Grandi, Rosimeire Inácio e Dra. Vera Vitali, que de alguma forma contribuíram na realização deste trabalho, o meu muito obrigado. Agradeço especialmente ao Dr. José Ivanildo de Souza, que sempre esteve envolvido nas atividades do Laboratório de Fungos Aquáticos, obrigado pelas sugestões e dicas que muito ajudaram na realização deste trabalho.

Aos meus queridos amigos de graduação da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro: Cléssio Gomes, Pablo Vieira, Marcelly Alves, Raquel Oliveira e Claire Vieira. Obrigado pela amizade e por estarem sempre ao meu lado, mesmo distantes fisicamente.

Aos meus queridos pais Valmir Prado Gonçalves e Gracineide Reis Gonçalves pelo apoio desde sempre, por sempre acreditarem nas minhas escolhas mesmo sem saber muito bem do que se trata, rs. Amo vocês.

As minhas irmãs Marcela e Camila por sempre me apoiarem e por serem tão carinhosas comigo. Obrigado por vocês existirem. Amo vocês.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

RESUMO

Pythium sensu lato é considerado de grande importância devido ao potencial parasítico de muitas de suas espécies em cultivos hidropônicos. Devido a importância econômica da hidroponia para a região metropolitana de São Paulo, estudos que contribuam para o desenvolvimento deste setor são fundamentais. Em vista disto, de março/2014 a março/2015, foram realizadas coletas de diferentes amostras (água de poço artesiano/semi-artesiano, solução nutritiva, substrato e raízes de hortaliças) em sistemas hidropônicos localizados na região metropolitana de São Paulo e cidades vizinhas. No laboratório, as amostras, em triplicata, de substrato (5g), água de poço artesiano/semi-artesiano e solução nutritiva (30 mL) foram iscadas com sementes de *Sorghum* sp. e epiderme de *Allium cepa* (cebola). No caso das hortaliças, cinco fragmentos de raízes foram cortados e depositados em meio de cultura CMA (“cornmeal” ágar) acrescido dos antibióticos nistatina, ampicilina, rifampicina e miconazol. Após a incubação por 3-4 dias, os espécimes obtidos foram purificados e identificados morfolologicamente e molecularmente por meio do sequenciamento das regiões ITS do rDNA e COI do mDNA. Foi possível isolar espécimes de *Pythium sensu lato* de todos os tipos de amostras coletadas, sendo a maioria destes provenientes de amostras de raízes de hortaliças e solução nutritiva. Seis espécies de *Pythium* (*P. kashmirensense*, *P. middletonii*, *P. oopapillum*, *P. periplocum*, *P. segnitium* e *Pythium* sp.1) e duas espécies de *Phytophythium* (*Py. helicoides* e *Py. vexans*), foram identificadas, além de isolados de *Pythium* pertencentes ao Grupo F, bem como outros oomicetos (*Achlya hypogyna*, *Saprolegnia ferax* e *S. semihypogyna*). A patogenicidade *in vitro* de cinco espécies foi testada demonstrando que *P. periplocum* e *Py. helicoides*, isolados de substratos, podem causar morte de plântulas de hortaliças hidropônicas. De todas as propriedades visitadas foi constatado que as culturas mais produzidas são a alface (*Lactuca sativa*), rúcula (*Eruca sativa*) e agrião (*Lepidium sativum*). Além disso, 96% dos produtores visitados relataram que já tiveram perdas na produção causadas por *Pythium s. l.*, principalmente nas épocas mais quentes do ano. Pode-se concluir que a prevenção da entrada de *Pythium* spp. nos sistemas hidropônicos é fundamental para evitar futuros surtos de podridão de raiz, devendo o

produtor se atentar à qualidade do substrato utilizado na produção das mudas e à água utilizada para abastecimento dos sistemas.

Palavras chave: hidroponia, Oomycota, taxonomia

ABSTRACT

Pythium sensu lato is considered of great importance due the potential of many species as plant pathogens in hydroponics crops. Considering the economic importance of hydroponics production for São Paulo metropolitan region, studies that contributes to the development of this sector become essential nowadays. From March/2014 to March/2015, different samples (water from artesian/semi-artesian well, nutrient solution, substrate and crops roots) were collected in hydroponic systems localized at the São Paulo metropolitan region and cities nearby. At the laboratory, the samples in triplicate of substrate (5 g), water from artesian and semi-artesian well and nutrient solution (30 mL) were baited with *Sorghum* sp. seeds and onion skins (*Allium cepa*). In the case of the crops collected, five roots fragments were cut and placed in CMA (cornmeal ágar) culture medium with the antibiotics nystatin, ampicillin, rifampicin and miconazole. After 3-4 days of incubation, the specimens obtained were purified and identified through the morphology and sequencing of the ITS rDNA and COI mDNA regions. It was possible to isolate specimens of *Pythium sensu lato* from all type of samples collected, being the majority of the isolates from roots of hydroponic crops and nutrient solution. Six species of *Pythium* (*P. kashmirensense*, *P. middletonii*, *P. oopapillum*, *P. periplocum*, *P. segnitium* and *Pythium* sp.1) and two species of *Phytopythium* (*Py. helicoides* e *Py. vexans*), besides the isolates of *Pythium* from Group F and others oomycetes (*Achlya hypogyna*, *Saprolegnia ferax* and *S. semihypogyna*) were obtained. The *in vitro* pathogenicity of some species were tested showing that *P. periplocum* and *Py. helicoides* can cause death of hydroponics crops seedlings. From all farms visited, the most produced crops are *Lactuca sativa*, *Eruca sativa* and *Lepidium sativum*. Also, 96% of the growers reported that losses in the production caused by *Pythium s. l.* have occurred, mainly during the warm seasons. It was concluded that avoiding the entrance of *Pythium* spp. in the systems is essential to prevent future outbreaks in the production, being the producers responsible to use substrates and water of good quality.

Key words: hydroponics, Oomycota, taxonomy

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
MATERIAL E MÉTODOS	16
1. Localização das propriedades visitadas	16
2. Coletas	17
3. Fatores abióticos mensurados	19
4. Caracterização das propriedades hidropônicas	19
5. Processamento das amostras	19
5.1. Água de poço artesiano/semi-artesiano e solução nutritiva	19
5.2. Substratos	20
5.3. Cultivos hidropônicos	20
6. Identificação morfológica dos isolados	20
7. Análise molecular	21
7.1. Produção de biomassa	21
7.2. Extração de DNA	21
7.3. Amplificação e purificação do DNA	22
7.4. Sequenciamento	22
7.5. Análises filogenéticas	23
8. Testes de patogenicidade <i>in vitro</i> de <i>Pythium s. l.</i> em sementes de hortaliças produzidas em sistemas hidropônicos	23
RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
1. Fatores abióticos mensurados na solução nutritiva	24
2. Caracterização das propriedades visitadas	26
3. Isolados obtidos e ocorrência de <i>Pythium s. l.</i> nas amostras coletadas	30
3.1. Isolados obtidos e espécimes identificados	30
3.2. Ocorrência de <i>Pythium s. l.</i> nas amostras coletadas	33
4. Descrição morfológica das espécies de <i>Pythium s. l.</i> identificadas	36
5. Análises filogenéticas das regiões ITS rDNA e COI mDNA de <i>Pythium s. l.</i>	51
5.1. Gênero <i>Phytophythium</i>	52
5.2. Gênero <i>Pythium</i>	55
6. Testes de patogenicidade <i>in vitro</i> de <i>Pythium s. l.</i> em sementes de hortaliças produzidas em sistemas hidropônicos	61
7. Outros oomicetos isolados dos sistemas hidropônicos	68
7.1. Descrição das espécies de Saprolegniales isoladas dos sistemas hidropônicos	69
7.2. Análise filogenética da região ITS rDNA das espécies identificadas	75
CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

INTRODUÇÃO

O gênero *Pythium* (Peronosporales, Oomycota, Straminipila) é considerado um dos mais importantes dentre os organismos zoospóricos, principalmente devido ao seu potencial parasítico em plantas de interesse econômico, causando normalmente apodrecimento de raiz, caule e frutos; podridão de sementes na pré-emergência e o tombamento de plântulas na pós-emergência, conhecido como *damping off* (Plaats-Niterink 1981). Cerca de 140 espécies são descritas para o gênero, 41 delas já relatadas no Brasil (Maia *et al.* 2015), sendo a maioria cosmopolita e sapróbia em diferentes tipos de substratos, na água e no solo e/ou parasita em algas, crustáceos, outros fungos, plantas vasculares, mamíferos, e inclusive no homem (Calvano *et al.* 2011, Kageyama 2014).

Estudos moleculares das regiões ITS e LSU do rDNA e COI do mDNA demonstraram que o gênero *Pythium* é polifilético (Lévesque & de Cock 2004, Bala *et al.* 2010a, Uzuhashi *et al.* 2010, Robideau *et al.* 2011, Beakes *et al.* 2014) e que as espécies se distribuem em 11 diferentes clados (A-K), os quais estão inseridos em três grandes clados, o primeiro formado por espécies com zoosporângios filamentosos inflados e não inflados (clados A-D), o segundo por espécies com zoosporângios globosos a esféricos (clados E-J) e o terceiro por espécies com zoosporângios globosos semelhantes ao apresentado pelo gênero *Phytophthora* (clado K). Neste sentido, as análises filogenéticas realizadas por Lévesque & de Cock (2004) evidenciaram a posição intermediária dos representantes do clado K entre os gêneros *Pythium* e *Phytophthora*, justificando assim a criação do gênero *Phytopythium* por Bala *et al.* (2010a) para agregar as espécies deste clado. Em se tratando da morfologia, *Phytopythium* spp. possuem zoosporângios parecidos com aqueles apresentados por *Phytophthora* spp., enquanto a liberação dos zoósporos é similar a *Pythium* spp., a qual caracteriza-se principalmente pela formação de um tubo de descarga a partir do zoosporângio, por onde ocorre a migração do protoplasma para dentro de uma vesícula evanescente, formada no ápice do tubo de descarga, onde ocorre a maturação dos zoósporos e de onde são liberados após rompimento (Bala *et al.* 2010a). É importante ressaltar que a espécie *Phytopythium*

kandeliae, transferida do gênero *Halophytophthora* com base em análises morfológicas e filogenéticas (Marano *et al.* 2014, Thines 2014), apresenta a maturação dos zoósporos parte na vesícula e parte dentro do zoosporângio, provavelmente devido a migração lenta do protoplasma para a vesícula nesta espécie. Somente mais recentemente, as espécies do clado K foram transferidas formalmente para o gênero *Phytophthora* por de Cock *et al.* (2015).

Representantes de *Pythium sensu lato*, juntamente com bactérias como *Pseudomonas solanacearum* e *Erwinia* spp., o vírus Mirafiori da alface (MiLV), o vírus do mosaico da alface (LMV) e fungos como *Bremia lactucae*, *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani* têm sido apontados como os principais responsáveis por doenças em cultivos hidropônicos ao redor do mundo (Jenkins & Averre 1983, Vida *et al.* 2004, Silva & Lima Neto 2007). Entretanto, neste tipo de cultivo, não é raro o ataque de insetos, especialmente de pulgões e da mosca mineradora, além de doenças causadas por nematóides (Lopes *et al.* 2005, Labhidro 2015). Várias espécies foram citadas como patógenas de diferentes culturas hidropônicas (Stanghellini & Kroland 1986, Stanghellini & Rasmussen 1994, Herrero *et al.* 2003, Gull *et al.* 2004, Teixeira *et al.* 2006, McLeod *et al.* 2009, Bala *et al.* 2010b, Baptista *et al.* 2011, Pinto *et al.* 2011) sendo que no Brasil quatro foram relatadas nestes sistemas, *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp, *P. dissotocum* Drechsler, *P. middletonii* Sparrow e *Phytophthora helicoides* (Drechsler) Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque, estas isoladas de raízes sintomáticas de alface, agrião, tomate e rúcula, além de isolados pertencentes aos grupos “F” e “T”. De acordo com Plaats-Niterink (1981), os isolados que apresentam somente estruturas assexuadas de reprodução são classificados em grandes grupos. As espécies do grupo F são aquelas que apresentam zoosporângios filamentosos não inflados enquanto as espécies do grupo T apresentam zoosporângios filamentosos inflados.

Os inóculos de *Pythium s. l.* (zoósporos, oósporos e fragmentos de hifas) podem ser introduzidos para dentro dos sistemas hidropônicos de diferentes maneiras, como por solo contaminado presente em ferramentas, calçados, poeira, componentes do encanamento, substratos e mudas contaminadas, substratos não esterilizados utilizados para produção das mudas, além da água

utilizada no preparo da solução nutritiva (Martin & Loper 1999, Lopes 2003, Sutton *et al.* 2006, Baptista 2007). Além disso, pequenos dípteros conhecidos como “fungus gnats” (*Bradysia* spp.) e “shore flies” (*Scatella stagnalis* Fallen), frequentemente encontrados em instalações hidropônicas, são considerados importantes vetores (Baptista 2007). Neste contexto, a qualidade dos insumos e produtos utilizados no processo produtivo, como por exemplo, dos substratos para produção de mudas, bem como da água que abastece os sistemas, são fundamentais. Diversos tipos de substratos são utilizados para os cultivos hidropônicos, tais como fibra de coco, casca de arroz parcialmente carbonizada, areia, lã de rocha, vermiculita e outros materiais mesclados ou puros (Miranda *et al.* 2011). Quanto à água utilizada para abastecimento dos sistemas, a grande maioria dos produtores utiliza água proveniente de poços artesianos ou semi-artesianos localizados em suas propriedades. Lopes *et al.* (2005) e Stanghellini & Rasmussen (1994) ressaltam que deve-se dar preferência a utilização de água de poços artesianos e semi-artesianos quando comparada a água de córregos e rios para abastecimento dos sistemas hidropônicos, no entanto, pouco se sabe sobre a qualidade desta água quanto a ausência e/ou presença de fitopatógenos.

Todos esses cuidados são extremamente necessários, pois uma vez presente nos cultivos hidropônicos, espécies de *Pythium* s. l. são normalmente destrutivas, principalmente nas épocas mais quentes do ano, quando há elevação da temperatura da solução nutritiva que abastece os cultivos e do ambiente das casas de vegetação, levando a grandes perdas na produção e ao abandono das atividades por parte dos produtores (Vanachter & Leuven 1995, Sutton *et al.* 2006, Patekoski & Pires-Zottarelli 2010). No entanto, a presença delas em plantas assintomáticas também é bastante comum, sendo esta fase da colonização das raízes das plantas chamada biotrófica, o que leva normalmente a uma redução na produção (Utkhede *et al.* 2000), chegando a causar prejuízos superiores a 50% na produção, mesmo na ausência de sintomas de podridão radicular (Stanghellini & Kronland 1986). Esta fase pode anteceder a fase necrotrófica, decisiva para o aparecimento dos sintomas, o que torna inicialmente as raízes escuras, com diferentes tonalidades de marrom ou amarelo, dependendo do tipo de hospedeiro e das espécies envolvidas (Sutton *et al.* 2006).

A hidroponia no Brasil teve sua expansão a partir da década de 90, sendo a produção dos cultivos hidropônicos em sistema NFT (Nutrient Film Technique) a mais difundida. Neste tipo de sistema, as raízes das plantas são apoiadas em canais estreitos e inclinados, banhadas de forma contínua ou intermitente pela solução nutritiva, que fica armazenada em um reservatório e é movimentada ciclicamente por meio de uma bomba de recalque (Teixeira-Yañez 2000, Baptista 2007). Diversas culturas hidropônicas são produzidas no país, como alface (*Lactuca sativa* L.), abobrinha (*Cucurbita pepo* L.), aipo (*Apium graveolens* L.), agrião (*Lepidium sativum* L.), berinjela (*Solanum melongena* L.), catalonha (*Cichorium intybus* L.), coentro (*Coriandrum sativum* L.) cebolinha (*Allium fistulosum* L.), espinafre (*Spinacia oleracea* L.) manjerição (*Ocimum basilicum* L.), menta (*Mentha piperita* L.), morango (*Fragaria* spp.), pepino (*Cucumis sativus* L.), pimentão (*Capsicum cordiforme* Mill.), repolho (*Brassica oleracea* L.), rúcula (*Eruca sativa* L.), salsa (*Petroselinum* spp.), tomate (*Solanum lycopersicon* L.), dentre outras (Furlani 1999, Baptista 2007, Tudo Hidroponia 2015). No entanto, pouco se conhece sobre a diversidade das espécies de *Pythium* s. l. que ocorrem associadas a estes cultivos.

Quando comparada a produção de hortaliças em cultivo convencional no solo, a produção em sistemas hidropônicos apresenta como principais vantagens para o consumidor, a obtenção de vegetais hidropônicos saudáveis durante todo o ano, na maioria das vezes sem qualquer defensivo devido ao menor ataque de pragas e doenças; o menor contato das culturas com bactérias, fungos, lesmas, insetos e vermes, o que torna o produto mais limpo para o consumidor com uma maior durabilidade em geladeira, e como desvantagens o custo mais elevado e o descarte da solução no meio ambiente, em algumas propriedades. Já para o produtor, uma das importantes vantagens é a maior higienização e controle da produção em ambiente protegido; a menor incidência de pragas e doenças; a maior produtividade e uniformidade das culturas; o menor desperdício de água e nutrientes; a ausência de preocupação com rotação de culturas e replantio imediato; a pouca necessidade de uso de defensivos; a diminuição de trabalho braçal com as culturas; a versatilidade de local e área para cultivo e o retorno de investimento num período de aproximadamente seis a oito

meses. No entanto, o produtor deve dominar a técnica, o que exige conhecimentos de fisiologia vegetal, cuidado diário com as culturas e a prevenção com relação a falta de energia elétrica (Furlani 1996, Patekoski 2010, Labhidro 2015, Tudo Hidroponia 2015). Com as diversas vantagens apresentadas pela produção de hortaliças em sistemas hidropônicos, esta prática se difundiu por vários estados do Brasil, sendo atualmente a região sudeste e, principalmente o estado de São Paulo, os que concentram o maior número de produtores hidropônicos (Labhidro 2015).

Devido à importância de *Pythium s. l.*, a escassez de estudos de levantamento das espécies que ocorrem nos cultivos hidropônicos brasileiros e da importância da existência e expansão da hidroponia para o país, principalmente para a região de São Paulo, o presente estudo teve como objetivo realizar um levantamento das espécies de *Pythium s. l.* existentes nos sistemas hidropônicos localizados em propriedades na Região Metropolitana de São Paulo e cidades vizinhas, de forma a subsidiar futuros estudos que estabeleçam medidas de prevenção e controle de doenças causadas por este patógeno.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (i) Caracterizar as propriedades hidropônicas visitadas mediante a realização de um questionário com os produtores;
- (ii) Verificar a presença de *Pythium s. l.* na água utilizada para abastecimento dos cultivos hidropônicos (poços artesianos e semi-artesianos), na solução nutritiva circulante, nas raízes de hortaliças (plantas assintomáticas e sintomáticas) e no substrato utilizado para produção das mudas;
- (iii) Identificar as espécies de *Pythium s. l.* isoladas de sistemas hidropônicos mediante caracterização morfológica e molecular (regiões ITS do rDNA e COI do mDNA);
- (iv) Testar a patogenicidade *in vitro* de cinco isolados de *Pythium s. l.* em sementes de hortaliças hidropônicas;

- (v) Determinar possíveis pontos de entrada de *Pythium s. l.* nos sistemas hidropônicos, de maneira a facilitar o manejo pelos produtores visitados.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Localização das propriedades visitadas

Neste estudo, propriedades em dez municípios diferentes foram visitadas para a realização das coletas, a maioria delas localizadas no polo hidropônico da região metropolitana de São Paulo: Embu-Guaçu, Embu das Artes, Itapeverica da Serra, Salesópolis, Mogi das Cruzes, Biritiba-Mirim, Vargem Grande Paulista, Cotia, Ibiúna e São Roque. Coletas em cidades vizinhas, como Ibiúna e São Roque, foram realizadas tendo em vista o relato de perda da produção por parte dos produtores e a necessidade de detecção e identificação do patógeno.

As propriedades foram selecionadas de acordo com o interesse dos produtores, mediante contato realizado com o Sr. Hideo Kuramoto, presidente da Associação dos Produtores Hidropônicos da região. Deve-se ressaltar que foram selecionadas propriedades de diferentes portes e infra-estrutura (Figura 1), contemplando assim diferentes situações para o estudo.



Figura 1. Produção hidropônica em propriedades de diferentes portes e infra-estrutura nos municípios de Itapecerica da Serra (A), Vargem Grande Paulista (B) e São Roque (C e D)

2. Coletas

Entre os meses de março/2014 e março/2015 foram realizadas coletas em 30 propriedades. Em todas as propriedades visitadas foram coletadas amostras de aproximadamente 100 mL de água de poço artesiano e/ou semi-artesiano e solução nutritiva circulante (Figura 2), substrato utilizado para produção das mudas e diferentes exemplares de hortaliças (Tabela 1). Todas as amostras foram coletadas em triplicata, com exceção do substrato utilizado para produção das mudas, sendo neste caso coletada uma única amostra de aproximadamente 100 g. No caso das hortaliças, optou-se em coletar uma maior diversidade de cultivos hidropônicos, contemplando assim diferentes amostras para serem analisadas quanto a ausência ou presença de *Pythium s. l.* nas raízes.



Figura 2. Coleta de água de poço artesiano armazenada em tanques para abastecimento do sistema (A) e solução nutritiva circulante (B)

Tabela 1. Localização das propriedades visitadas com respectivos substratos e hortaliças coletadas em cada propriedade.

Propriedade	Cidade	Substrato (Marcas)	Hortaliça coletada
1	Embu-Guaçu	Fort Fibra	Alface crespa/rúcula
2	Embu-Guaçu	Fort Fibra/Golden Mix	Alface crespa/agrião/catalonha
3	Embu-Guaçu	Fort Fibra/Golden Mix/Carolina Padrão	Agrião/coentro
4	Embu-Guaçu	Fort Fibra	Rúcula/espinafre japonês
5	Embu das Artes	*	Alface crespa
6	Itapec. da Serra	**	Alface crespa
7	Itapec. da Serra	Carolina Padrão	Alface roxa
8	Itapec. da Serra	Carolina Padrão	Almeirão/rúcula
9	Itapec. da Serra	Golden Mix	Alface crespa/esp. japonês
10	Itapec. da Serra	Multiplant/Golden Mix/Carolina Padrão	Agrião/Chicoria
11	Itapec. da Serra	Golden Mix/Carolina Padrão	Alface lisa
12	Itapec. da Serra	Fort Fibra/Golden Mix	Alface crespa/rúcula
13	Itapec. da Serra	*	Agrião
14	Mogi das Cruzes	Fibra de coco (sem marca)	Alface crespa
15	Mogi das Cruzes	Fort Fibra	Rúcula
16	Mogi das Cruzes	*	Alface crespa
17	Salesópolis	Golden Mix/Carolina Padrão	Alface crespa
18	Salesópolis	Golden Mix	Salsão
19	Salesópolis	Golden Mix	Coentro/mostarda
20	Biritiba-Mirim	Golden Mix	Alface mimosa
21	Vargem G. Paulista	Carolina Padrão	Alface crespa/rúcula
22	Vargem G. Paulista	*	Alface crespa
23	Cotia	Vida Verde Substratos	Rúcula
24	Cotia	Golden Mix	Alface crespa
25	Vargem G. Paulista	PlantMix	Alface crespa/agrião/rúcula
26	Ibiúna	Golden Mix	Alface crespa
27	Ibiúna	Carolina Padrão	Alface crespa
28	São Roque	Golden Mix	Alface crespa
29	São Roque	Carolina Padrão	Rúcula
30	São Roque	Carolina Padrão	Agrião

*Propriedades onde não foi possível a coleta de substratos; **Propriedade onde não se utiliza substratos (mudas compradas)

3. Fatores abióticos mensurados

Para a caracterização abiótica da solução nutritiva circulante de cada propriedade, os seguintes parâmetros foram mensurados nos diferentes locais de coleta: temperatura (°C), pH, oxigênio dissolvido (mg.L⁻¹) e condutividade elétrica (µS.cm⁻¹), sendo as medições realizadas através do equipamento U-51 Horiba.

4. Caracterização das propriedades hidropônicas

Em cada propriedade visitada foi realizado um questionário com os produtores visando investigar as seguintes características: diversidade de hortaliças cultivadas e a quanto tempo trabalham com hidroponia, origem da água utilizada para abastecimento do sistema hidropônico, métodos de tratamento da água de abastecimento (se existente) e medidas de higiene adotadas na produção, conhecimento dos produtores quanto ao fitopatógeno *Pythium*, bem como o relato de problemas ocorridos e perdas na produção. Questões relacionadas a utilização de produtos químicos e/ou de controle biológico durante o processo produtivo também foram abordadas.

5. Processamento das amostras

5.1. Água de poço artesiano/semi-artesiano e solução nutritiva

No laboratório, alíquotas das amostras de água de poço artesiano e/ou semi-artesiano e solução nutritiva (30 mL) coletadas em cada propriedade foram colocadas em placas de petri e iscadas com sementes de *Sorghum* sp. (sorgo) e fragmentos de epiderme de *Allium cepa* (cebola), sendo realizadas triplicadas para cada amostra. Posteriormente as placas foram incubadas por 3-4 dias a 21°C e após a colonização das iscas, as colônias foram transferidas para meio de cultura CMA (*cornmeal* ágar) visando a purificação (Sparrow 1960, Milanez 1989).

5.2. Substratos

Os substratos coletados (5 g de cada, tabela 1) foram misturados com 30 mL de água destilada e esterilizada e colocados em placas de petri em triplicata, sendo adicionadas sementes de *Sorghum* sp. (sorgo) e fragmentos de epiderme de *Allium cepa* (cebola) como iscas. As placas foram incubadas por 3-4 dias a 21°C e após a colonização das iscas, as colônias foram transferidas para meio de cultura visando a purificação (Sparrow 1960, Milanez 1989).

5.3. Cultivos hidropônicos

A metodologia adotada para o processamento das raízes foi a descrita por Teixeira *et al.* (2006). As raízes foram retiradas e lavadas em água corrente para retirada de resíduos de matéria orgânica. Posteriormente, cinco fragmentos foram cortados e colocados em meio de cultura CMA (8,5 g de cornmeal ágar e 500 mL de água destilada) acrescido dos seguintes antibióticos: nistatina 10 mgL⁻¹, ampicilina 250 mgL⁻¹, rifampicina 10 mgL⁻¹ e miconazol 1 mgL⁻¹ (Senda *et al.* 2009), sendo realizadas triplicatas para cada amostra. Em seguida, as placas foram incubadas por 3-4 dias a 21°C. A medida que as colônias foram crescendo, as mesmas foram sendo transferidas para placas de petri com água destilada e esterilizada com adição de sementes de sorgo e epiderme de cebola para obtenção da cultura visando estudos morfológicos e moleculares dos isolados.

6. Identificação morfológica dos isolados

Os espécimes isolados foram identificados morfolologicamente utilizando-se as monografias de Middleton (1943), Frezzi (1956), Waterhouse (1967), Plaats-Niterink (1981), bem como, descrições originais das espécies descritas posteriormente, levando-se em consideração as características como, a presença ou não de dilatações hifálicas e haustórios; o tamanho e tipo de zoosporângio; produção e formação dos zoósporos; forma, tamanho e posição de oogônio; tamanho e condição plerótica ou aplerótica de oósporos; forma e origem de anterídio, bem como, o número

de anterídios por oogônio. Documentação fotográfica das espécies foi realizada com o auxílio de equipamento de captura de imagem Leica Qwin V3.

Para os espécimes isolados pertencentes a ordem Saprolegniales utilizou-se principalmente as monografias de Sparrow (1960) e Johnson (2002). O sistema de classificação utilizado para as espécies identificadas foi o de Beakes *et al.* (2014).

7. Análise molecular

7.1. Produção de biomassa

Para a produção de biomassa utilizada na extração do DNA genômico, os isolados selecionados foram purificados inicialmente em CMA acrescido de antibióticos (penicilina + sulfato de estreptomicina). Após a purificação, pequenos fragmentos do meio de cultura sólido contendo micélio foram transferidos para erlenmeyers de 250 mL contendo cerca de 50 mL de meio de cultura líquido esterilizado (MP₅: 2 g maltose, 0,5 g peptona, 500 mL H₂O destilada), os quais foram mantidos a temperatura ambiente por 3-7 dias para crescimento. Após crescimento, os fragmentos de biomassa foram transferidos para microtubos Eppendorf (1,5-2,0 mL) e centrifugados a 13000 rpm por 15 minutos para separar a biomassa do sobrenadante, o qual foi descartado. A biomassa produzida em triplicata foi concentrada em um dos microtubos, dentro do qual foi adicionado 1 mL de água de osmose-reversa esterilizada. Os microtubos foram agitados em vortex a ~2000 rpm durante 20-30 segundos e novamente centrifugados. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os péletes de biomassa utilizados para extração de DNA (Lamour & Finley 2006, adaptado).

7.2. Extração de DNA

Após a obtenção da biomassa, a mesma foi lavada com água destilada esterilizada (1 mL) e centrifugada a 13000 rpm por sete minutos. Após as lavagens, a água foi descartada e a biomassa utilizada para a extração do DNA por meio do “PureLink Genomic DNA Kit” (Invitrogen TM). A

eficiência da extração foi avaliada após eletroforese em gel de agarose 1%. O DNA genômico foi armazenado em freezer (-20°C) para as etapas posteriores.

7.3. Amplificação e purificação do DNA

Foram amplificadas as regiões ITS do rDNA e COI do mDNA utilizando-se os primers UN-up18S42 e UN-up28S22 e OomCoxI-Levup e OomCoxI-Levlo (Robideau *et al.* 2011), respectivamente. As reações de PCR foram realizadas utilizando o “PCR Supermix Kit” (Invitrogen™) e o “Ready Mix Taq PCR Reaction Mix with MgCl₂ (Sigma-Aldrich®) para o volume final de 25 µL em microtubos de 200 µL. Os microtubos foram incubados em um termociclador “C1000 Touch™ Thermal Cycler”(Bio-Rad) utilizando o ciclo “Standart PCR” (Dr. Timothy Young James, comunicação pessoal) para a região ITS, o qual consiste em uma desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos; 35 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 54°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto; extensão final 72°C durante 7 minuto e manutenção a 12°C (∞). Para a região COI foi utilizado o ciclo descrito por Robideau *et al.* (2011): desnaturação inicial 95 °C por 2 min; 35 ciclos de 95 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 72°C por 1 min; extensão final 72°C por 10 min e manutenção a 4°C (∞). Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e purificados com o “AxyPrep PCR Clean-up Kit” utilizando-se 30 µL de tampão eluente e finalmente armazenado em congelador a -20°C.

7.4. Sequenciamento

As amostras amplificadas e purificadas foram sequenciadas em sequenciador ABI 3730 DNA Analyser (Life Technologies™) instalado no CEGH-USP, Centro de Estudos do Genoma Humano, Instituto de Biociências, USP (<http://genoma.ib.usp.br>). Para cada reação de sequenciamento foi enviado um microtubo de 200 µL contendo 5 µL de DNA na concentração de 25-30 ng/µL e 2,5 µL de cada primer na concentração de 5 µM.

7.5. Análises filogenéticas

As sequências obtidas foram editadas manualmente utilizando o programa “SequencherTM Version 4.1.4”, para a realização dos cortes de suas extremidades, montagem dos “contigs”, correção de bases ambíguas de acordo com os cromatogramas e obtenção das sequências consenso.

Após a edição das sequências das regiões ITS do rDNA e COI do mDNA, as mesmas foram comparadas por meio do programa BLASTn (“Basic Local Alignment Search Tool”) do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) para a busca das sequências de máxima identidade. As análises filogenéticas foram realizadas de acordo com as seguintes etapas: (i) alinhamento múltiplo das sequências no MAFFT (Kazutaka & Daron 2013); (ii) eliminação de regiões de alinhamento ambíguo no programa Geneious (versão 8.0.5); (iii) escolha do melhor modelo de substituição utilizando-se o software jModeltest 0.1.1 (Posada 2008); e (iv) construção das árvores filogenéticas pelo método de Máxima Verossimilhança utilizando-se o software PhyML 3.1 (Guindon & Gascuel 2003), com “bootstrap” de 1000 replicações; e por meio da análise bayesiana, utilizando-se o software MrBayes v.3.2.1 (Ronquist & Huelsenbeck 2003) através de técnicas de Monte Carlo em cadeia de Markov (MCMC) para calcular a probabilidade posterior das árvores filogenéticas com 5 milhões de gerações. O melhor modelo foi selecionado pelo Critério de Informação de Akaike (AIC) no jModelTest. Os primeiros 10% de gerações foram descartados como “burn-in”.

8. Testes de patogenicidade *in vitro* de *Pythium s. l.* em sementes de hortaliças produzidas em sistemas hidropônicos

Para a realização dos experimentos de patogenicidade *in vitro* foram selecionados cinco isolados de *Pythium sensu lato* obtidos nas coletas e duas hortaliças produzidas nas propriedades visitadas.

A metodologia adotada para os testes de patogenicidade *in vitro* foi a descrita em Teixeira *et al.* (2006). Primeiramente, as sementes selecionadas foram desinfestadas superficialmente com

hipoclorito de sódio (três partes de água destilada : uma parte de água sanitária – 0,625% de cloro ativo) e posteriormente colocadas para germinar em papel filtro umedecido por 48 horas a 21°C. Uma vez pré-germinadas, as sementes foram transferidas para placas de petri contendo meio de cultura ágar-água (8,5g ágar/500mL H₂O) e em seguida um disco de 6mm de diâmetro contendo micélio do isolado de *Pythium s. l.* de interesse, foi disposto no centro da placa. Placas contendo somente as sementes pré-germinadas em meio de cultura serviram como controle. Os experimentos foram conduzidos independentemente para cada isolado avaliado, sendo considerada a temperatura ótima de crescimento de cada isolado e a temperatura ideal para a germinação das sementes avaliadas, de acordo com a literatura específica.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado com 5 repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de petri. As placas de petri foram incubadas em câmaras de crescimento com temperatura controlada e fotoperíodo de 12 horas. Após dez dias, tempo necessário para aparecimento de sintomas, foram verificados os comprimentos da radícula e hipocótilo e a porcentagem de plântulas sobreviventes, como descrito por Pinto *et al.* (2005) e Texeira *et al.* (2006). Para as análises estatísticas foram utilizadas as análises de variância e teste t de Student, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Past.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Fatores abióticos mensurados na solução nutritiva

Na Tabela 2 constam os valores máximo, médio e mínimo dos fatores abióticos (temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica) mensurados na solução nutritiva de cada propriedade visitada.

Tabela 2. Valores máximo, médio e mínimo dos parâmetros mensurados (temperatura, condutividade, oxigênio e pH) nas soluções nutritivas de cada propriedade visitada

Valor/Fator abiótico	Temperatura (°C)	Condutividade ($\mu\text{S.cm}^{-1}$)	Oxigênio (mg.L^{-1})	pH
Maior	32,3	3,53	9,40	7,90
Médio	24,0	1,67	7,20	6,31
Menor	16,3	0,30	5,17	4,80

A temperatura da solução nutritiva variou bastante durante as coletas, uma vez que foram realizadas coletas tanto em meses de verão quanto de inverno. Durante as coletas realizadas nas cidades de Ibiúna e São Roque (Janeiro e Fevereiro de 2015) registrou-se valores de temperatura de 31°C e 32°C, respectivamente, demonstrando o quanto a temperatura da solução nutritiva se eleva nas épocas mais quentes do ano. A temperatura da solução nutritiva circulante é um fator bastante importante e que influencia diretamente no aparecimento de problemas causados por espécies de *Pythium*. Isso ocorre em virtude da sensibilidade das plantas às elevadas temperaturas que ocorrem nas épocas mais quentes do ano e à alta adaptação de *Pythium* spp. nos sistemas hidropônicos, tornando as plantas bastante suscetíveis ao ataque destes patógenos (Sutton *et al.* 2006, Baptista *et al.* 2011).

Fatores como o pH e a condutividade podem também influenciar a ocorrência de podridão radicular, onde alterações bruscas nos valores de pH e de condutividade do meio nutritivo podem alterar a fisiologia das plantas (Beltrão *et al.* 1997), consequentemente causando estresse e aumentando a suscetibilidade das plantas à podridão radicular por *Pythium* spp. (Sutton *et al.* 2006) Além disso, alguns elementos não se dissolvem na solução e se precipitam se o pH não estiver em níveis adequados, sendo a faixa considerada ideal para a maioria das plantas entre 5,5 – 6,5 (Hidrogood 2015). O valor de pH médio registrado nas propriedades visitadas foi de 6,31 se enquadrando dentro da faixa considerada ideal.

Juntamente com a condutividade, a oxigenação da solução nutritiva também é um fator importante para a produção hidropônica. Quanto mais oxigenada a solução, melhor a absorção de nutrientes pelas plantas. Deve-se ressaltar que nas épocas mais quentes, a perda de oxigênio da

solução nutritiva para a atmosfera aumenta por meio da evaporação, devendo o produtor adotar técnicas que favoreçam a oxigenação da solução, como por exemplo, a utilização de sistemas borbulhadores.

Em relação a condutividade elétrica da solução nutritiva, esta expressa de forma indireta o teor de nutrientes presentes na solução. Isso se deve ao fato de a solução nutritiva ser composta em grande parte por elementos metálicos tornando-se assim capaz de conduzir corrente elétrica. Nesse sentido, quanto maior a concentração de substâncias, maior será a capacidade da solução nutritiva de conduzir corrente elétrica (Filgueiras *et al.* 2002). As medidas ideais de condutividade da solução devem estar na faixa de 1,5 a 3,5 $\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$, que corresponde a 1.000 a 1.500 ppm de concentração total de íons na solução. Valores acima desta faixa são prejudiciais à planta, podendo cessar o crescimento e até mesmo causar a morte das plantas, devido ao excesso de nutrientes. Por outro lado, valores inferiores a esta faixa indicam a deficiência de algum elemento (Filgueiras *et al.* 2002, Hidrogood 2015, Tudo Hidroponia 2015). Os registros de condutividade obtidos neste estudo estão, em média, dentro da faixa ideal considerada, apesar de em algumas propriedades terem sido registrados valores bastante inferiores. Vale ressaltar que cada cultura apresenta uma demanda por valores de condutividade diferentes, devendo o produtor se atentar a este fato.

2. Caracterização das propriedades visitadas

Das 30 propriedades visitadas, foi possível realizar o questionário em 28 delas, uma vez que em duas os produtores não estavam presentes.

Quando questionados sobre a diversidade de culturas produzidas (Figura 3), pôde-se constatar que as culturas mais produzidas nas propriedades visitadas são a alface (*Lactuca sativa* L.) (diversos cultivares), a rúcula (*Eruca sativa* L.) e o agrião (*Lepidium sativum* L.). De acordo com o relato dos produtores, essas hortaliças são as mais procuradas e vendidas para o consumidor, além de serem mais facilmente produzidas. Entretanto, outras culturas não muito comuns, como a catalonha (*Chichorium intybus* L.), salsão (*Apium graveolens* L.), almeirão (*Cichorium intybus* L.),

mostarda (*Brassica juncea* (L.) Coss.), salsa (*Petroselinum crispum* (Mill.) Nym.), coentro (*Coriandrum sativum* L.) e espinafre (*Spinacia oleracea* L.) também estão sendo produzidas e comercializadas em menor escala no estado de São Paulo.

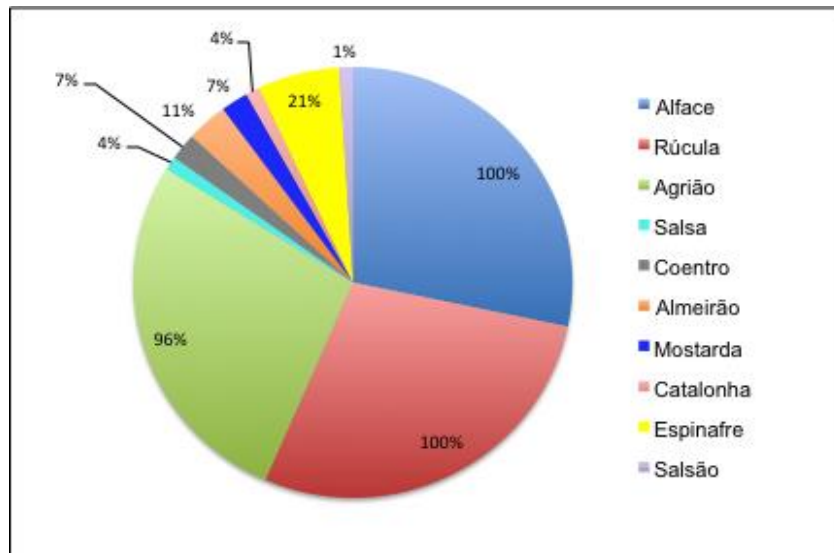


Figura 3. Porcentagem de propriedades em que cada cultura hidropônica é produzida

Em relação ao abastecimento dos sistemas hidropônicos, pôde-se constatar que todos os produtores visitados utilizam água proveniente de poços artesianos e/ou semi-artesianos de suas propriedades. A diferença entre estes dois tipos de poços se refere basicamente a sua profundidade, sendo os poços artesianos mais profundos quando comparados aos semi-artesianos. Apesar de ser uma água de boa qualidade, como já relatado por alguns autores (Lopes *et al.* 2005, Lopes *et al.* 2015, Stanghellini & Rasmussem 1994), alguns produtores ainda fazem algum tratamento na água após a retirada do poço e antes de ser utilizada para abastecimento do sistema (Figura 4), além da análise microbiológica. Em três das propriedades visitadas, os produtores utilizam um filtro (marca Dileka do Brasil) na tentativa de barrar possíveis patógenos, incluindo *Pythium s. l.*

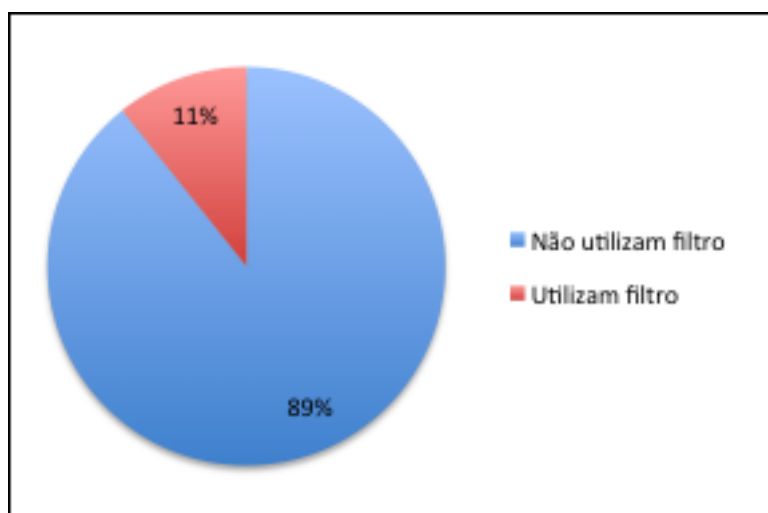


Figura 4. Porcentagem de produtores que filtram a água proveniente dos poços artesianos antes de abastecer o sistema hidropônico

Devido a importância das espécies de *Pythium* na produção hidropônica, pôde-se constatar que quando questionados se conheciam ou já tinham ouvido falar sobre o fitopatógeno *Pythium s. l.*, todos os produtores responderam “sim”. Além disso, 96% dos produtores visitados já tiveram algum problema na produção causado por *Pythium* spp. resultando em perdas econômicas significativas (Figura 5a). Quando questionados sobre a época em que os ataques são mais recorrentes, 93% dos produtores relataram ser no verão (Figura 5b).

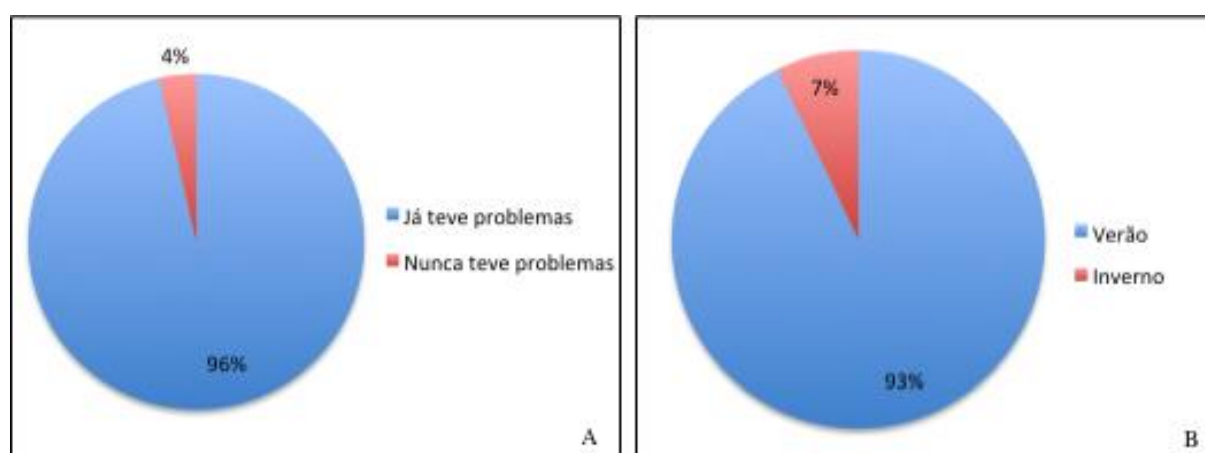


Figura 5. (a) Porcentagem de produtores que já tiveram algum problema com *Pythium* na produção e (b) Porcentagem de produtores que tiveram problemas com *Pythium* no verão ou inverno

Quando questionados sobre as medidas de higiene utilizadas durante o processo de produção para evitar a contaminação por *Pythium* spp. e outros patógenos, com exceção de um produtor,

todos os outros afirmaram fazer a lavagem dos tanques de solução nutritiva e tubulações do sistema após cada ciclo de produção.

A utilização de produtos de controle biológico e controle químico durante o processo produtivo também foi questionada (Figura 6). Dos produtores visitados, 57% afirmaram utilizar produtos de controle biológico e químico em conjunto durante a produção, seja em aplicação foliar ou misturados na solução nutritiva circulante. Por outro lado, 25% afirmaram utilizar somente produtos de controle biológico, enquanto 18% afirmaram fazer o uso somente de produtos de controle químico.

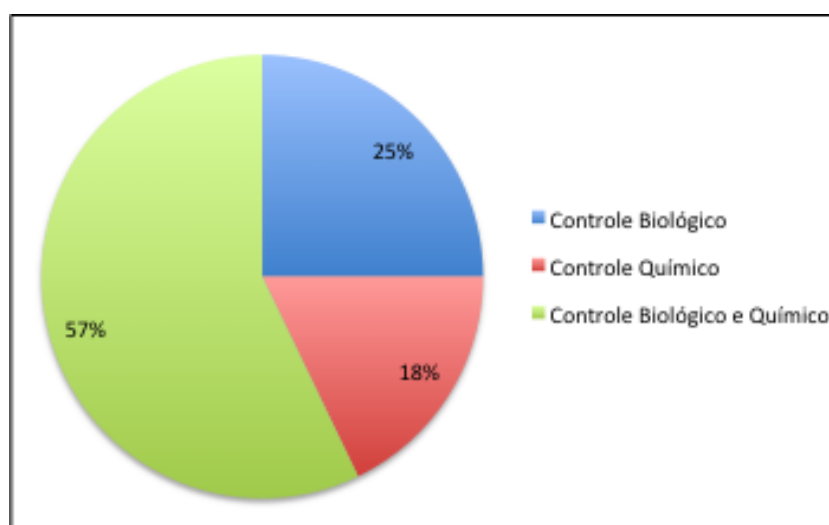


Figura 6. Porcentagem de produtores que afirmaram utilizar produtos de controle biológico, controle químico ou os dois durante a produção

Diversos produtos foram citados pelos produtores (Tabela 3) e dentre os produtos biológicos os mais utilizados são o Compost-Aid e SoilSet, ambos fabricados pela empresa Altech Crop Science. De acordo com as especificações da empresa, o Compost-Aid é um aditivo resultante da mistura de enzimas e bactérias que aceleram o processo de compostagem sólida e líquida, transformando o esterco e restos vegetais em biomassa natural enriquecida, melhorando o equilíbrio da rizosfera e conferindo maior sanidade ao sistema radicular das hortaliças. Já o SoilSet é um fertilizante foliar que melhora a sanidade das plantas a partir de nutrientes balanceados complexados por aminoácidos. Além destes produtos, outros como Ecotrich, fungicida biológico a

base de *Trichoderma harzianum*, TeknarHP a base de *Bacillus thuringiensis*, Metanat CE a base de *Metarhizium anisopliae* e Rotenat CE, inseticida a base de extrato de *Derris* sp., também foram citados pelos produtores.

Tabela 3. Produtos químicos e biológicos utilizados na produção hidropônica nas propriedades visitadas

Produto	Classe	Ação	Empresa
Amstar WG	Químico	Fungicida	Syngenta
Rahman	Químico	Fungicida	FMC
Revus	Químico	Fungicida	Syngenta
Censor	Químico	Fungicida	Bayer
Ecotrich	Biológico	Fungicida	Ballagro AgroTecnologia
Rotenat CE	Biológico	Inseticida	Natural Rural
Metanat CE	Biológico	Inseticida	Natural Rural
Teknar HP	Biológico	Inseticida	Syngenta
CompostAid	Biológico	Acelerar processo de compostagem	Altech Crop Science
SoilSet	Biológico	Fertilizante	Altech Crop Science

Entre os produtos químicos utilizados pelos produtores, deve-se ressaltar que nenhum deles possui registro para utilização no controle de *Pythium s. l.* em sistemas hidropônicos. Entretanto, alguns como Rahman (FMC) e Revus (Syngenta) são registrados para o uso no controle da requeima da batata e tomate causada por espécies de *Phytophthora*, gênero filogeneticamente próximo a *Pythium*, o que faz com que muitos produtores façam a aplicação foliar de ambos. Outros produtos como Amistar WG e Censor direcionados ao controle de outros fungos como *Alternaria* sp. e *Colletotrichum* sp., também foram citados pelos produtores (FMC Agrícola 2015, Syngenta 2015, Bayer 2015).

3. Isolados obtidos e ocorrência de *Pythium s. l.* nas amostras coletadas

3.1. Isolados obtidos e espécimes identificados

Considerando os dados de presença e ausência de *Pythium s. l.* em cada placa de petri em cada amostra, o número inicial de isolados obtidos foi de 244. Destes, dois espécimes de *Pythium s.l.* foram isolados de amostras de poço artesiano/semi-artesiano, oito de amostras de substrato, 108

de solução nutritiva e 126 de raízes. Na Tabela 4 é apresentado o número total de isolados obtidos de cada tipo de amostra coletada, bem como o número total inicial de isolados obtidos em cada propriedade.

Tabela 4. Propriedades visitadas, hortaliças coletadas, dados de presença ou ausência de *Pythium s. l.* em cada amostra e número de isolados obtidos

Propriedade	Cidade	Hortaliça coletada	Presença de <i>Pythium</i> spp.				Nº de isolados
			Poço artesiano	Sol. nutritiva	Substrato	Raiz	
1	Embu-Guaçu	Alface crespa/rúcula	-	+	+	+	13
2	Embu-Guaçu	Alf. crespa/agrião/catalonha	-	+	+	+	16
3	Embu-Guaçu	Agrião/coentro	-	+	+	+	13
4	Embu-Guaçu	Rúcula/espinafre japonês	-	+	+	+	13
5	Embu das Artes	Alface americana	-	+	-	+	6
6	Itapeç. da Serra	Alface crespa	-	+	-	+	6
7	Itapeç. da Serra	Alface roxa	-	+	-	+	6
8	Itapeç. da Serra	Almeirão/rúcula	+	+	-	+	13
9	Itapeç. da Serra	Alface crespa/esp. japonês	-	+	-	+	12
10	Itapeç. da Serra	Agrião/Chicoria	-	+	-	+	12
11	Itapeç. da Serra	Alface lisa	-	-	-	+	3
12	Itapeç. da Serra	Alface crespa/rúcula	-	+	+	+	13
13	Itapeç. da Serra	Agrião	-	-	-	+	3
14	Mogi das Cruzes	Alface crespa	-	+	-	+	6
15	Mogi das Cruzes	Rúcula	-	-	+	+	4
16	Mogi das Cruzes	Alface crespa	-	+	-	+	6
17	Salesópolis	Alface crespa	-	+	-	+	6
18	Salesópolis	Salsão	-	+	-	+	6
19	Salesópolis	Coentro/mostarda	+	-	-	+	7
20	Biritiba-Mirim	Alface mimosa	-	-	-	+	3
21	Vargem G. Paulista	Alface crespa/rúcula	-	+	-	+	12
22	Vargem G. Paulista	Alface crespa	-	+	-	+	6
23	Cotia	Rúcula	-	+	+	+	7
24	Cotia	Alface crespa	-	+	-	+	6
25	Vargem G. Paulista	Alface crespa/agrião/rúcula	-	+	+	+	19
26	Ibiúna	Alface crespa	-	+	-	+	6
27	Ibiúna	Alface crespa	-	+	-	+	6
28	São Roque	Alface crespa	-	-	-	+	3
29	São Roque	Rúcula	-	+	-	+	6
30	São Roque	Agrião	-	+	-	+	6
TOTAL			2	108	8	126	244

Após a triagem e observação de todos os isolados em microscópio ótico, foram selecionados 46 espécimes para prosseguir os estudos morfológicos e moleculares. Isso foi feito principalmente devido ao fato de a maioria dos isolados obtidos serem morfolologicamente similares, uma vez que muitos não apresentaram estruturas sexuadas de reprodução, dificultando assim a identificação morfológica. Dessa forma, optou-se em selecionar aqueles isolados que apresentassem estruturas sexuadas e zoosporângios de diferentes formas no momento da observação.

Após os estudos morfológicos e moleculares dos isolados selecionados, oito táxons foram identificados em nível específico (Tabela 5), sendo seis espécies pertencentes ao gênero *Pythium* (*P. kashmirens*, *P. middletonii*, *P. oopapillum*, *P. periplocum*, *P. segnitium* e *Pythium* sp.1), duas espécies pertencentes ao gênero *Phytopythium* (*P. helicoides* e *P. vexans*) e 29 espécimes de *Pythium* identificados como pertencentes ao “grupo F” de acordo com Plaats-Niterink (1981).

Tabela 5. Táxons e número de espécimes obtidos nas diferentes amostras coletadas em sistemas hidropônicos

Táxon	Número de espécimes
<i>Pythium kashmirens</i>	1
<i>Pythium middletonii</i>	1
<i>Pythium oopapillum</i>	9
<i>Pythium periplocum</i>	1
<i>Pythium segnitium</i>	1
<i>Pythium</i> sp.1	1
<i>Pythium</i> do grupo F	29
<i>Phytopythium helicoides</i>	3
<i>Phytopythium vexans</i>	1
Total	47

Dos espécimes identificados, com exceção de *P. middletonii* e *Phytopythium helicoides*, todas as outras espécies são relatadas pela primeira vez em sistemas hidropônicos no Brasil. Além disso, *P. kashmirens*, *P. oopapillum* e *P. segnitium* são primeiras citações para a América do Sul.

Como pode ser observado na Tabela 5, a maioria dos espécimes de *Pythium* s. l. obtidos foram identificados morfolologicamente como pertencentes ao “grupo F”, de acordo com Plaats-

Niterink (1981), uma vez que apresentaram somente estruturas assexuadas de reprodução, especialmente zoosporângios do tipo filamentoso não inflado. A predominância de isolados que não produzem estruturas sexuadas em sistemas hidropônicos, especialmente aquelas do “grupo F”, é relatada em diversos outros estudos (Teixeira-Yañez 2000, Gull *et al.* 2004, Teixeira *et al.* 2006, Herrero *et al.* 2003). Mesmo com as análises moleculares das regiões ITS rDNA e COI mDNA, não foi possível a identificação em nível específico destes espécimes, uma vez que estes se agrupam em um complexo de espécies dentro do Clado B (Lévesque & de Cock 2004), juntamente com *Pythium dissotocum*, *P. diclinum*, *P. marinum*, *P. coloratum* e *P. lutarium*.

3.2. Ocorrência de *Pythium s. l.* nas amostras coletadas

Das 30 amostras coletadas de água de poço artesiano/semi-artesiano, somente em duas delas foi possível obter isolados de *Pythium s. l.*, sendo estes dois espécimes identificados como “*Pythium* do grupo F” (Tabela 4). Alguns autores como Lopes *et al.* (2005), Lopes *et al.* (2015) e Stanghellini & Rasmussen (1994) relatam em seus estudos que os produtores hidropônicos devem dar preferência a utilização de água de poço artesiano/semi-artesiano para abastecimento dos sistemas quando comparada a água de córregos, rios e riachos, uma vez que esta abriga uma menor diversidade de microorganismos. Apesar disso, estes autores ainda recomendam a análise química e microbiológica da água de poço artesiano/semi-artesiano antes de se iniciar a produção, no sentido de os produtores se certificarem quanto a qualidade da água que será utilizada na sua propriedade. Sendo assim, ficou evidenciado que nas propriedades visitadas os produtores podem dar preferência a utilização de água de poço artesiano/semi-artesiano, uma vez que somente em duas propriedades foi possível isolar *Pythium s. l.*. Entretanto, periodicamente, devem proceder a análise química e microbiológica da água a ser utilizada.

Em duas propriedades visitadas, os produtores utilizam um filtro (marca Dileka do Brasil) na tentativa de barrar patógenos oriundos da água de poço artesiano/semi-artesiano, antes de abastecer o sistema. Após a análise da água de poço, antes de passar pelo filtro e depois de filtrada,

foi observado a ausência de espécies de *Pythium s. l.* em ambas as etapas. No entanto, ambos os produtores que utilizam este filtro relatam uma diminuição no número de insetos, especialmente moscas, nas estufas hidropônicas.

Das seis marcas de substratos coletadas nas diferentes propriedades (Carolina padrão, Fort Fibra Substratos, Golden Mix, Multiplant, Plant Mix e Vida Verde Substratos), em três marcas (Fort Fibra Substratos, Vida Verde Substratos e Plant Mix) foi possível isolar espécimes de *Pythium s. l.*. Dentre as marcas contaminadas, nas amostras analisadas da marca Fort Fibra foi possível isolar quatro espécies diferentes (*Pythium middletonii*, *P. periplocum*, *Phytopythium helicoides* e *P. vexans*) enquanto *Pythium* sp.1 foi isolado de amostra da marca Plant Mix e *Pythium segnitium* isolado de amostra da marca Vida Verde. De uma forma geral, os substratos utilizados em sistemas hidropônicos podem ser de diferentes origens (Miranda *et al.* 2011), sendo que nas propriedades visitadas pôde-se perceber uma predominância de substratos a base de fibra de coco. Independentemente da origem da matéria prima utilizada no preparo dos substratos, para evitar a contaminação, as empresas fabricantes devem se atentar e adotar métodos de esterilização a alta temperatura destes materiais, no sentido de eliminar possíveis inóculos de *Pythium s. l.* e outros microorganismos que possam estar presentes. Além disso, durante todo o processo produtivo, como preparo das embalagens e transporte, normas e procedimentos para evitar contaminação devem ser adotadas. Uma vez nas propriedades, os produtores também devem se atentar quanto a estocagem e manuseio destes substratos. Os substratos devem ser mantidos em locais secos e sempre armazenados dentro das embalagens; deve-se evitar deixar em contato direto com o chão, e principalmente com o solo. Quando no manuseio dos substratos, os produtores devem sempre se atentar as medidas de higiene básicas como a lavagem das mãos e de ferramentas, tanto antes quanto depois do manuseio. Apesar de serem medidas básicas, estas podem favorecer a não contaminação dos substratos.

Das amostras de solução nutritiva e raízes de hortaliças coletadas, pôde-se observar que em 24 das 30 propriedades coletadas, foi possível isolar espécimes de *Pythium s. l.* de amostras de

solução nutritiva enquanto em todas as propriedades foi possível isolar espécimes das raízes das hortaliças. Deve-se ressaltar que quanto as hortaliças coletadas, com exceção de uma propriedade onde foi coletada amostras de coentro sintomáticas, todas as outras hortaliças coletadas não apresentavam sintomas de doença. Apesar das plantas não apresentarem sintomas, segundo Utkhede *et al.* (2000), as espécies de *Pythium s. l.*, iniciam a infecção das raízes de cultivos hidropônicos através de uma fase denominada biotrófica, onde as plantas não desenvolvem sintomas, entretanto ainda assim ocorre uma redução na produção. Dentre as espécies de *Pythium*, *P. dissotocum* é relatada como uma das mais agressivas, causando prejuízos superiores a 50 % na produção, mesmo na ausência de sintomas de podridão radicular (Baptista 2007, Stanguelini & Kronland 1986). Depois da fase biotrófica, ocorre a fase conhecida como necrotrófica, onde as raízes se tornam escuras e os sintomas na parte aérea como subdesenvolvimento, murchamento e diminuição da área foliar, se tornam evidentes (Zheng *et al.* 2000).

Diversos são os fatores que podem estar favorecendo a entrada de *Pythium s. l.* nos sistemas hidropônicos estudados. Primeiramente, apesar de terem sido isolados somente dois espécimes de *Pythium s. l.* das 30 amostras de água de poço artesiano analisadas, ainda assim, a água utilizada para abastecimento pode estar servindo como fonte introdutória de patógeno no sistema, mesmo que em pequenas quantidades. Já em relação aos substratos analisados, estes podem estar atuando como uma grande fonte de contaminação dos sistemas hidropônicos uma vez que as mudas produzidas através destes substratos são levadas para dentro dos sistemas ficando em contato direto com a solução nutritiva circulante. Apesar disso, as espécies de *Pythium s. l.* isoladas de substratos, não foram encontradas nas amostras de raízes e solução nutritiva.

Em algumas propriedades visitadas pôde-se observar alguns fatores que também podem estar contribuindo como fonte de introdução de inóculo de *Pythium s. l.* nos sistemas hidropônicos, como tanques de solução nutritiva descobertos e ao nível do solo, substratos armazenados no chão e fora das embalagens e também falta de higienização dos equipamentos e das estufas por alguns produtores. Como descrito por Lopes *et al.* (2015), algumas técnicas para controle de *Pythium* em

sistemas hidropônicos, desenvolvidas principalmente em países de clima temperado, têm se mostrado bastante promissoras. Dentre estas se destacam o tratamento da solução nutritiva com radiação ultravioleta e o borbulhamento de ozônio na solução nutritiva. Entretanto, ambas as técnicas contribuem para a destruição de quelatos de ferro e conseqüentemente podem causar o desbalanço nutricional da solução. Nesse sentido, o desenvolvimento de cultivares de alface resistentes a *Pythium* spp. tem se mostrado bastante promissor e pode vir a ser no futuro, a solução para o controle de doenças causadas por *Pythium* spp. em produção hidropônica.

4. Descrição morfológica das espécies de *Pythium* s. l. identificadas

REINO STRAMINIPILA

FILO OOMYCOTA

PERONOSPORALES s. l.

PYTHIACEAE

Gênero *Pythium* Pringsheim

Pythium kashmirens B. Paul, FEMS Microbiology Letters 282 (2): 253. 2008.

Fig. 7 A-F

Micélio bem desenvolvido. Zoosporângios filamentosos inflados. Dilatações hifálicas abundantes, de formas variadas, predominantemente esféricas, algumas vezes globosas e irregulares. Zoósporos encistados, 5.0 – 8.0 (av. 7.5) µm diâm. Estruturas sexuais não observadas.

Material examinado: BRASIL, SÃO PAULO, Itapequerica da Serra, isolado de raiz de agrião (*Lepidium sativum* L.), 20/III/2014, Leg. & det. D. R. Gonçalves & C. L. A. Pires-Zottarelli s. n. (CCIBt 4027).

As características da reprodução assexuada do espécime estão de acordo com o descrito por Paul (2008), o que contribuiu para a identificação juntamente com o sequenciamento das regiões ITS rDNA e COI mDNA. Entretanto, o espécime estudado apresentou dilatações hifálicas em

abundância e em diferentes formatos, o que não foi relatado pelo autor da espécie na descrição original. Reprodução sexuada não foi observada.

Pythium middletonii Sparrow F. K. Jr., Aquatic Phycomycetes, exclusive of the Saprolegniaceae and *Pythium*: 1-785. 1943.

Fig. 8 A-F

Talo monóico. Zoosporângios frequentemente obpiriformes, $20,0 - 30,0 \times 15,0 - 27,5$ μm (média $26,5 \times 23,0$ μm), as vezes globosos, raramente com proliferação interna. Zoósporos encistados, $7,5 - 10,0$ μm diâm. (média $9,0$ μm). Oogônios terminais e intercalares, $17,5 - 27,5$ μm diâm (média $23,5$ μm diâm); parede abaulada, algumas vezes com a presença de papilas. Anterídios presentes, monóclinos, díclinos e monóclinos sésseis, 1-4 por oogônio; célula anteridial simples com atracção lateral e apical, as vezes dividida (em projeções). Oósporos pleróticos, alguns appleróticos, $17,5 - 25,0$ μm diâm (média $20,5$ μm diâm), raramente dois por oogônio; parede $1,5 - 2,5$ μm espessura.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Mogi das Cruzes, isolado de substrato (marca FortFibra) utilizado para produção de mudas de cultivos hidropônicos, 10/VII/2014, Leg. & det. D. R. Gonçalves & C. L. A. Pires-Zottarelli s. n. (CCIBt 4126).

O espécime estudado apresentou oogônios e oósporos com tamanho médio de $23,5$ μm diâm e $20,5$ μm diâm, respectivamente, sendo estes valores bastante próximos aos relatados por Sparrow (1943) e Plaats-Niterink (1981). Entretanto, não foi observado no isolado CCIBt 4126 oogônios catenulados, como relatado por Sparrow (1943). Além disso, estes dois autores relatam a presença de anterídios hipóginos, o que também não foi observado no espécime estudado. Apesar disso, todas as outras características morfológicas analisadas juntamente com a análise da região ITS rDNA contribuíram para a identificação em nível específico.

Pythium oopapillum Bala, de Cock & Lévesque, Persoonia 25: 23. 2010.

Fig. 9 A-F

Talo monóico. Zoosporângios filamentosos não inflados. Zoósporos encistados, 5,0 – 10,0 µm diâm (média 7,5 µm diâm). Oogônios terminais e intercalares, 14,5 – 25,0 µm diâm (média 19,5 diâm); parede lisa, algumas vezes com a presença de papilas. Anterídios presentes, 1-4 por oogônio, díclinos, ocasionalmente monóclinos, algumas vezes sésseis; células anteridiaais simples ou clavadas e encurvadas (“crook-necked”), com atracção apical. Oósporos apleróticos, alguns pleróticos, 14,5 – 22,5 µm diâm (média 17,0 µm diâm); parede lisa, ocasionalmente com a presença de papilas, 1,5 – 2,5 µm de espessura.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Mogi das Cruzes, amostra de raiz de alface (*Lactuca. sativa* L.), 10/VII/2014, Leg. & det. D. R. Gonçalves & C. L. A. Pires-Zottarelli s. n. (CCIBt 4098, CCIBt 4149, CCIBt 4150, CCIBt 4151).

Dos espécimes de *P. oopapillum* obtidos neste estudo, somente CCIBt 4098 apresentou estruturas sexuadas de reprodução. Todas as características apresentadas pelo espécime estão de acordo com o descrito por Bala *et al.* (2010b), com exceção da presença de papila na parede do oogônio, observado no isolado CCIBt 4098, característica que não foi mencionada pelo autor na descrição original. Além disso, os autores mencionam a presença de zoosporângios filamentosos levemente inflados, entretanto, nos isolados deste estudo foram observados a presença de zoosporângios filamentosos considerados não inflados.

Pythium periplocum Drechsler, Journal of the Washington Academy of Sciences 20: 405. 1930.

Fig. 10 A-F

Talo monóico. Zoosporângios filamentosos inflados. Zoósporos encistados, 7,5 – 12,5 µm diâm (média 9,3 µm diâm). Oogônios terminais e intercalares, 17,5 – 22,5 µm diâm (média 20,5 µm diâm), ornamentados com espinhos de 1,5 – 3,5 µm comp. (média 2,5 µm comp.) e 1,5 – 3,5 µm diâm. na base (média 2,5 µm diâm). Anterídios presentes, 1-2 por oogônio, díclinos, ocasionalmente monóclinos; células anteridiaais clavadas e tubulares, atracção lateral. Oósporos

apleróticos, alguns pleróticos, 14,5 – 20 µm diâm (média 18,5 µm diâm), raramente dois por oogônio; parede lisa, 1,5 – 2,5 µm de espessura.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Mogi das Cruzes, amostra de substrato (marca FortFibra) utilizado para produção de mudas hidropônicas, 10/VII/2014, Leg. & det D. R. Gonçalves & C. L. A. Pires-Zottarelli s. n. (CCIBt 4095).

De uma forma geral, o isolado CCIBt 4095 apresentou estruturas assexuadas e sexuadas de acordo com o descrito pelo autor da espécie. As únicas diferenças morfológicas observadas no isolado foi o tamanho ligeiramente menor dos oogônios e oósporos quando comparado aos trabalhos de Drechsler (1930) (oogônio: 13,0 – 32,0 µm diâm e oósporo: 11,0 – 27,0 µm diâm), Freezi (1956) (oogônio: 12,0 – 31,0 µm diâm e oósporo: 10,0 – 26,0 µm diâm) e Plaats-Niterink (1981) (oogônio: 19,0 – 29,0 µm diâm e oósporo: 18,0 – 22,0 µm diâm). Além disso, estes autores relatam a presença somente de anterídios díclinos, enquanto no isolado CCIBt 4095 também foi observada a presença de anterídios monóclinos. Tanto na análise da região ITS rDNA quanto da região COI mDNA o isolado se posicionou de forma bastante clara com os demais representantes da espécie disponíveis no GenBank.

Pythium segnitium B. Paul, FEMS Microbiology Letters 217 (2): 210. 2002.

Fig. 11 A-F

Talo monóico. Zoosporângios terminais e intercalares, frequentemente esféricos, 17,5 – 27,5 µm diâm (média 21,5 diâm), alguns subglobosos. Zoósporos encistados, 7,5 – 12,5 µm diâm (média 10,0 diâm). Oogônios intercalares, alguns terminais, as vezes em catenulos de até 4 oogônios, 15,0 – 25,0 µm diâm (média 18,5 µm diâm); parede lisa. Anterídios presentes, monóclinos sésseis, alguns hipóginos; célula anteridial simples com atracção apical. Oósporos pleróticos, alguns appleróticos, 15,0 – 20,0 µm diâm (média 17,5 µm diâm); parede 1,5 – 2,5 µm espessura.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Cotia, amostra de substrato (marca FortFibra) utilizado para produção de mudas hidropônicas, 02/XII/2014, Leg. & det D. R. Gonçalves & C. L. A. Pires-Zottarelli s. n. (CCIBt 4102).

O espécime estudado apresentou estruturas sexuadas em conformidade com o descrito por Paul (2002). Foram observados oogônios catenulados e anterídios monóclinos sésseis e hipóginos, característicos da espécie. As medidas de oogônio e oósporo do espécime estudado foram levemente menores do que as medidas descritas pelo autor (oogônio: 12,0 – 32,0 µm diâm e oósporo: 12,0 – 28,0 µm diâm). Quanto as estruturas assexuadas, foi observado principalmente a presença de zoosporângios esféricos e intercalares, entretanto, no espécime estudado por Paul (2002) não foi observada a presença de zoosporângios, mas somente dilatações hifálicas esféricas. A análise da região ITS rDNA contribuiu para a confirmação da identificação morfológica do isolado.

***Pythium* sp.1**

Fig. 12 A-F

Micélio bem desenvolvido. Zoosporângios filamentosos inflados, na maioria das vezes compartimentalizado nos isolados mais velhos. Presença de estruturas esféricas a globosas (oogônios?), 42,5 – 65,0 (média 60,0 µm) × 25,0 – 42,5 µm (média 27,5 µm) , muitas vezes com espaçamentos no interior, com a formação tardia de estruturas internas (oósporos?) 37,5 – 62,5 (média 50,0 µm), × 25,0 – 42,5 µm (média 25,5 µm), com parede bastante espessa, 4,0 – 5,5 µm diâm (média 5,0 µm diâm). Anterídios não observados.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Vargem Grande Paulista, amostra de substrato (marca PlantMix) utilizado para produção de mudas hidropônicas, 20/IV/2014, D. R. Gonçalves s. n.

O isolado estudado apresentou a formação de zoosporângios filamentosos inflados compartimentalizados com liberação de zoósporos característica do gênero *Pythium*. Entretanto, a

formação de estruturas globosas a esféricas e geralmente compartimentalizadas nos chamou a atenção. Estas estruturas foram identificadas inicialmente como oogônios, uma vez que dentro das mesmas é observada a formação de estruturas com parede espessa. Entretanto, não foi observada a presença de anterídios. Quanto a identificação molecular, a análise da região COI mDNA mostrou um agrupamento do espécime com as espécies de *Pythium periplocum* disponíveis no GenBank. Espécies de *P. periplocum* também possuem zoosporângios filamentosos inflados, porém produzem facilmente oogônios ornamentados, o que não foi observado no isolado estudado. Considerando o exposto, optou-se em deixar o isolado identificado como *Pythium* sp.1.

PERONOSPORACEAE

Gênero *Phytopythium* Abad, de Cock, Bala, Robideau, A.M. Lodhi & Lévesque

Phytopythium helicoides (Drechsler) Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque, Persoonia 34: 37. 2015.

Basiônimo: *Pythium helicoides* Drechsler, Journal of the Washington Academy of Sciences 20: 413. 1930.

Fig. 14 A-F

Talo monóico. Zoosporângios terminais, frequentemente obpiriformes, 27,5 – 42,5 µm (média 35,5 µm) × 17,5 – 32,5 (média 25,5 µm), as vezes esféricos, globosos e subglobosos; proliferação interna presente. Zoósporos encistados 7,5 – 12,5 µm diâm. (média 10,5 µm). Estruturas sexuais não observadas.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Embu Guaçu, amostra de substrato utilizado para produção de mudas hidropônicas, 26/IX/2014, , Leg. & det D. R. Gonçalves & C. L. A. Pires-Zottarelli s. n (CCIBt 4103, GenBank: KR092137)

Os três espécimes de *Phytopythium helicoides* obtidos neste estudo apresentaram somente estruturas assexuadas de reprodução. Quanto aos zoosporângios, foram observados zoosporângios

obpiriformes levemente maiores que os relatados por Plaats-Niterink (1981) ($18,0 - 43,0 \mu\text{m} \times 13,0 - 27,0 \mu\text{m}$). Os três espécimes também apresentaram crescimento micelial aéreo, característico da espécie. Nas análises das regiões ITS rDNA e COI mDNA, os isolados se posicionaram juntamente com outros isolados da espécie disponíveis no GenBank, favorecendo a identificação em nível específico.

Phytophthium vexans (de Bary) Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque, Persoonia 34: 37. 2015.

Basiônimo: *Pythium vexans* de Bary, Journal of the Royal Agricultural Society of England 12: 255. 1876.

Fig. 13 A-F

Talo monóico. Zoosporângios terminais, intercalares, frequentemente esféricos, $15,0 - 27,5 \mu\text{m}$ diâm (média $20,5 \mu\text{m}$ diâm.), alguns globosos e subglobosos. Zoósporos encistados, $7,5 - 12,5 \mu\text{m}$ diâm. (média $9,5 \mu\text{m}$ diâm). Oogônios terminais ou intercalares, $15,0 - 20,0 \mu\text{m}$ diâm. (média $18,0 \mu\text{m}$ diâm); parede lisa. Anterídios presentes, monóclinos, alguns díclinos; célula anteridial em forma de sino (“bell-shaped”), as vezes tubulares, com atracção lateral. Oósporos apleróticos, $12,5 - 17,5 \mu\text{m}$ diâm. (média $16,0 \mu\text{m}$ diâm); parede do oósporo de $1,5 - 2,0 \mu\text{m}$ de espessura.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Itapeperica da Serra, amostra de substrato (marca FortFibra) utilizado para produção de mudas hidropônicas, 23/IX/2014, , Leg. & det D. R. Gonçalves & C. L. A. Pires-Zottarelli *s. n.* (CCIBt 4097, GenBank: KR092142)

O espécime obtido apresentou zoosporângios variando de esféricos a globosos e subglobosos, sendo o mesmo relatado por Freezi (1956) e Plaats-Niterink (1981). Além disso, as medidas de oogônio e oósporo são bastante próximas ao descrito por estes autores. A presença de anterídios monóclinos e de célula anteridial em formato de sino, bastante característico da espécie, foram observadas. A análise da região ITS rDNA e COI mDNA confirmaram a identificação morfológica do espécime.

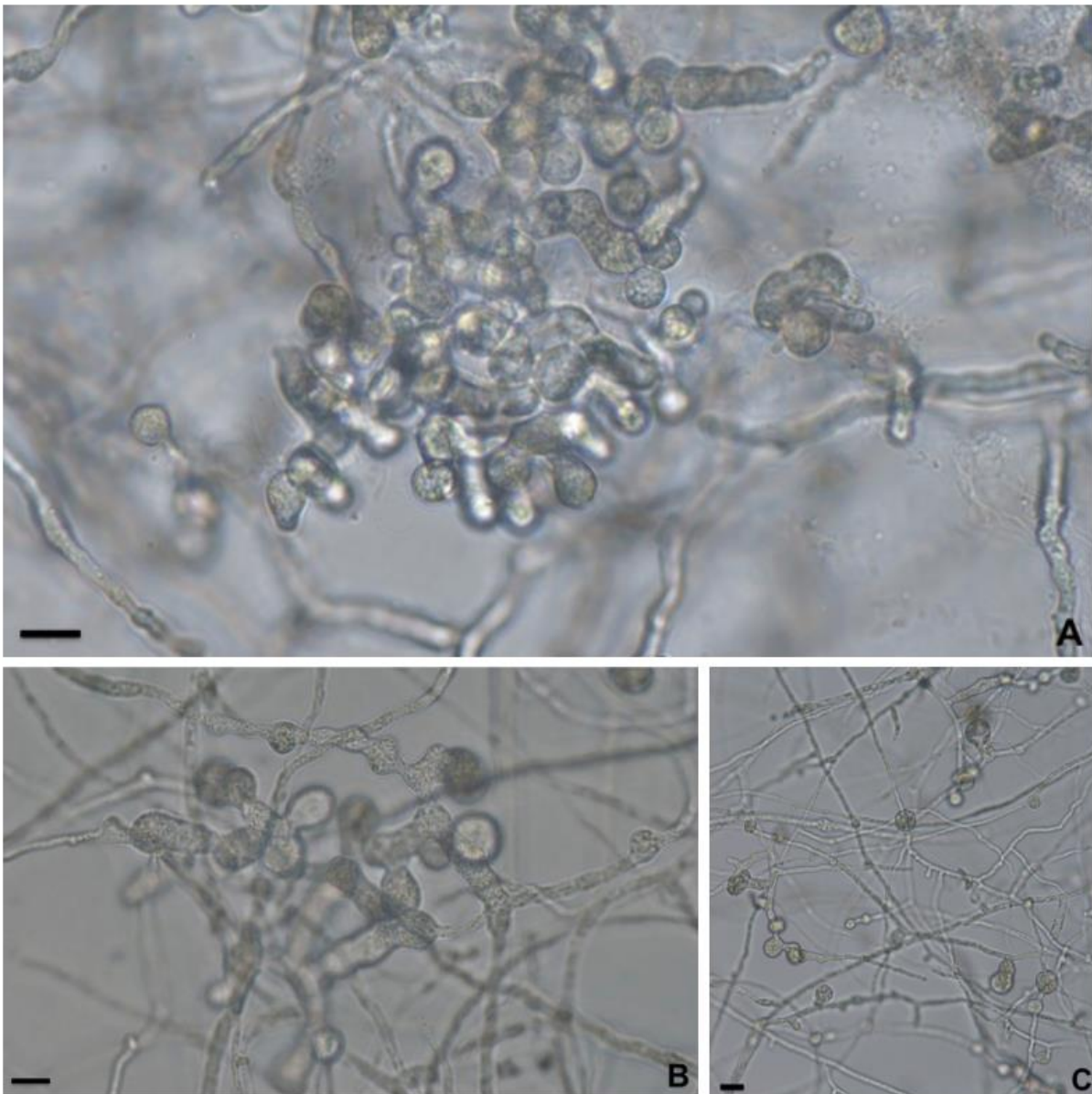


Figura 7. *Pythium kashmirensis*. Zoosporângios filamentosos inflados (A e B) e dilatações hifálicas (C). Barra: 10,0 μm .

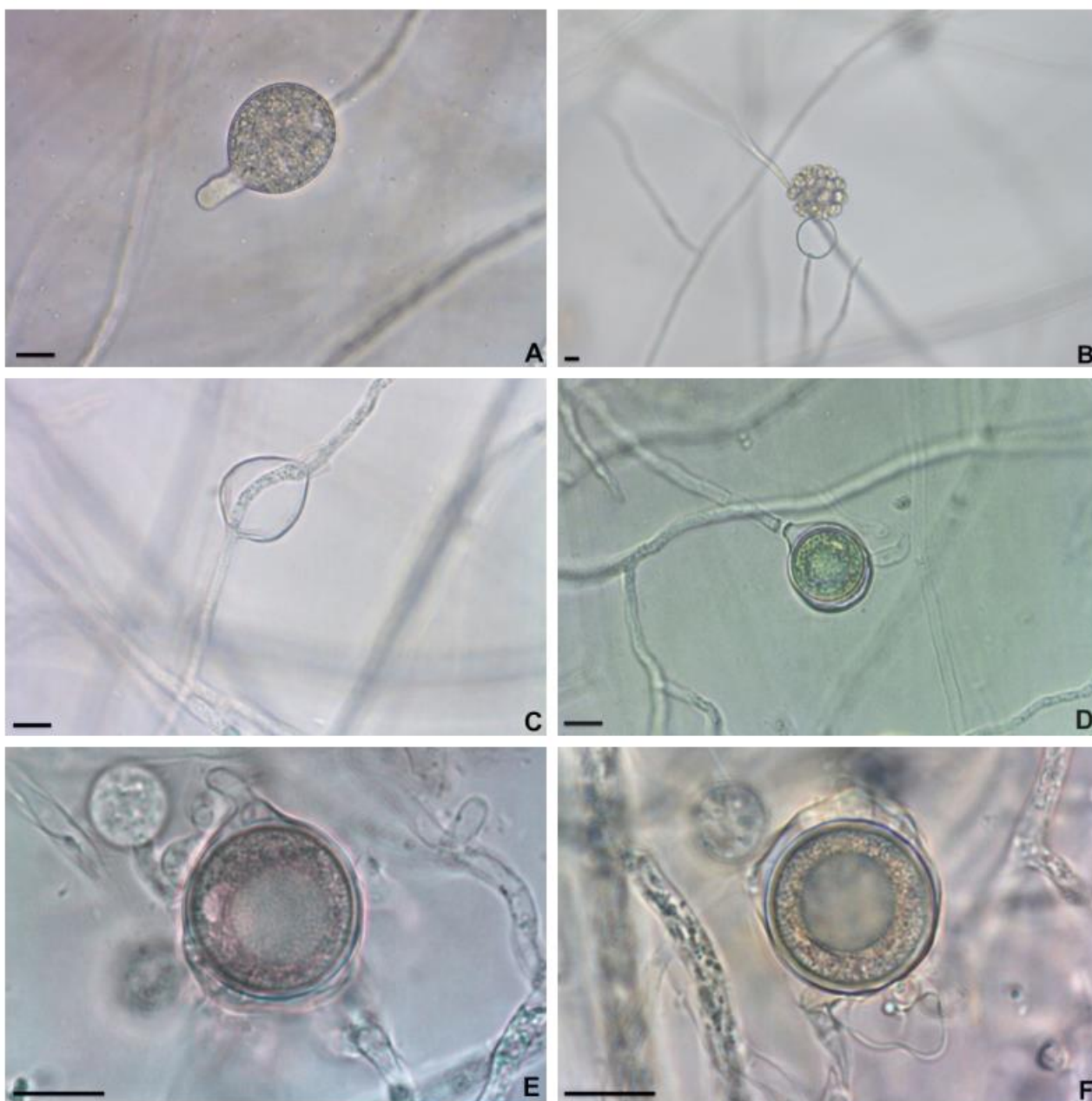


Figura 8. *Pythium middletonii*. Zoosporângio obpiriforme (A); Liberação dos zoósporos (B); proliferação interna do zoosporângio (C); anterídio díclino com célula anteridial com atracação apical (D); oogônios com parede com a presença de papila (E) e abaulada (F). Barra: 10,0 μm .

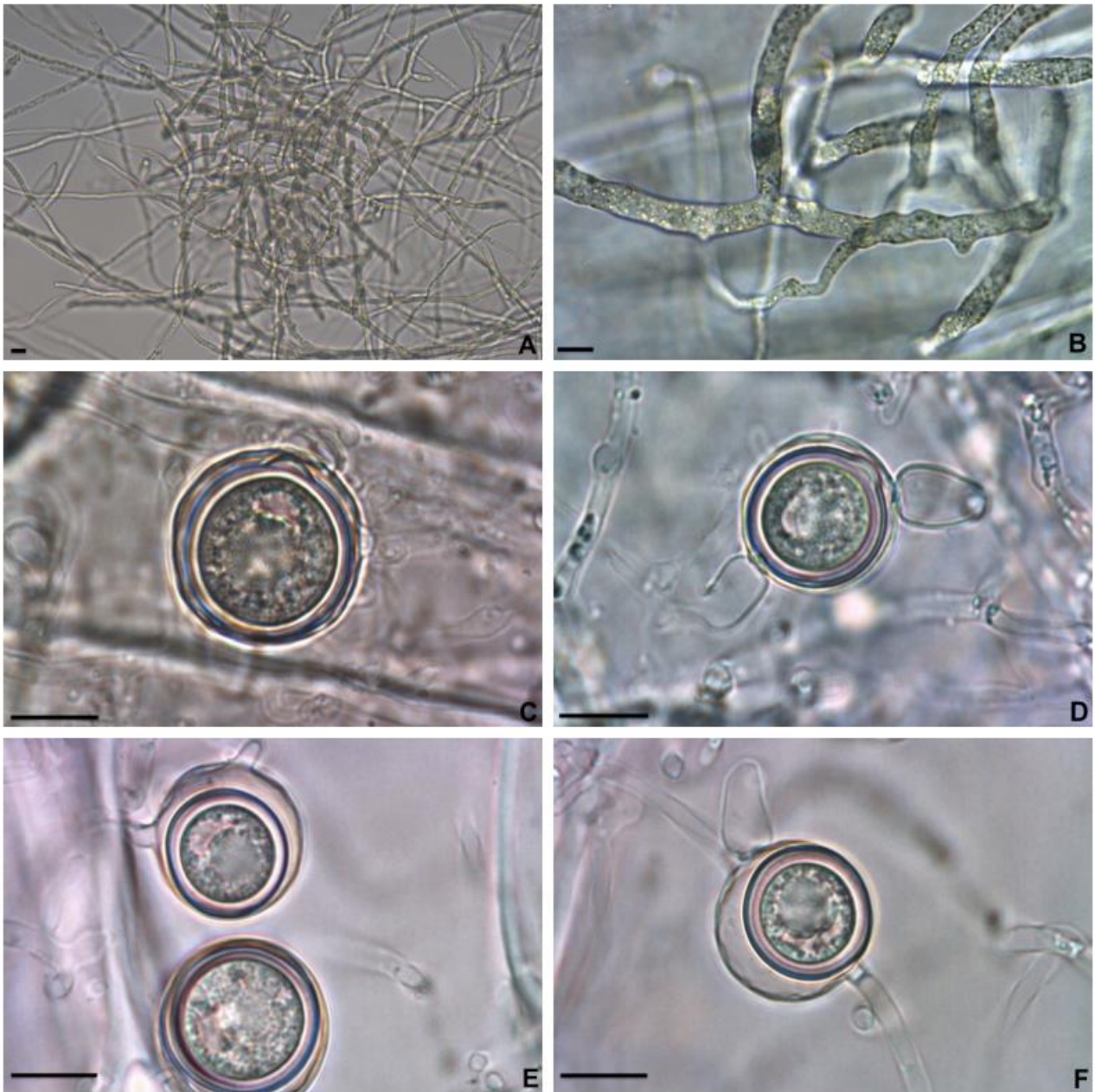


Figura 9. *Pythium oopapillum*. Zoosporângio filamentosso não inflado (A e B); presença de papila na parede do oósporo (C e D); presença de papila na parede do oogônio (E); oósporo applerótico e anterídio com atracação apical (F). Barra: 10,0 μm .

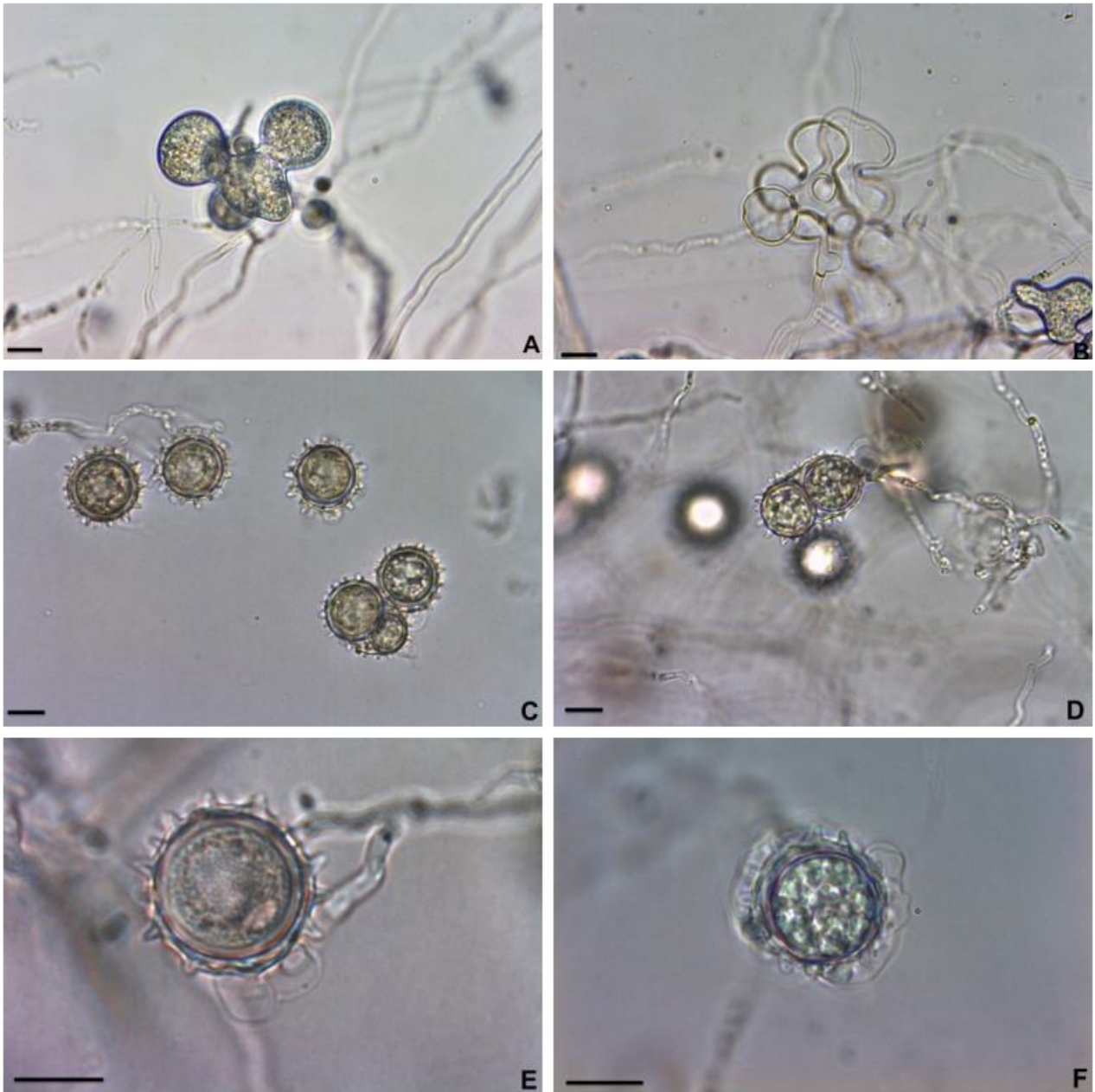


Figura 10. *Pythium periplocum*. Zoosporângio filamentosso inflado antes da liberação dos zoósporos (A) e após liberação (B); oogônios ornamentados com espinhos (C); presença de dois oósporos em um mesmo oogônio (D); anterídio monóclino (E), célula anteridial com atração lateral (F). Barra: 10,0 μm .

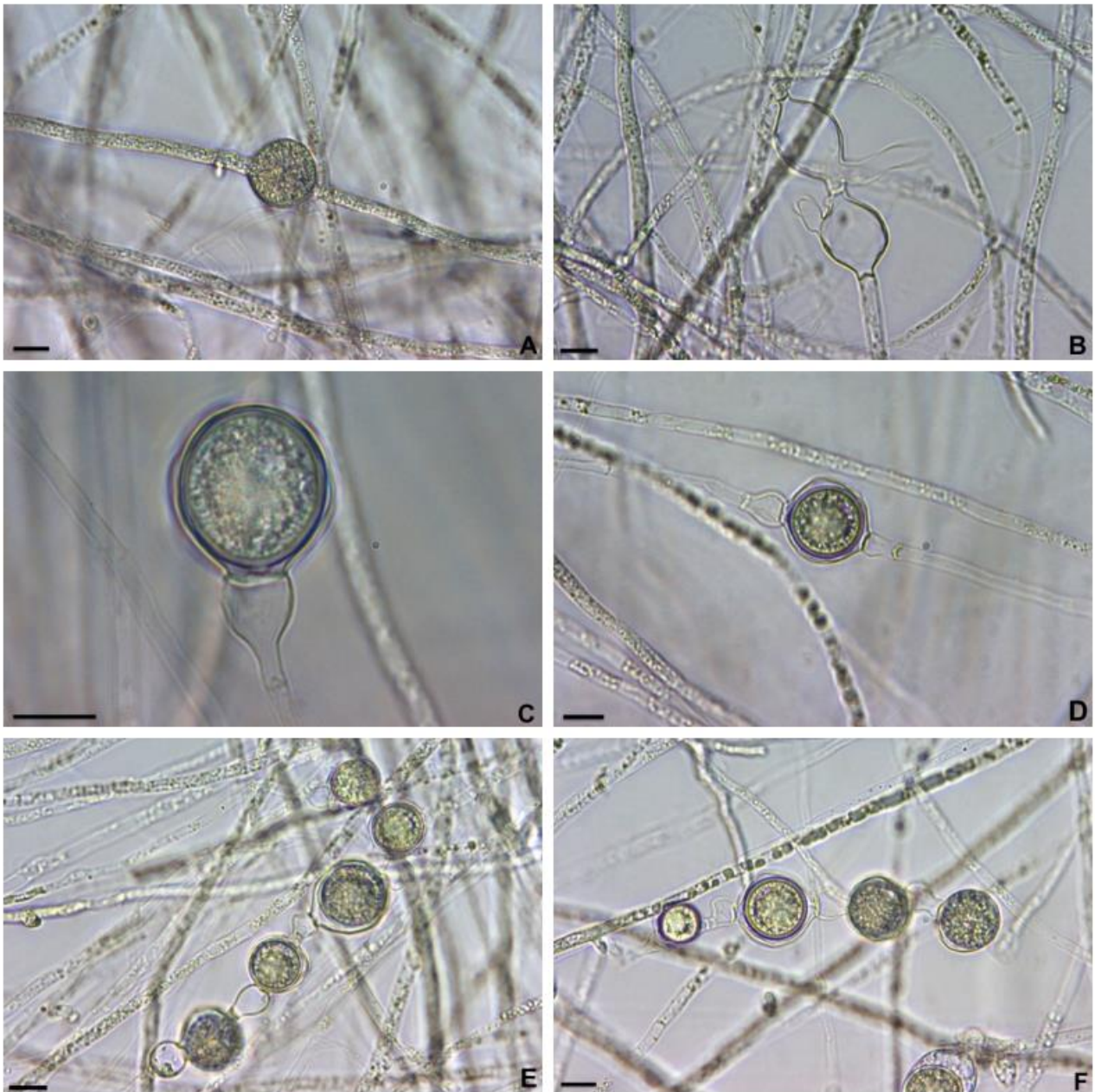


Figura 11. *Pythium segnitium*. Zoosporângio esférico intercalar antes da liberação dos zoósporos (A) e após liberação, com a presença dos tubos de liberação (B); oogônio com anterídio hipógino (C); oogônio intercarlar e anterídios monóclinos sésseis (D); oogônios catenulados contendo oósporos (E) e (F). Barra: 10,0 μm .

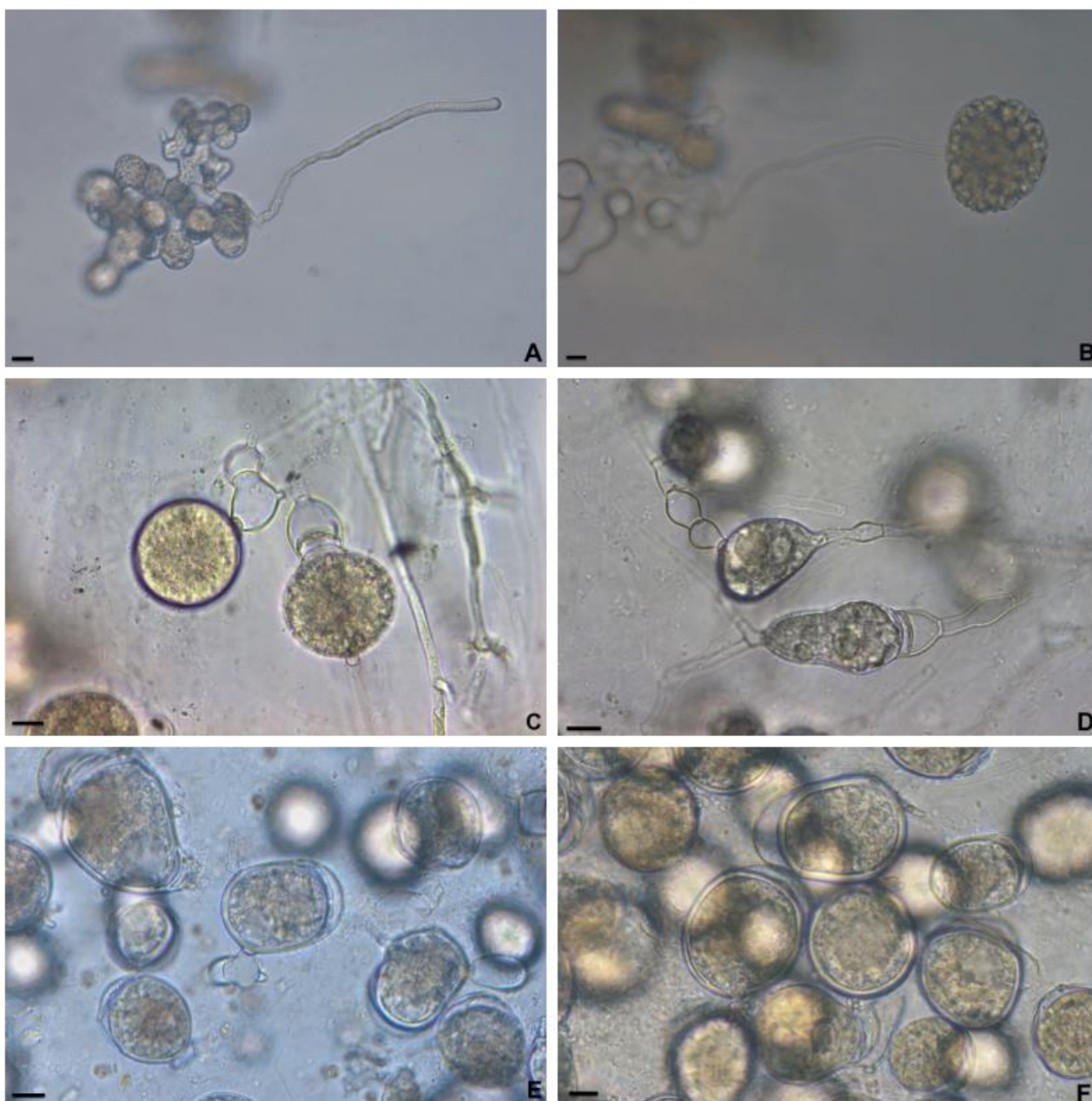


Figura 12. *Pythium* sp.1. Zoosporângio filamentosso inflado com a formação do tubo de liberação (A); maturação dos zoósporos dentro da vesícula (B); presença de estruturas compartimentalizadas (C e D); oogônios (?) irregulares com a presença de espaçamentos no interior e oósporos (?) com parede bastante espessa (E e F). Barra: 10,0 μm .

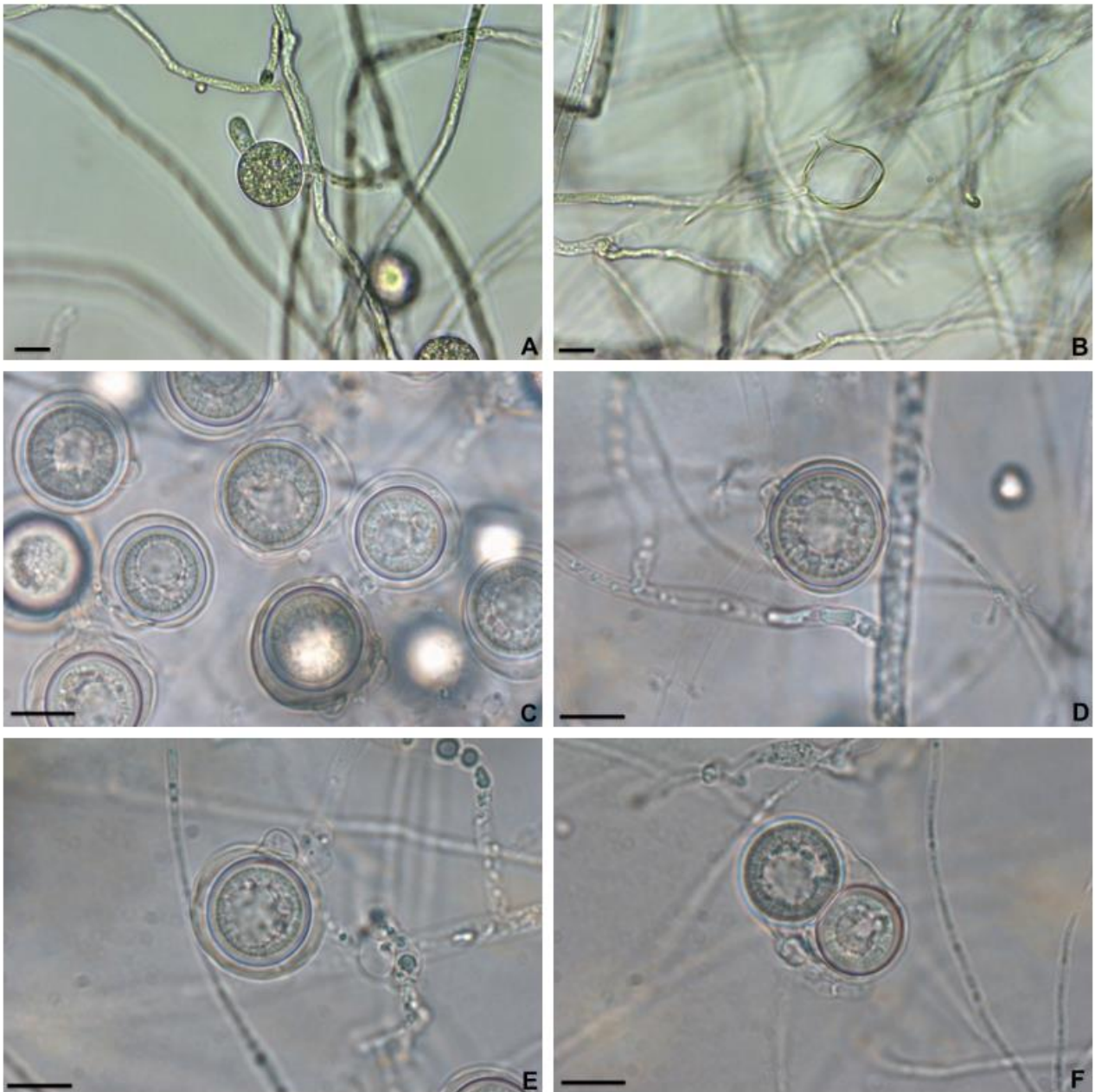


Figura 13. *Phytophthium vexans*. Zoosporângio esférico com início da formação do tubo de liberação (A); zoosporângio vazio após liberação dos zoósporos (B); oogônios com a presença de oósporos apleróticos (C); oogônio intercalar (D); célula anteridial do tipo “bell-shaped” (E); presença de dois oósporos por oogônio (F). Barra: 10,0 µm.

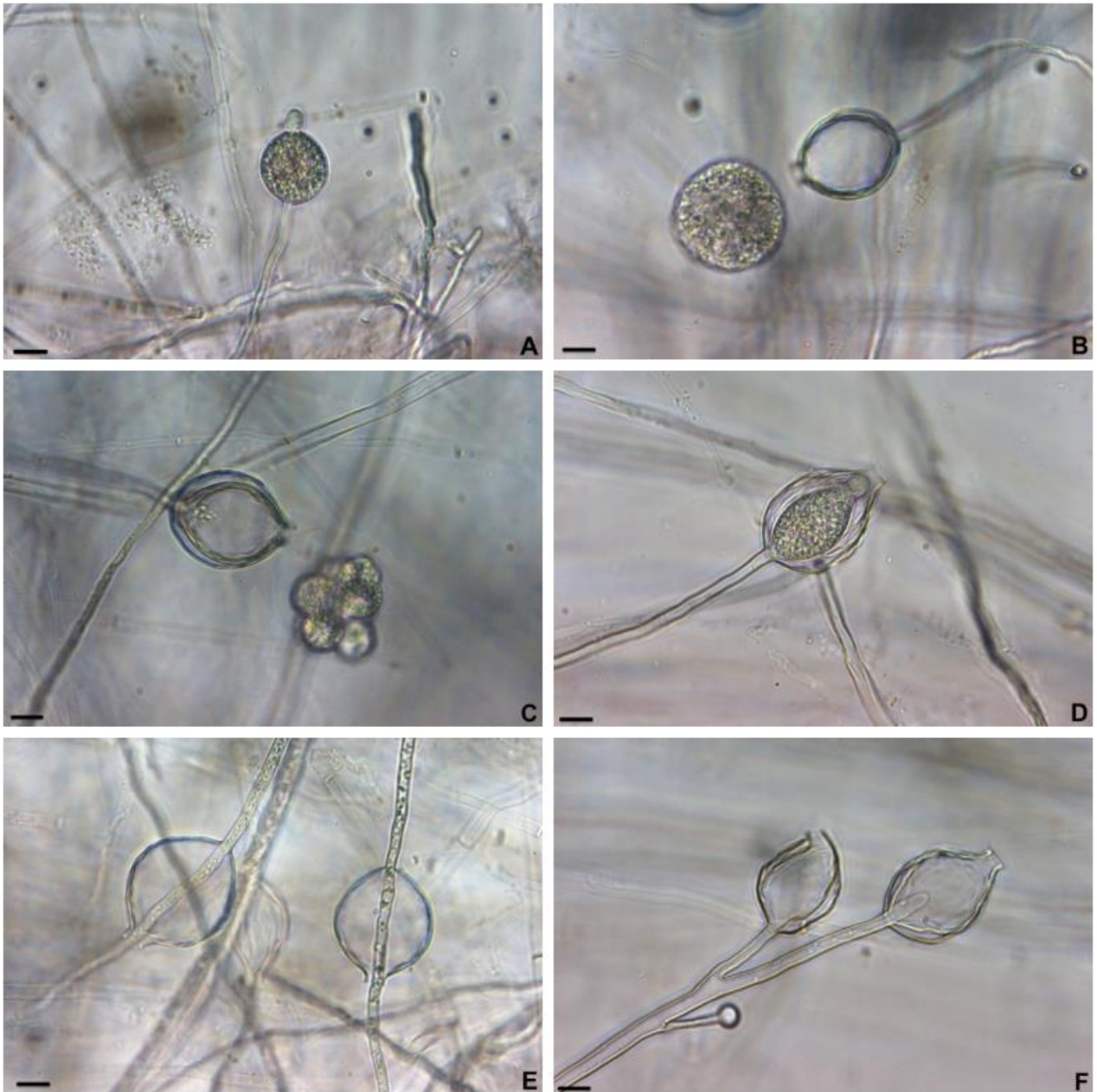


Figura 14. *Phytopythium helicoides*. Zoosporângio obpiriforme com início da formação do tubo de liberação (A); maturação dos zoósporos dentro da vesícula (B e C); zoosporângios com proliferação interna (D e E) e zoosporângios vazios após liberação (F). Barra: 10,0 μm .

5. Análises filogenéticas das regiões ITS rDNA e COI mDNA de *Pythium s. l.*

Foram obtidas 168 sequências das duas regiões gênicas estudadas (90 sequências de ITS rDNA e 78 de COI mDNA) dos 46 isolados selecionados para os estudos morfológicos e moleculares (Tabela 6). Nos casos em que a análise da região ITS rDNA forneceu resultados diferentes daqueles da região COI mDNA, a região ITS rDNA foi considerada, uma vez que esta ainda fornece uma maior variação interespecífica (Robideau *et al.* 2011) quando comparada a região COI mDNA, apesar desta última ser mais fácil de se trabalhar em relação ao sequenciamento, edição e alinhamento.

As sequências gênicas dos isolados estão sendo depositadas no GenBank a medida que os artigos são redigidos e enviados para publicação. De todos os isolados sequenciados, somente não foi possível obter sequências da região ITS de dois isolados, enquanto da região COI não foi possível obter sequências de dez isolados.

Tabela 6. Procedência dos isolados obtidos e respectivas regiões gênicas sequenciadas. CCIBt: Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica.

Isolado	Local de coleta	Amostra	CCIBt	Táxon	Região Sequenciada	
					ITS	COI
2D	Embu-Guaçu	Raiz/Rúcula		<i>Pythium oopapillum</i>	X	X
4D	Embu-Guaçu	Raiz/Alface		<i>Pythium</i> grupo F	X	X
6D	Embu-Guaçu	Raiz/Agrião		<i>Pythium</i> grupo F	X	X
8D	Embu-Guaçu	Raiz/Coentro		<i>Pythium</i> grupo F	X	X
9D	Embu-Guaçu	Sol. Nutritiva		<i>Pythium</i> grupo F	X	X
10D	Embu-Guaçu	Raiz/Esp. japonês		<i>Pythium oopapillum</i>	X	X
12D	Embu das Artes	Raiz/Alface		<i>Pythium</i> grupo F	X	X
16D	Itapec. da Serra	Sol. Nutritiva		<i>Pythium</i> grupo F	X	X
17D	Itapec. da Serra	Raiz/Alface		<i>Pythium</i> grupo F	X	X
20D	Itapec. da Serra	Raiz/Rúcula		<i>Pythium</i> grupo F	X	X
24D	Itapec. da Serra	Sol. nutritiva		<i>Pythium</i> grupo F	X	X
25D	Itapec. da Serra	Raiz/Agrião		<i>Pythium</i> grupo F	X	X
27D	Itapec. da Serra	Raiz/Alface		<i>Pythium</i> grupo F	X	*
28D	Itapec. da Serra	Raiz/Alface		<i>Pythium</i> grupo F	X	X
30D	Itapec. da Serra	Raiz/Agrião	4027	<i>Pythium kashmirensense</i>	KT823950	X
32D	Mogi das Cruzes	Sol. nutritiva		<i>Pythium oopapillum</i>	X	X
33D	Mogi das Cruzes	Raiz/Alface	4098	<i>Pythium oopapillum</i>	KT823951	X

34D	Mogi das Cruzes	Raiz/Rúcula		<i>Pythium</i> grupo F	X	X
35D	Mogi das Cruzes	Substrato	4095	<i>Pythium periplocum</i>	X	X
36D	Mogi das Cruzes	Sol. Nutritiva		<i>Pythium</i> grupo F	X	X
40D	Mogi das Cruzes	Substrato	4126	<i>Pythium middletonii</i>	X	X
43D	Salesópolis	Raiz/Salsão		<i>Pythium oopapillum</i>	X	*
45D	Salesópolis	Raiz/Mostarda		<i>Pythium</i> grupo F	X	*
47D	Salesópolis	Poço artesiano		<i>Pythium</i> grupo F	X	*
50D	Embu-Guaçu	Substrato	4104	<i>Phytopythium helicoides</i>	KR092137	X
52D	Embu-Guaçu	Substrato	4103	<i>Phytopythium helicoides</i>	KR092138	X
57D	Itapec. da Serra	Poço artesiano		<i>Pythium</i> grupo F	X	X
61D	Itapec. da Serra	Raiz/Alface		<i>Pythium</i> grupo F	*	X
62D	Itapec. da Serra	Raiz/Rúcula		<i>Pythium</i> grupo F	*	X
63D	Itapec. da Serra	Substrato	4097	<i>Phytopythium vexans</i>	KR092142	X
66D	Vargem G. Paulista	Sol. Nutritiva		<i>Pythium</i> grupo F	X	X
68D	Vargem G. Paulista	Sol. Nutritiva		<i>Pythium</i> grupo F	X	X
69D	Cotia	Raiz/Rúcula		<i>Pythium</i> grupo F	X	X
70D	Cotia	Sol. Nutritiva		<i>Pythium</i> grupo F	X	X
71D	Cotia	Substrato	4102	<i>Pythium segnitium</i>	KT823955	X
72D	Cotia	Raiz/Alface		<i>Pythium</i> grupo F	X	X
73D	Cotia	Sol. Nutritiva		<i>Pythium</i> grupo F	X	*
74D	Vargem G. Paulista	Raiz/Agrião	4149	<i>Pythium oopapillum</i>	KT823952	X
76D	Vargem G. Paulista	Sol. Nutritiva		<i>Pythium</i> grupo F	X	X
77D	Vargem G. Paulista	Substrato		<i>Pythium</i> sp.1	X	X
78D	Ibiúna	Raiz/Alface		<i>Pythium</i> grupo F	X	X
83D	Embu-Guaçu	Substrato	4127	<i>Phytopythium helicoides</i>	X	X
85D	São Roque	Raiz/Rúcula	4150	<i>Pythium oopapillum</i>	KT823953	*
86D	São Roque	Sol. Nutritiva		<i>Pythium oopapillum</i>	X	*
87D	São Roque	Raiz/Agrião	4151	<i>Pythium oopapillum</i>	KT823954	*
88D	São Roque	Sol. Nutritiva		<i>Pythium</i> grupo F	X	*

* Não foi possível obter sequências

5.1. Gênero *Phytopythium*

As análises das regiões ITS rDNA (Figura 15) e COI mDNA (Figura 16) do gênero *Phytopythium* evidenciaram a formação de três clados distintos (Clados I, II e III), o que também foi observado em outros estudos do gênero descrito recentemente (Baten *et al.* 2014, Baten *et al.* 2015, de Cock *et al.* 2015).

Na análise da região ITS rDNA, pôde ser observado no Clado II o posicionamento dos três isolados de *Phytopythium helicoides* obtidos neste estudo em um subclado juntamente com outros espécimes de *Phytopythium helicoides* disponíveis no GenBank, com os valores de bootstrap e

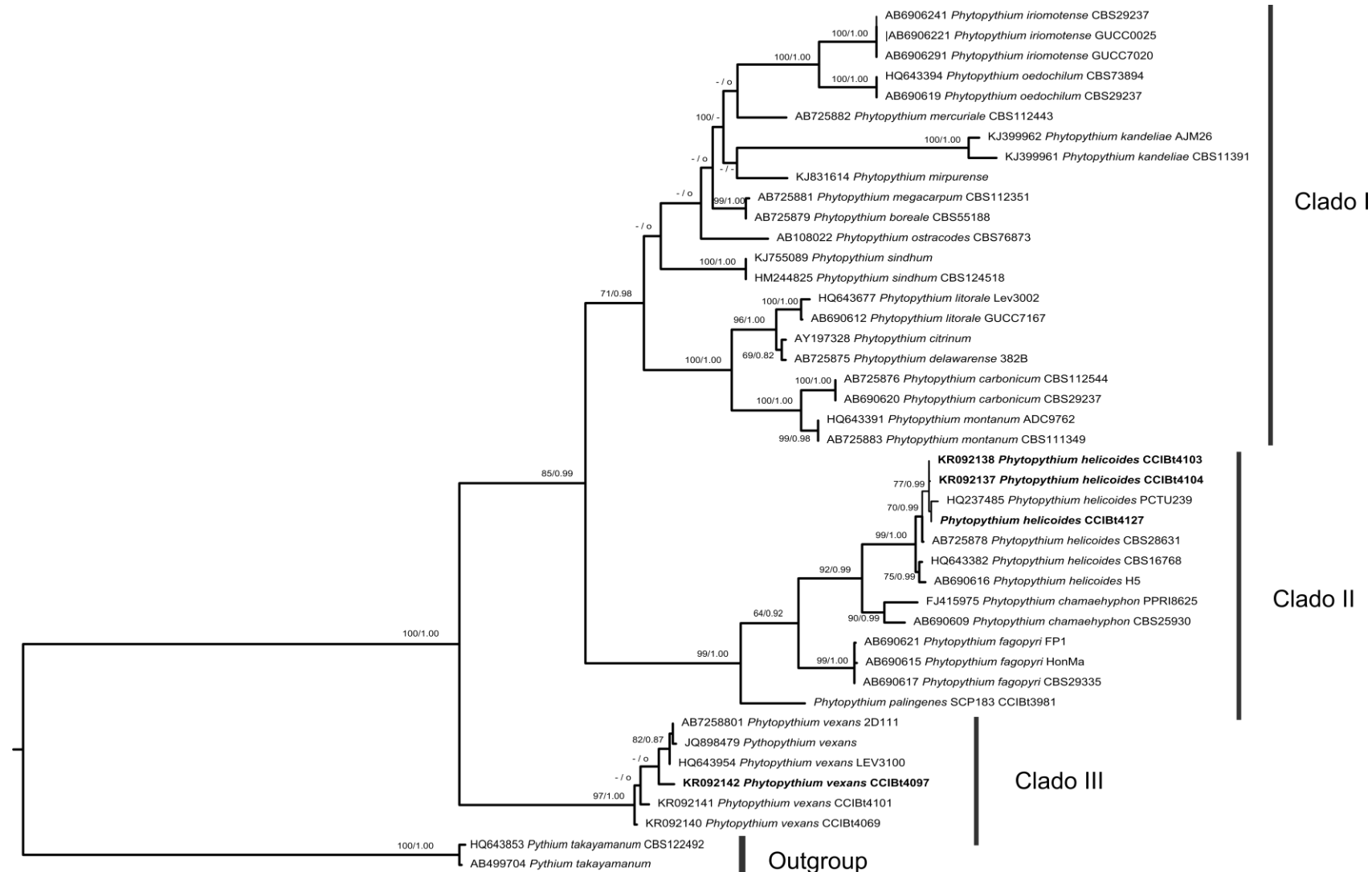


Figura 15. Arvore de máxima verossimilhança da região ITS rDNA do gênero *Phytopythium*. Valores de bootstrap > 50% são indicados numericamente, valores < que 50% são indicados com (-). Valores de probabilidade posterior > 0.50 são indicados numericamente e valores < 0.50 são indicados com (-). Clados não presentes na análise bayesiana são indicados com (0) e a barra de escala representa o número médio de substituições por site.

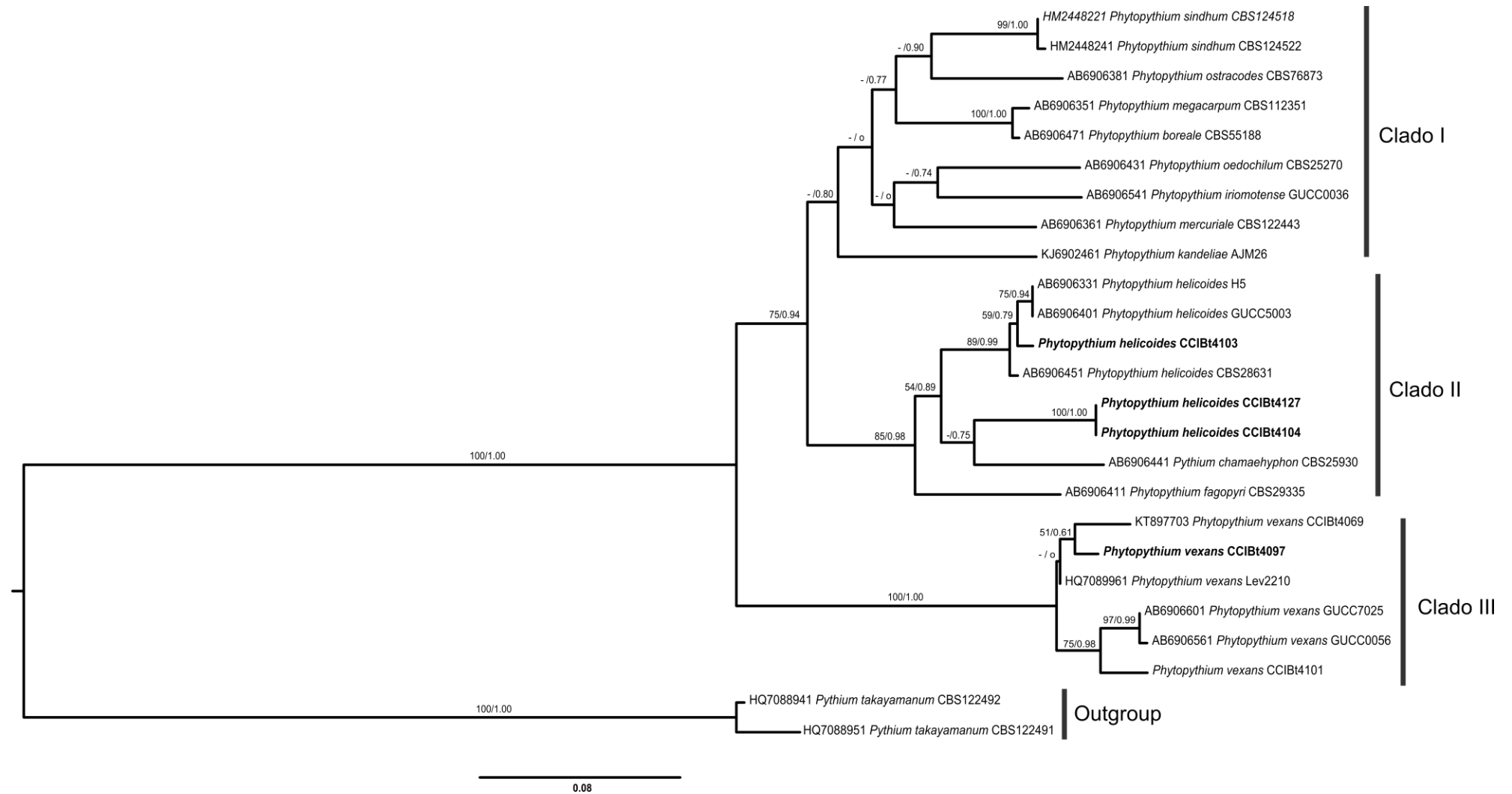


Figura 16. Arvore de máxima verossimilhança da região COI mDNA do gênero *Phytopythium*. Valores de bootstrap > 50% são indicados numericamente, valores < que 50% são indicados com (-). Valores de probabilidade posterior > 0.50 são indicados numericamente e valores < 0.50 são indicados com (-). Clados não presentes na análise baesiana são indicados com (0) e a barra de escala representa o número médio de substituições por site.

probabilidade posterior de 99% e 1.00, para as análises de verossimilhança e bayesiana, respectivamente. Entretanto, na análise da região COI mDNA, os três isolados se distribuem em dois subclados dentro do clado II, sendo que os espécimes CCIBt 4127 e CCIBt 4104 se agrupam com um espécime identificado como *P. chamehyphon* disponível no GenBank. Como os três isolados deste estudo não produziram estruturas sexuadas, não foi possível a diferenciação dos mesmos com espécies próximas através da morfologia, uma vez que as características da reprodução sexuada são essenciais para delimitação das espécies. Neste sentido, os resultados obtidos na análise da região ITS rDNA foram considerados para a identificação dos três espécimes.

Em ambas as análises da região ITS rDNA e COI mDNA, o isolado CCIBt 4097 identificado previamente por meio de suas características morfológicas como *Phytopythium vexans*, se posicionou juntamente com outros isolados da mesma espécie disponíveis no GenBank no clado III, com altos valores de bootstrap e probabilidade posterior para a região ITS rDNA (97% e 1.00) e COI mDNA (100% e 1.00), confirmando a identificação morfológica.

5.2. Gênero *Pythium*

As análises da região ITS rDNA (Figura 17) e COI mDNA (Figura 18) do gênero *Pythium* evidenciaram o posicionamento dos espécimes estudados em três clados (Clados B, D e E), de acordo com o estudo de Lévesque & de Cock (2004).

O clado B compreende o maior número de espécies dentro do gênero *Pythium*, sendo este subdividido em sub-clados B1, composto em sua maioria por espécies com zoosporângios filamentosos inflados e B2 composto por espécies com zoosporângios filamentosos não inflados ou levemente inflados. Na análise da região ITS rDNA, dos 39 isolados de *Pythium* sequenciados, 36 se agruparam dentro do clado B, enquanto na análise da região COI mDNA, dos 33 isolados de *Pythium* sequenciados, 29 se posicionaram dentro do clado B. Com exceção de *P. kashmirensense*, que possui zoosporângio do tipo filamentoso inflado, todos os outros espécimes apresentam zoosporângio do tipo filamentoso não inflado. Quanto as características da reprodução sexuada dos

espécimes que se agruparam no clado B, somente um identificado como *P. oopapillum* (CCIBt 4098) apresentou a formação de estruturas sexuais.

Na análise da região ITS rDNA, o isolado CCIBt4027 identificado como *P. kashmirensis*, se agrupou juntamente com outros quatro espécimes disponíveis no GenBank identificados como *P. kashmirensis*, incluindo o espécime tipo, com um valor de bootstrap de 90% e 1.00 de probabilidade posterior. Na análise da região COI mDNA, o mesmo isolado se agrupou com outros dois isolados coletados neste estudo (*Pythium* sp. DRG17 e *Pythium* sp. DRG62) e com o único espécime de *P. kashmirensis* com sequência da região COI mDNA disponível no GenBank com um valor de bootstrap de 90% e 0.99 de probabilidade posterior. Nesse sentido, o isolado CCIBt 4027 foi identificado como *P. kashmirensis* devido ao seu posicionamento tanto na análise da região ITS rDNA quanto da região COI mDNA e uma vez que este também apresentou zoosporângio filamentosos inflados, como consta na descrição original. Quanto aos espécimes *Pythium* sp. DRG17 e *Pythium* sp. DRG62, apesar de ambos se agruparem juntamente com um espécime de *P. kashmirensis* disponível no GenBank na análise da região COI mDNA, os mesmos não apresentaram a formação de zoosporângios filamentosos inflados e sendo assim optou-se em identificá-los até o momento como “*Pythium* do grupo F”, uma vez que apresentam zoosporângios do tipo filamentosos não inflados. Além disso, na análise da região ITS rDNA, *Pythium* sp. DRG17 não se agrupou com os espécimes de *P. kashmirensis* utilizados na análise.

Dentre os espécimes de *Pythium* que se agruparam no clado B, somente o isolado CCIBt4098 identificado como *P. oopapillum* apresentou estruturas assexuais e sexuais de reprodução, fornecendo assim todas as características necessárias para a identificação morfológica. Além disso, na análise das regiões ITS rDNA e COI mDNA este espécime se agrupou em um sub-clado juntamente com outros isolados da espécie disponíveis no GenBank, com valor de bootstrap de 75% e 0.90 de probabilidade posterior na análise da região ITS rDNA e valor de bootstrap de 65% e 0.94 de probabilidade posterior na análise da região COI mDNA. Além do isolado CCIBt 4098, outros oito isolados se agruparam neste mesmo sub-clado na análise da região ITS rDNA,

juntamente com os espécimes de *P. oopapillum* disponíveis no GenBank, com os valores de suporte e probabilidade citados acima. Nesse sentido, estes isolados também foram identificados como *P. oopapillum* devido ao seu posicionamento em ambas as análises.

Tanto na análise da região ITS rDNA quanto da região COI mDNA, a maioria dos espécimes presentes no clado B (23 isolados) se agruparam em um sub-clado com um valor de bootstrap de 97% e 0.99 de probabilidade posterior, juntamente com outros espécimes disponíveis no GenBank, incluindo *P. coloratum*, *P. diclinum*, *P. lutarium*, *P. dissotocum* e *P. marinum*. O mesmo foi observado na análise da região COI mDNA, onde 20 isolados sequenciados também se agruparam em um sub-clado com valor de bootstrap de 78% e 1.00 de probabilidade posterior. Alguns autores como Lévesque & de Cock (2004) e Robideau *et al.* (2011) reportam este agrupamento como um complexo de espécies, uma vez que as espécies presentes neste sub-clado apresentam características morfológicas muito próximas, e além disso, não se separam nas análises filogenéticas. Como pontuado no estudo de Lévesque & de Cock (2004), as sequências da região ITS rDNA de *P. coloratum*, *P. lutarium*, *P. marinum* e *P. dissotocum* são idênticas e *P. diclinum* difere das mesmas somente por um par de bases. Nesse sentido, os mesmos autores apontam para a necessidade de se utilizar outros genes na tentativa de esclarecer a proximidade entre estas espécies e também destacam a possibilidade de uma possível sinonimização das mesmas. Em relação aos isolados coletados neste estudo que se agrupam neste sub-clado, a identificação considerada até o momento é a baseada na monografia de Plaats-Niterink (1981) considerando os grandes grupos e sendo assim estes espécimes foram identificados como “*Pythium* do grupo F”.

Dentre as espécies de *Pythium* do clado D, neste estudo foi possível obter um isolado identificado como *P. periplocum* (CCIBt 4095) e outro isolado identificado como *Pythium* sp.1, ambos coletados de amostras de substrato. Tanto na análise da região ITS rDNA quanto da região COI mDNA, o isolado CCIBt 4095 se posicionou de forma bastante clara com outros isolados de *P. periplocum* disponíveis no GenBank, com valores de bootstrap de 100% (ITS) e 93% (COI) e

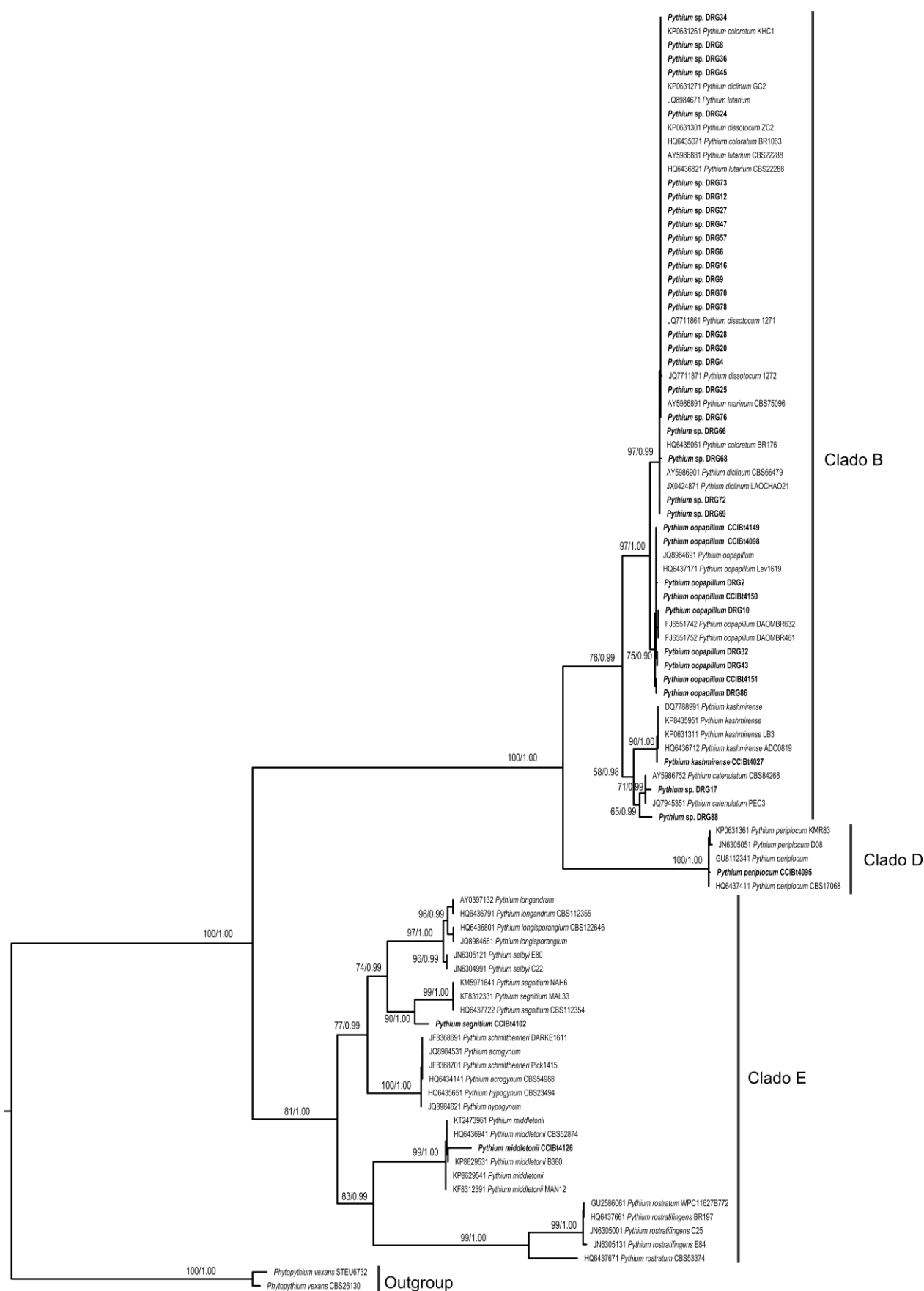


Figura 17. Arvore de máxima verossimilhança da região ITS rDNA do gênero *Pythium*. Valores de bootstrap > 50% são indicados numericamente, valores < que 50% são indicados com (-). Valores de probabilidade posterior > 0.50 são indicados numericamente, valores 0.50 são indicados com (-). Clados não presentes na análise baesiana são indicados com (o) e a barra de escala representa o número de substituições por site.

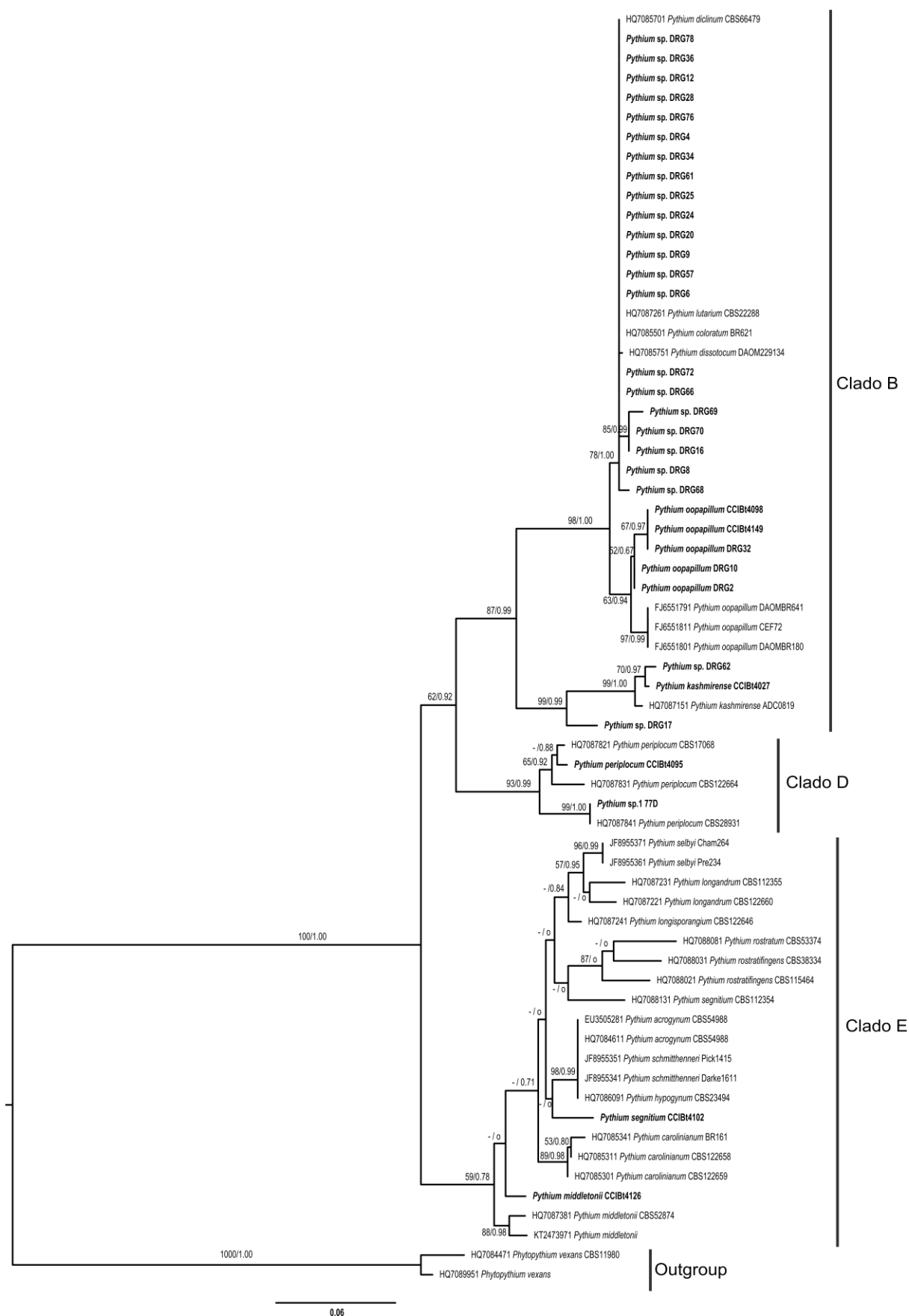


Figura 18. Arvore de máxima verossimilhança da região COI mtDNA do gênero *Pythium*. Valores de bootstrap > 50% são indicados numericamente, valores < 50% são indicados com (-). Valores de probabilidade posterior > 0.50 são indicados numericamente, valores < 0.50 são indicados com (-). Clados não presentes na análise baesiana são indicados com (o) e a barra de escala representa o número de substituições por site.

valores de probabilidade posterior de 1.00 (ITS) e 0.99 (COI). Além disso, este isolado apresentou todas as características morfológicas descritas para esta espécie, confirmando a identificação molecular.

Das regiões sequenciadas, foi possível obter sequências somente da região COI mDNA do isolado *Pythium* sp.1, o qual se posicionou juntamente com isolados de *P. periplocum* disponíveis no GenBank e com o isolado CCIBt 4095, também identificado como *P. periplocum* em um clado com valores de bootstrap e probabilidade posterior de 93% e 0.99, respectivamente. Embora este isolado tenha se agrupado com as espécies de *P. periplocum* optou-se em identificá-lo como *Pythium* sp.1 uma vez que o mesmo apresenta características, principalmente da reprodução sexuada, bastante diferentes de *P. periplocum*, e principalmente, das espécies do gênero *Pythium*.

Das espécies que apresentam zoosporângios variando de esférico a globoso, foram amostradas *P. middletonii* e *P. segnitium*, ambas pertencentes ao Clado E. Como mencionado, este clado é composto por espécies que apresentam zoosporângios do tipo esférico a globoso, podendo apresentar proliferação interna ou não (Lévesque & de Cock 2004). Estas duas espécies foram identificadas considerando seu posicionamento na análise filogenética da região ITS rDNA e principalmente suas características morfológicas. Quanto ao posicionamento filogenético, CCIBt 4102 identificado como *P. segnitium* se agrupou em um sub-clado juntamente com outros três espécimes identificados como *P. segnitium* disponíveis no GenBank, com 90% de bootstrap e com valor de probabilidade posterior de 1.00. Na análise da região COI mDNA, este isolado se apresentou distante da única sequência da região COI de *P. segnitium* disponível no GenBank.

Também presente no clado E, *P. middletonii* na análise da região ITS rDNA se posicionou juntamente com outros cinco isolados da espécie disponíveis no GenBank em um sub-clado com valor de bootstrap de 99% e 1.00 de probabilidade posterior. Entretanto, na análise da região COI mDNA, o mesmo isolado não se agrupou com os dois únicos espécimes identificados como *P. middletonii* com sequências da região COI mDNA disponíveis no GenBank. Nesse sentido, o isolado CCIBt 4126 foi identificado como *P. middletonii* uma vez que o mesmo apresentou todas as

características morfológicas da espécie e além disso se agrupou com outros espécimes de *P. middletonii* na análise da região ITS rDNA.

6. Testes de patogenicidade *in vitro* de *Pythium s. l.* em sementes de hortaliças produzidas em sistemas hidropônicos

Dos espécimes de *Pythium s. l.* selecionados para os testes de patogenicidade (Tabela 7), *Pythium oopapillum* foi isolado de raiz de alface crespa assintomática, enquanto *Phytophythium helicoides*, *Py. vexans*, *Pythium periplocum* e *P. segnitium* foram isolados de substratos utilizados para produção de mudas de hortaliças hidropônicas.

Tabela 7. Espécies selecionadas para a realização dos testes de patogenicidade *in vitro* e respectivas hortaliças avaliadas

Espécie	CCIBt	Hortaliça avaliada	Marca Semente	Temperatura (°C)	
				Isolado	Hortaliça
<i>Pythium oopapillum</i>	4098	<i>Lactuca sativa</i> L.	Horticeres	30°C	20°C
<i>Pythium periplocum</i>	4095	<i>Eruca sativa</i> L.	Horticeres	30°C	20°C
<i>Pythium segnitium</i>	4102	<i>Lactuca sativa</i> L.	Horticeres	25°C	20°C
<i>Phytophythium vexans</i>	4097	<i>Lactuca sativa</i> L.	Horticeres	30°C	20°C
<i>Phytophythium helicoides</i>	4103	<i>Lactuca sativa</i> L.	Horticeres	30°C	20°C

No caso dos isolados coletados em amostras de substrato, a patogenicidade do organismo foi testada em sementes da cultura coletada na mesma propriedade de onde foi coletado o substrato. Isso foi feito para testar o potencial patogênico do isolado proveniente do substrato na cultura que estava sendo produzida na propriedade em questão. No caso de *Pythium oopapillum*, isolado de raiz de alface crespa, o potencial patogênico do mesmo foi testado também em alface crespa uma vez que no momento da coleta da cultura, a planta não apresentava sintomas, e além disso, não existem relatos sobre o potencial patogênico desta espécie.

No teste de patogenicidade de *P. oopapillum* em sementes de *L. sativa* L. (alface crespa) (Tabela 8), pôde ser observado que nas temperaturas de 20°C e 30°C, o comprimento da raiz foi maior no controle do que no tratamento (onde houve a inoculação de *P. oopapillum*), demonstrando

que o espécime pode estar causando diminuição no crescimento da raiz. Por outro lado, não houve diferenças significativas entre o controle e tratamento quanto ao tamanho do hipocótilo em ambas as temperaturas.

Tabela 8. Teste de patogenicidade *in vitro* de *Pythium oopapillum* em sementes de alface crespa referente ao comprimento da radícula (CR), comprimento do hipocótilo (CH) e porcentagem de plântulas sobreviventes (PPS)*

Temperatura	CR (cm)		CH (cm)		PPS (%)	
	Controle	<i>P. oopapillum</i>	Controle	<i>P. oopapillum</i>	Controle	<i>P. oopapillum</i>
20°C	3,17Aa	1,43Ba	0,43Ab	0,43Ab	100Aa	100Aa
30°C	1,75Ab	0,93Bb	0,52Aa	0,60Aa	100Aa	100Aa

*Minúscula comparada na vertical e maiúscula comparada na horizontal para cada um dos parâmetros

*Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste t de Student

Quando comparadas as duas temperaturas, pôde ser observado que tanto no controle quanto no tratamento, houve maior crescimento da raiz a 20°C, temperatura considerada ideal para crescimento de alface (Nascimento *et al.* 2012). Entretanto, para o comprimento do hipocótilo foi observado maiores valores na temperatura de 30°C. Apesar de nos tratamentos analisados, onde houve inoculação de *P. oopapillum*, ser constatado um menor crescimento da raiz, a porcentagem de plântulas sobreviventes registradas foi de 100%, não havendo registro de morte das plântulas (Figura 19).

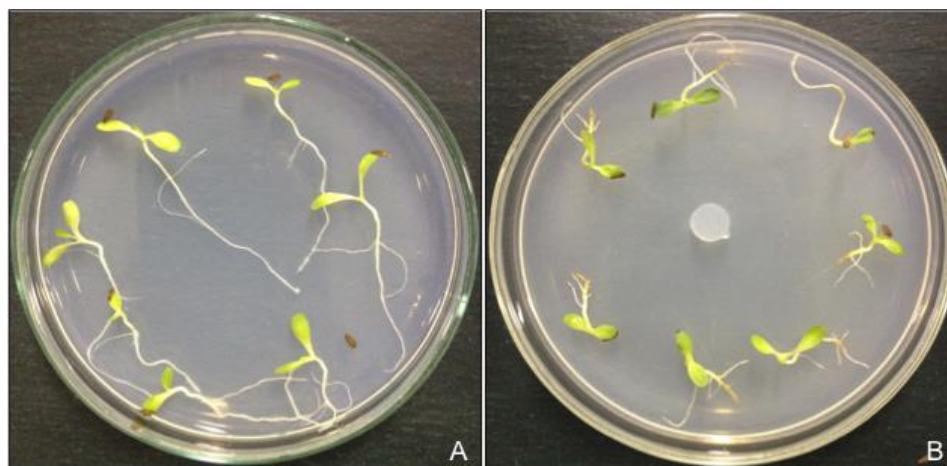


Figura 19. Teste de patogenicidade *in vitro* de *Pythium oopapillum* em sementes de alface crespa na temperatura de 20°C. Controle sem a inoculação do isolado (A) e tratamento com a inoculação do isolado (B).

Pouco se conhece sobre a patogenicidade de *P. oopapillum*, espécie descrita recentemente por Bala *et al.* (2010b), apesar de a mesma ter sido isolado de diversos hospedeiros, incluindo raízes sintomáticas de *Tulipa* sp.. Recentemente, alguns autores relataram o potencial patogênico desta espécie em soja (Zitnick-Anderson & Nelson Jr. 2015) e em mudas de *Pseudotsuga menziesii*, uma espécie florestal bastante difundida como planta ornamental nos Estados Unidos (Weiland *et al.* 2013).

No teste de patogenicidade de *P. periplocum* em sementes de rúcula (Tabela 9), pôde ser observado que na temperatura de 20°C, não foram registradas diferenças significativas entre o controle e tratamento tanto no comprimento da raiz quanto do hipocótilo. Entretanto, na temperatura de 30°C, o comprimento da raiz foi maior no controle do que no tratamento, demonstrando um maior potencial patogênico do isolado nesta temperatura, considerada mais apropriada para o desenvolvimento do patógeno. Não foram observadas diferenças significativas no comprimento do hipocótilo entre controle e tratamento na temperatura de 30°C.

Tabela 9. Teste de patogenicidade *in vitro* de *Pythium periplocum* em sementes de rúcula referente ao comprimento da radícula (CR), comprimento do hipocótilo (CH) e porcentagem de plântulas sobreviventes (PPS)*

	CR (cm)		CH (cm)		PPS (%)	
	Controle	<i>P. periplocum</i>	Controle	<i>P. periplocum</i>	Controle	<i>P. periplocum</i>
20°C	2,75Aa	1,89Aa	1,23Aa	1,12Aa	100Aa	77.14Aa
30°C	3,09Aa	1,37Ba	0,84Ab	0,88Aa	100Aa	80.00Aa

*Minúscula comparada na vertical e maiúscula comparada na horizontal para cada um dos parâmetros

*Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste t de student

Quando analisadas as duas temperaturas, pôde ser observado que tanto para o controle quanto para o tratamento, não houve diferenças significativas no comprimento da raiz quando comparadas as temperaturas de 20°C e 30°C. Quanto ao comprimento do hipocótilo, somente no

controle foi observada diferença significativa entre as duas temperaturas, sendo que a 20°C houve um maior crescimento do hipocótilo. Quanto a porcentagem de plântulas sobreviventes, foi observado que nas placas inoculadas com *P. periplocum*, foram registradas mortes de plântulas tanto a 20°C quanto a 30°C (Figura 20).

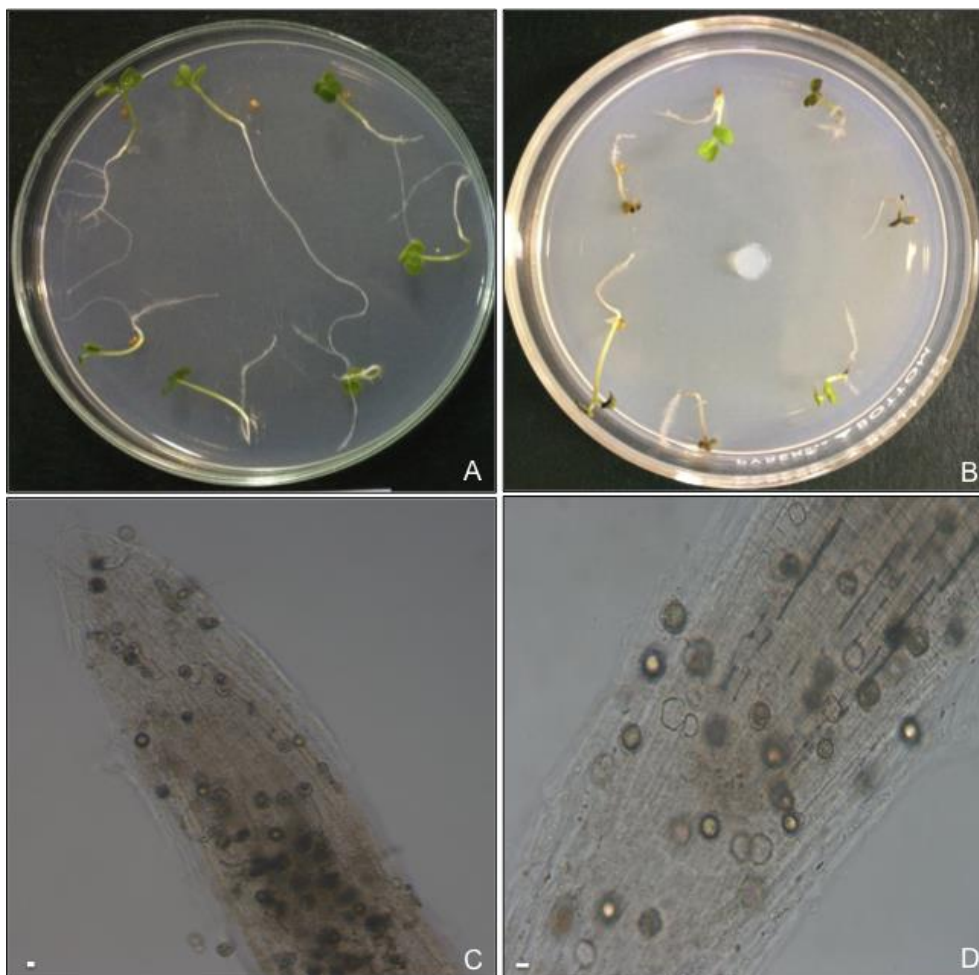


Figura 20. Teste de patogenicidade *in vitro* de *Pythium periplocum* em sementes de rúcula na temperatura de 30°C. Controle sem a inoculação do isolado (A); tratamento com a inoculação do isolado (B) e oogônios de *P. periplocum* em raiz de plântula morta (C e D). Barra: 10,0 μm.

Apesar de *P. periplocum* ter sido originalmente descrita como agente causal da podridão apical em melancia (*Citrullus vulgaris* L.) por Drechsler (1930), após este relato poucos estudos descrevem o potencial patogênico desta espécie (Ribeiro & Butler 1995). Apesar disso, alguns estudos relatam o potencial de *P. periplocum* como agente micoparasita, juntamente com outras espécies do gênero como *P. acanthicum* e *P. oligandrum* (Ribeiro & Butler 1995). Segundo Paul (1999), esta espécie pode agir como parasita em *Botrytis cinerea*, agente causador do mofo cinzento

da videira. O que pôde ser observado no presente estudo é que *P. periplocum* tem potencial como agente fitopatogênico uma vez que ocorreram mortes das plântulas de rúcula nas placas inoculadas com o patógeno. Nesse sentido, considerando que esta espécie foi isolada de substrato e que possivelmente possa entrar no sistema, problemas futuros podem ocorrer caso haja condições ambientais favoráveis para a ação do patógeno.

Nos testes de patogenicidade de *P. segnitium* em sementes de alface crespa (Tabela 10), foi observado que em ambas as temperaturas (20°C e 25°C), não foram registradas diferenças significativas entre tratamento e controle quando analisados os comprimentos da raiz e hipocótilo. Quando comparadas as temperaturas (20°C e 25°C), não foram observadas diferenças significativas no comprimento da raiz, tanto no controle quanto no tratamento. Entretanto, um maior crescimento do hipocótilo foi registrado na temperatura de 25°C, tanto nas placas controle quanto nas placas inoculadas com *P. segnitium*. Não foi registrado morte de plântulas em nenhuma das placas (Figura 21).

Como observado no experimento, *P. segnitium* apresenta um baixo potencial patogênico. O mesmo foi relatado por Castillo-Múnera (2015), onde sementes de *Geranium* sp., bastante utilizada como planta ornamental na América do Norte, foram inoculadas com *P. segnitium* e causaram a inibição no crescimento de somente 6% das sementes. Além disso, quando as mudas foram inoculadas com o isolado, foi registrado o aparecimento de lesões bastante pequenas quando comparada as outras espécies avaliadas, como *P. aphanidermatum* e *P. irregulare*.

Tabela 10. Teste de patogenicidade *in vitro* de *Pythium segnitium* em sementes de alface crespa referente ao comprimento da radícula (CR), comprimento do hipocótilo (CH) e porcentagem de plântulas sobreviventes (PPS)*

	CR (cm)		CH (cm)		PPS (%)	
Temperatura	Controle	<i>P. segnitium</i>	Controle	<i>P. segnitium</i>	Controle	<i>P. segnitium</i>
20°C	2,47Aa	2,86Aa	0,53Ab	0,57Ab	100Aa	100Aa
25°C	2,49Aa	2,76Aa	1,77Aa	1,49Aa	100Aa	100Aa

*Minúscula comparada na vertical e maiúscula comparada na horizontal para cada um dos parâmetros

*Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste t de Student

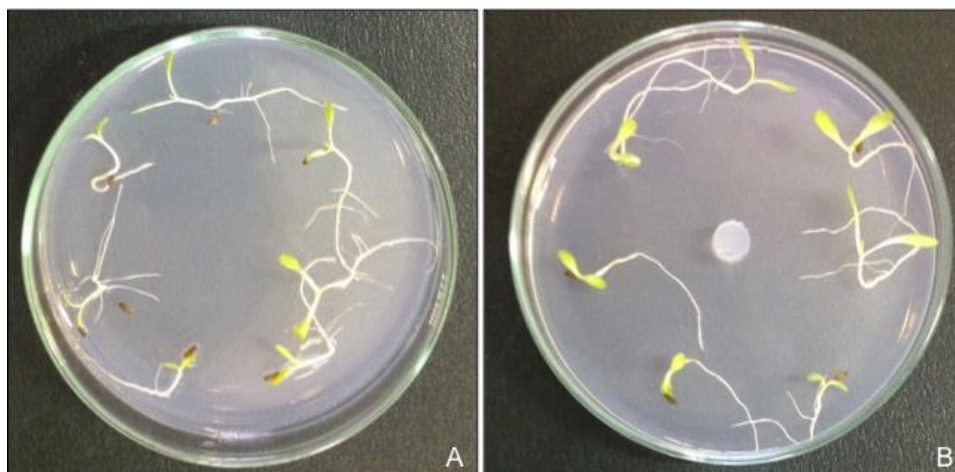


Figura 21. Teste de patogenicidade *in vitro* de *Pythium segnitium* em sementes de alface crespa na temperatura de 25°C. Controle sem a inoculação do isolado (A) e tratamento com a inoculação do isolado (B)

Nos testes de patogenicidade de *Py. helicoides* em sementes de alface crespa (Tabela 11), quando analisada a temperatura de 20°C, foram registradas diferenças significativas entre o controle e tratamento somente no comprimento da raiz, ocorrendo um maior crescimento da raiz nas placas controle. Na temperatura de 30°C, não foram observadas diferenças significativas entre tratamento e controle tanto no comprimento da raiz quanto do hipocótilo, entretanto, diferenças significativas foram observadas na porcentagem de plântulas sobreviventes, sendo que, nas placas inoculadas com *Py. helicoides*, foi registrada morte de plântulas (Figura 22).

Quando comparadas as duas temperaturas, foram registradas diferenças significativas no comprimento da raiz nas placas controle, sendo que na temperatura de 20°C, temperatura considerada ideal para o desenvolvimento da alface, um maior crescimento da raiz foi observado. Em relação a porcentagem de plântulas sobreviventes, nas placas inoculadas com *Py. helicoides*, um maior número de plântulas mortas foi registrado na temperatura de 30°C. Não foram registradas diferenças significativas no tamanho do hipocótilo, quando as duas temperaturas foram comparadas.

Alguns estudos relatam o potencial fitopatogênico de *Phytophthora helicoides* causando podridão de raiz em espécies ornamentais como *Rosa hybrida* L. (Kageyama *et al.* 2002) e *Amorphophallus paeonifolius* (Roy & Hong 2008), em morango (*Fragaria x ananassa* Duchesne)

(Ishiguro *et al.* 2014) e em sementes de alface hidropônica (Teixeira *et al.* 2006). Como observado neste estudo, o isolado utilizado nos testes de patogenicidade também demonstrou ser patogênico uma vez que na temperatura de 30°C houve morte das plântulas inoculadas com *Py. helicoides*. Considerando o potencial patogênico desta espécie e que a mesma também foi isolada de substrato, caso esta espécie seja introduzida no sistema, surtos futuros de podridão de raiz podem vir a ocorrer caso haja ambiente e hospedeiro favoráveis.

Tabela 11. Teste de patogenicidade *in vitro* de *Phytophthium helicoides* em sementes de alface crespa referente ao comprimento da radícula (CR), comprimento do hipocótilo (CH) e porcentagem de plântulas sobreviventes (PPS)*

Temperatura	CR (cm)		CH (cm)		PPS (%)	
	Controle	<i>Py. helicoides</i>	Controle	<i>Py. helicoides</i>	Controle	<i>Py. helicoides</i>
20°C	2,17Aa	1,49Ba	0,96Aa	0,97Aa	100Aa	100Aa
30°C	1,5Ab	1,23Aa	1,15Aa	1,01Aa	100Aa	60Bb

*Minúscula comparada na vertical e maiúscula comparada na horizontal para cada um dos parâmetros

*Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste t de Student

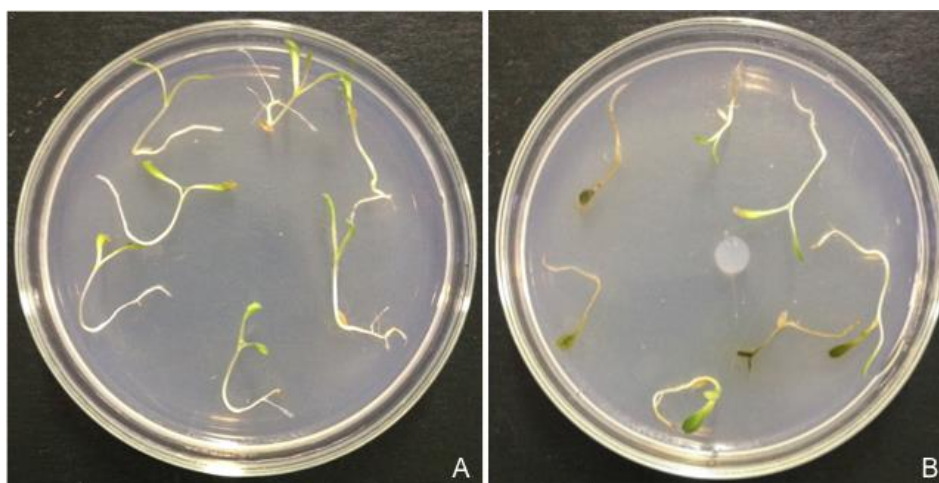


Figura 22. Teste de patogenicidade *in vitro* de *Phytophthium helicoides* em sementes de alface crespa na temperatura de 30°C. Controle sem a inoculação do isolado (A) e tratamento com a inoculação do isolado (B)

Nos testes de patogenicidade de *Phytophthium vexans* em sementes de alface crespa (Tabela 12), na temperatura de 20°C, não foram registradas diferenças significativas entre tratamento e

controle nos três parâmetros analisados (comprimento da raiz, hipocótilo e porcentagem de plântulas sobreviventes). Na temperatura de 30°C, diferenças significativas foram observadas somente no comprimento da raiz sendo que no tratamento onde houve inoculação de *Py. vexans*, um maior comprimento da raiz foi registrado. Quando comparadas as duas temperaturas (20°C e 30°C), dos três parâmetros analisados somente no comprimento da raiz foram registradas diferenças significativas entre as duas temperaturas, sendo que tanto no caso do controle quanto do tratamento houve um maior crescimento da raiz a 20°C.

De acordo com Plaats-Niterink (1981), *Py. vexans* é relatado como agente patogênico responsável em causar danos em diversas culturas, incluindo algumas de grande importância como batata (*Solanum tuberosum* L.) e batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) Além disso, mais recentemente alguns estudos têm demonstrado o potencial patogênico desta espécie em seringueira (*Hevea brasiliensis* Mull.) (Zeng *et al.* 2005), em frutos de *Durio zibethinus*, bastante importante economicamente na Ásia (Vawdrey *et al.* 2005) e em *Dendrobium* sp., espécie utilizada como medicinal na China, causando podridão na raiz e nos ramos (Tao *et al.* 2011).

Tabela 12. Teste de patogenicidade *in vitro* de *Phytophthium vexans* em sementes de alface crespa referente ao comprimento da radícula (CR), comprimento do hipocótilo (CH) e porcentagem de plântulas sobreviventes (PPS)*

Temperatura	CR (cm)		CH (cm)		PPS (%)	
	Controle	<i>Phy. vexans</i>	Controle	<i>Phy. vexans</i>	Controle	<i>Phy. vexans</i>
20°C	3,27Aa	3,56Aa	0,49Aa	0,51Aa	100Aa	100Aa
30°C	1,63Bb	1,96Ab	0,55Aa	0,56Aa	100Aa	100Aa

*Minúscula comparada na vertical e maiúscula comparada na horizontal para cada um dos parâmetros

*Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste t de Student

7. Outros oomicetos isolados dos sistemas hidropônicos

Além das espécies do gênero *Pythium* s. l., nos casos em que outras espécies de oomicetos colonizaram as iscas, estas também foram isoladas e identificadas considerando características morfológicas e a região ITS rDNA.

Três espécies pertencentes a ordem Saprolegniales foram identificadas: *Achlya hypogyna*, *Saprolegnia ferax* e *Saprolegnia semihypogyna*. Destas, *A. hypogyna* e *S. ferax* foram isoladas de amostras de solução nutritiva enquanto *S. semihypogyna* de amostra de água de poço artesiano. Esta é a primeira citação de *S. semihypogyna* no Brasil.

Além das espécies do gênero *Pythium* s. l. que são bastante importantes em sistemas hidropônicos, deve-se ressaltar a presença destas outras espécies na solução nutritiva e na água de poço artesiano. Algumas espécies da ordem Saprolegniales, especialmente do gênero *Saprolegnia*, são bastante importantes como patógenos de peixes, seja em ambientes naturais ou em sistemas de produção (Sandoval-Sierra *et al.* 2014). Sendo assim, a presença destes organismos pode vir a ser um problema em um eventual uso da água de poço artesiano para outras atividades como para a produção de peixes em cativeiro, por exemplo, devendo o produtor realizar minuciosa análise microbiológica da água antes do uso.

7.1. Descrição das espécies de Saprolegniales isoladas dos sistemas hidropônicos

Achlya hypogyna Coker & Pemberton, Botanical Gazette Crawfordsville 45: 194. 1908

Fig. 23 A-F

Talo monóico. Zoosporângios terminais, fusiformes, $230\text{--}450 \times 20\text{--}50 \mu\text{m}$; renovação simpodial. Liberação dos zoósporos aclióide; zoósporos encistados, $10\text{--}12,5 \mu\text{m}$ diâm. Gemas presentes. Oogônios terminais, alguns intercalares, raramente laterais ou sésseis, esféricos, $45\text{--}75 \mu\text{m}$ diâm.; parede lisa, com alguns oogônios papilados; papilas também observadas em células anteridiaais; pedúnculo oogonial simples, $1/2\text{--}3$ vezes o tamanho do oogônio. Oosferas maturando, algumas abortando. Anterídios hipóginos, alguns díclinos e monóclinos, às vezes mais de um por oogônio; ramos anteridiaais simples; célula anteridial simples, atracção apical; tubo de fertilização presente. Oósporos cêntricos e subcêntricos, esféricos, $27,5\text{--}50 \mu\text{m}$ diâm.; $1\text{--}3$ por oogônio, normalmente um.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Itapecerica da Serra, Solução nutritiva hidropônica, 28/III/2014, D.R. Gonçalves s.n. (CCIBt 4079; Genbank: KP006461, KP165040).

O isolado estudado apresentou características que estão de acordo com a descrição de *A. hypogyna* por Coker & Pemberton (1908). Entretanto, na análise filogenética o isolado se agrupou com espécimes do gênero *Protoachlya*, e apresentou características bastante similares com a descrição de *P. hypogyna* por Shanor & Conover (1942), com exceção da presença de proliferação interna. Considerando a ausência de proliferação interna no isolado estudado, optou-se em identificá-lo como *A. hypogyna* até o momento.

Saprolegnia ferax (Gruith.) Kütz, Phycology General. 157. 1843.

Basiônimo: *Conferva ferax* Gruith. Nova Acta Acad. Caes. Leop. Carol. 10: 445. 1821

Fig. 24 A-F

Talo monóico. Zoosporângios terminais, fusiformes. Liberação dos zoósporos saprolegnióide, zoósporos encistados, 7,5 – 12,5 µm diâm. Gemas presentes. Oogônios terminais, esféricos, 50,0 – 80,0 µm diâm, alguns clavados, parede com a presença de poros. Oosferas maturando, algumas abortando, 1 – 15 por oôgonio. Anterídios díclinos e andróginos; ramos anteridiais simples; célula anteridial tubular, as vezes dividida. Oósporos subcêntricos, raramente cêntricos, 25,0 – 32,5 µm diâm.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Salesópolis, Solução nutritiva hidropônica, 20/III/2014, D.R. Gonçalves s.n. (CCIBt 4158).

As características do espécime estudado estão de acordo com o descrito por Johnson *et al.* (2002). Além disso, a análise filogenética da região ITS rDNA corroborou a identificação morfológica do isolado.

Saprolegnia semihypogyna S. Inaba & Tokum., Mycoscience 43: 73. 2002.

Fig. 25 A-F

Talo monóico. Zoosporângios terminais, cilíndricos, piriformes, $100\text{--}400 \times 20\text{--}50$; renovação por proliferação interna. Liberação dos zoósporos saprolegnióide; zoósporos encistados, $10\text{--}12,5 \mu\text{m}$ diâm. Gemas presentes. Oogônios laterais, algumas vezes terminais, esféricos, $25\text{--}45 \mu\text{m}$ diâm.; parede lisa, com poros, papilas proeminentes em alguns oogônios.. Oosferas maturando. Anterídios andróginos, hipóginos, semi-hipóginos, raramente díclinos; ramos anteridiaais curtos e simples; célula anteridial simples; tubo de fertilização presente. Oósporos subexcêntricos, 1–3 por oogônio, normalmente um, $22,5\text{--}32,5 \mu\text{m}$ diâm.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: Mogi das Cruzes, amostra de água de poço artesiano, 10/VII/2014, D.R. Gonçalves s.n. (CCIBt 4096).

O isolado estudo apresentou todas as características morfológicas presentes na descrição original da espécie por Inaba & Tokumasu (2002), dentre estas se destacam a presença de anterídios semi-hipóginos e oósporos subexcêntricos. O posicionamento do isolado na análise filogenética da região ITS rDNA juntamente com outros isolados de *S. semihypogyna* favoreceu a identificação do espécime.

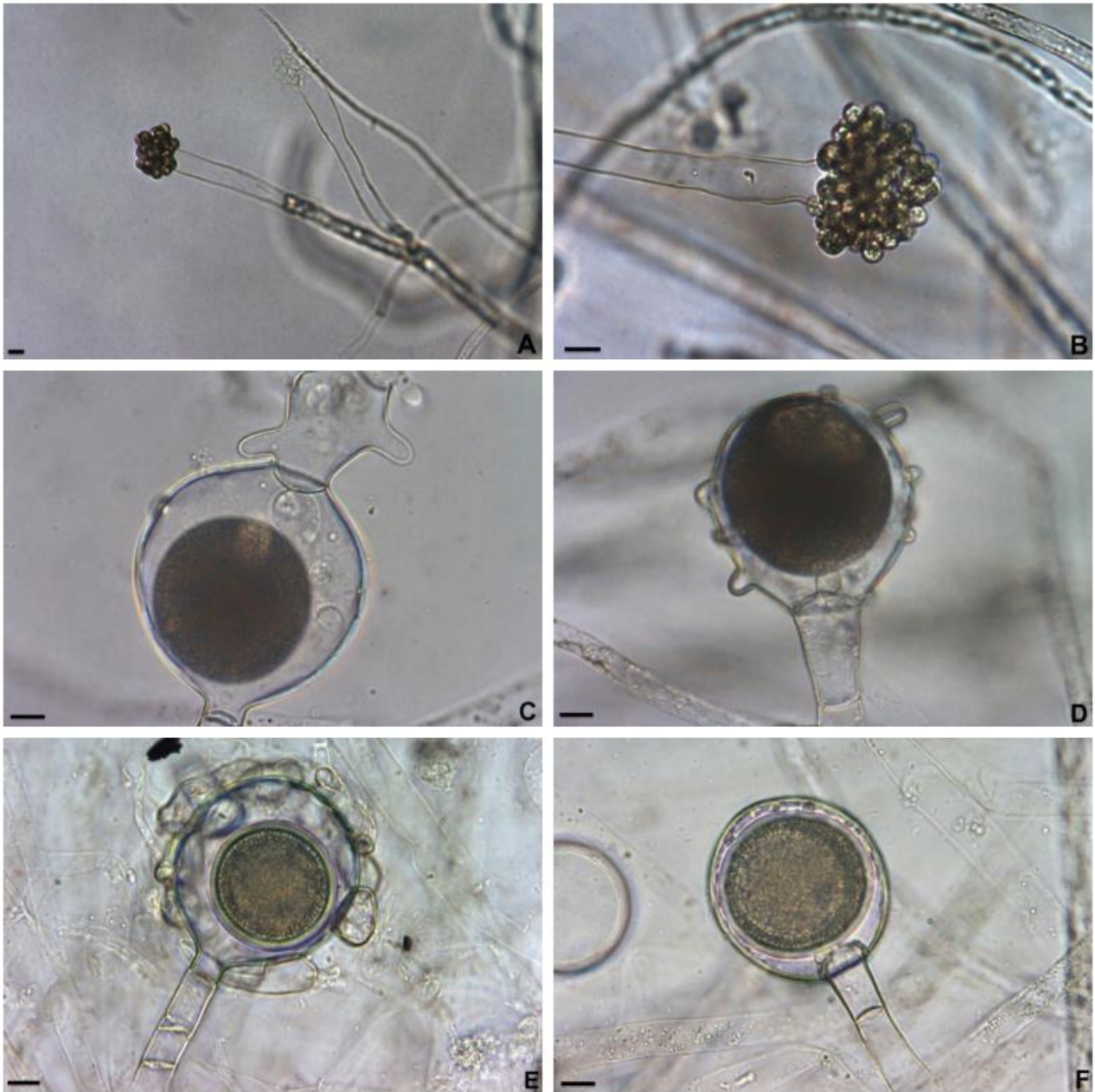


Figura 23. *Achlya hypogyna*. Zoosporângios com liberação aclióide (A e B); Célula anteridial ornamentada (C) Oogônio com ornamentações e anterídio hipógino (D); Oogônio com anterídios díclinos (E) e oósporo subcêntrico (F). Barra: 10,0 μ m.

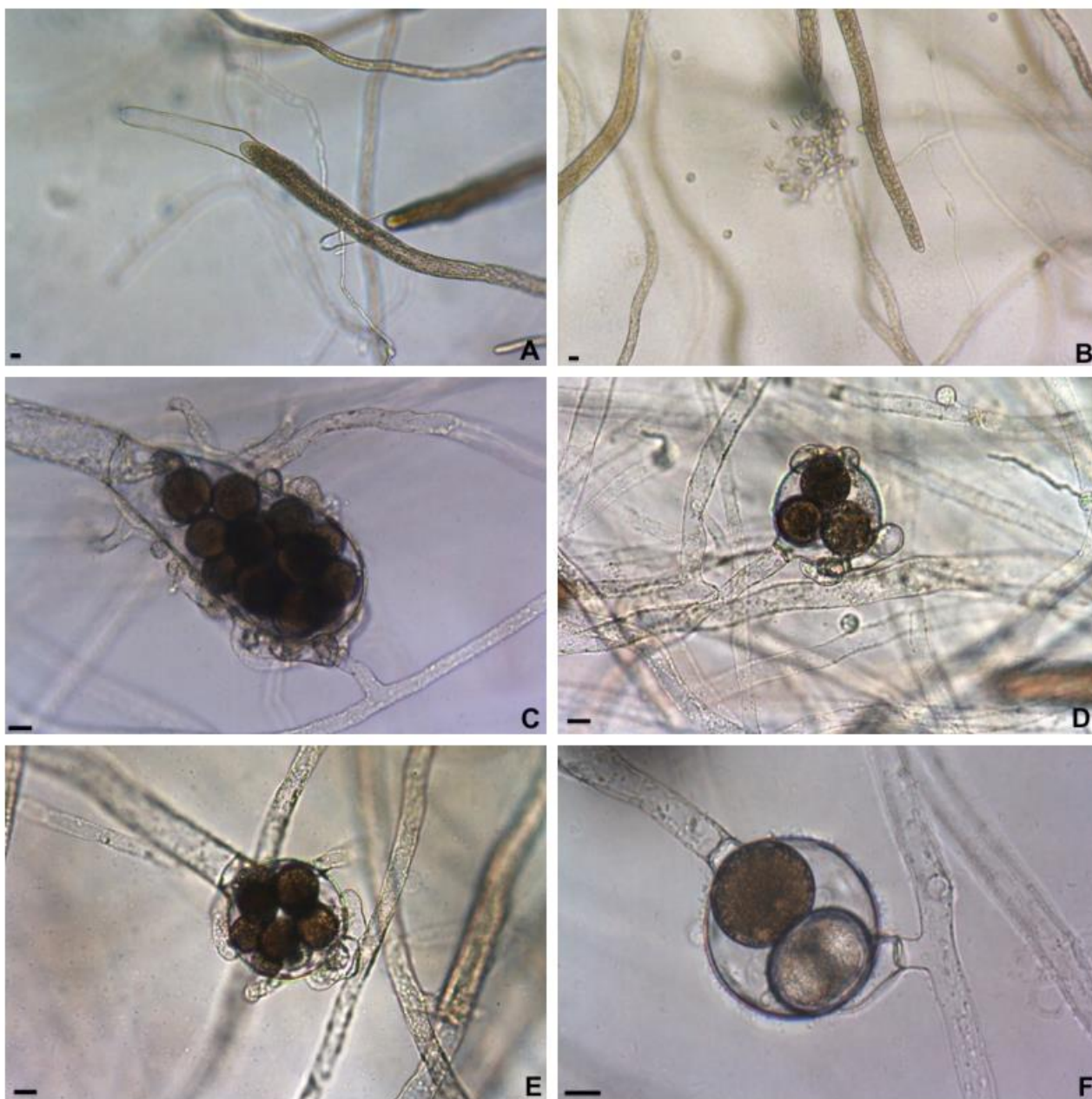


Figura 24. *Saprolegnia ferax*. Zoosporângio com proliferação interna (A); liberação dos zoósporos (B); oogônio em formato clavado com a presença de anterídio díclino (C); oogônios esféricos contendo oosferas (D e E); anterídio díclino (F). Barra: 10,0 μm.

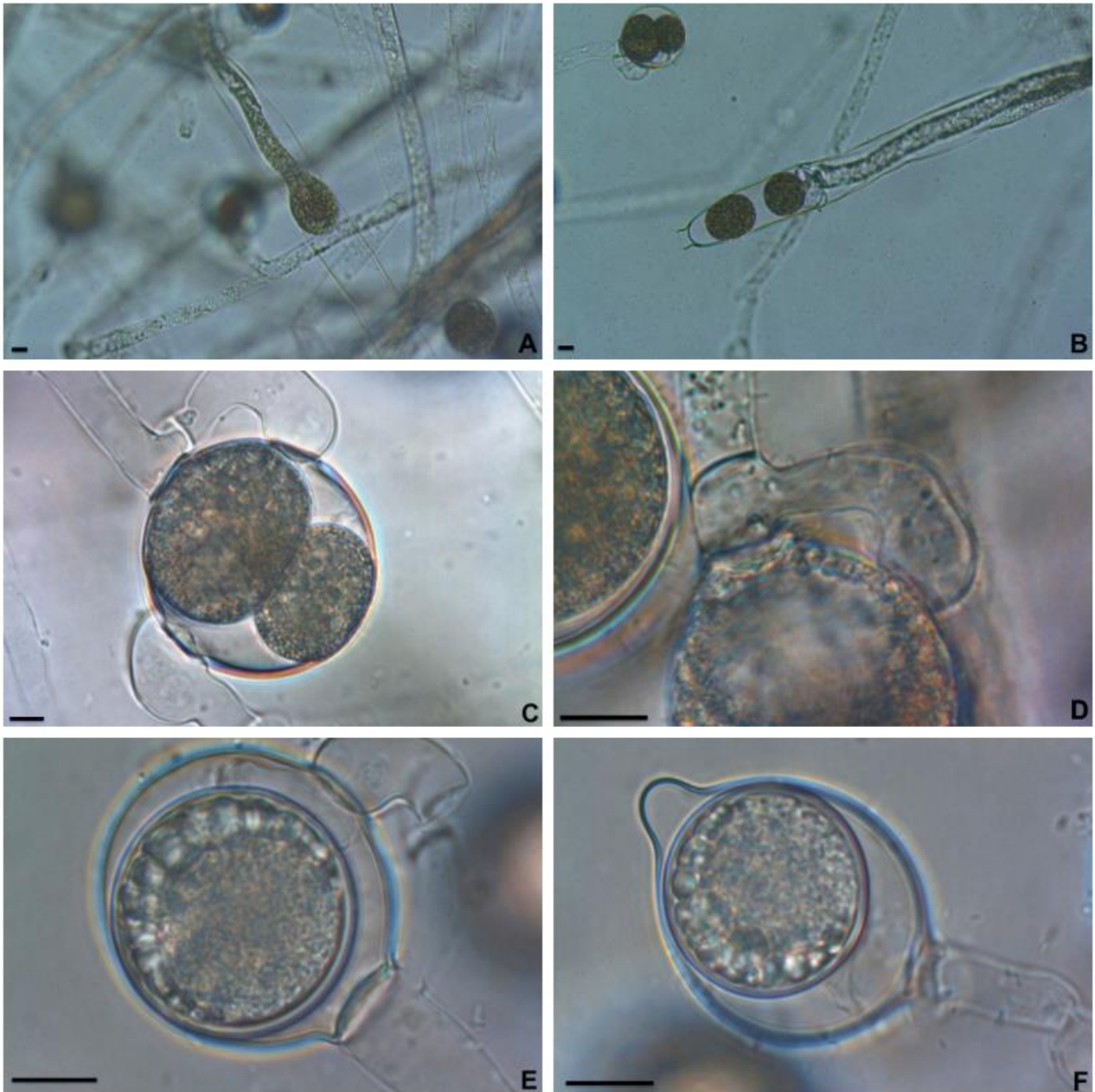


Figura 25. *Saprolegnia semihypogyna*. Zoosporângios com proliferação interna (A); formação de oogônios dentro do zoosporângio (B); anterídios andrógino (C) e semi-hipógino (D) e oogônios com a presença de oósporos subexcêntricos (E e F). Barra: 10,0 µm.

7.2 Análise filogenética da região ITS rDNA das espécies identificadas

A análise da região ITS rDNA com alguns isolados da ordem Saprolegniales (Figura 26) e com os espécimes coletados neste estudo confirmou a identificação morfológica que havia sido realizada previamente.

O isolado CCIBt 4158 identificado como *Saprolegnia ferax*, se agrupou em um clado com outros espécimes identificados como *S. ferax* disponíveis no GenBank com altos valores de bootstrap (99%) e de probabilidade posterior (1.00), contribuindo assim para a identificação do espécime e corroborando a identificação morfológica.

O espécime CCIBt 4096 identificado como *Saprolegnia semihypogyna* através de suas características morfológicas, principalmente devido a presença de anterídios hipóginos e semi-hipóginos e oósporos subexcêntricos, se agrupou em um clado juntamente com dois isolados de *S. semihypogyna* e alguns isolados de *S. eccentrica*, com 100% de bootstrap e 1.00 de probabilidade posterior. De acordo com a descrição original de *S. eccentrica* por Seymour (1970), esta espécie possui em sua maioria oósporos excêntricos e de acordo com as ilustrações do autor, também apresenta oósporos subexcêntricos. Entretanto, não há relatos de espécies que apresentem estes dois tipos de oósporos. Nesse sentido, deve ser considerada a possibilidade de erro na observação dos oósporos por Seymour (1970) e além disso, considerando o posicionamento filogenético de *S. eccentrica* juntamente com *S. semihypogyna*, deve-se pontuar a possibilidade de que estes dois táxons sejam sinônimos, sendo necessário análises mais detalhadas dos materiais tipos. Finalmente, considerando o posicionamento filogenético e a observação de somente oósporos subexcêntricos, o espécime CCIBt 4096 foi identificado como *S. semihypogyna*.

O isolado CCIBt 4079 identificado morfolologicamente como *Achlya hypogyna*, se agrupou em um clado juntamente com isolados do gênero *Protoachlya* disponíveis no GenBank com um valor de bootstrap de 100% e probabilidade posterior de 1.00. Dentro deste clado, observa-se a formação de dois sub-clados pequenos, sendo um formado por um isolado identificado como *Protoachlya* sp. coletado na Argentina juntamente com o isolado CCIBt 4079, com valor de

bootstrap de 86% e 0.90 de probabilidade posterior; e outro formado por dois isolados de *P. paradoxa*, com valor de bootstrap de 79% e 0.86 de probabilidade posterior. Embora a análise filogenética demonstre um agrupamento do isolado CCIBt 4079 juntamente com espécimes do gênero *Protoachlya* com altos valores de suporte, a identificação adotada até o momento para o táxon foi de *A. hypogyna* considerando que o mesmo não apresentou proliferação interna, o que é destacado na descrição de *P. hypogyna* por Shanor & Conover (1942). Nesse sentido, estudos com os materiais tipos de *A. hypogyna* e *P. hypogyna* devem ser feitos para se certificar quanto as características morfológicas destes dois táxons e possivelmente sinonimizá-los, considerando o posicionamento filogenético de *A. hypogyna* com espécies de *Protoachlya*. Vale ressaltar que Johnson *et al.* (2005) relatam que *A. hypogyna* e *P. hypogyna* são o mesmo táxon, fazendo uma nova combinação, *Protoachlya hypogyna* (Coker & Pemberton) T.W. Johnson & R.L. Seym., entretando esta combinação foi considerada inválida, pois já havia um táxon nomeado como *P. hypogyna* descrito por Shanor & Conover (1942).

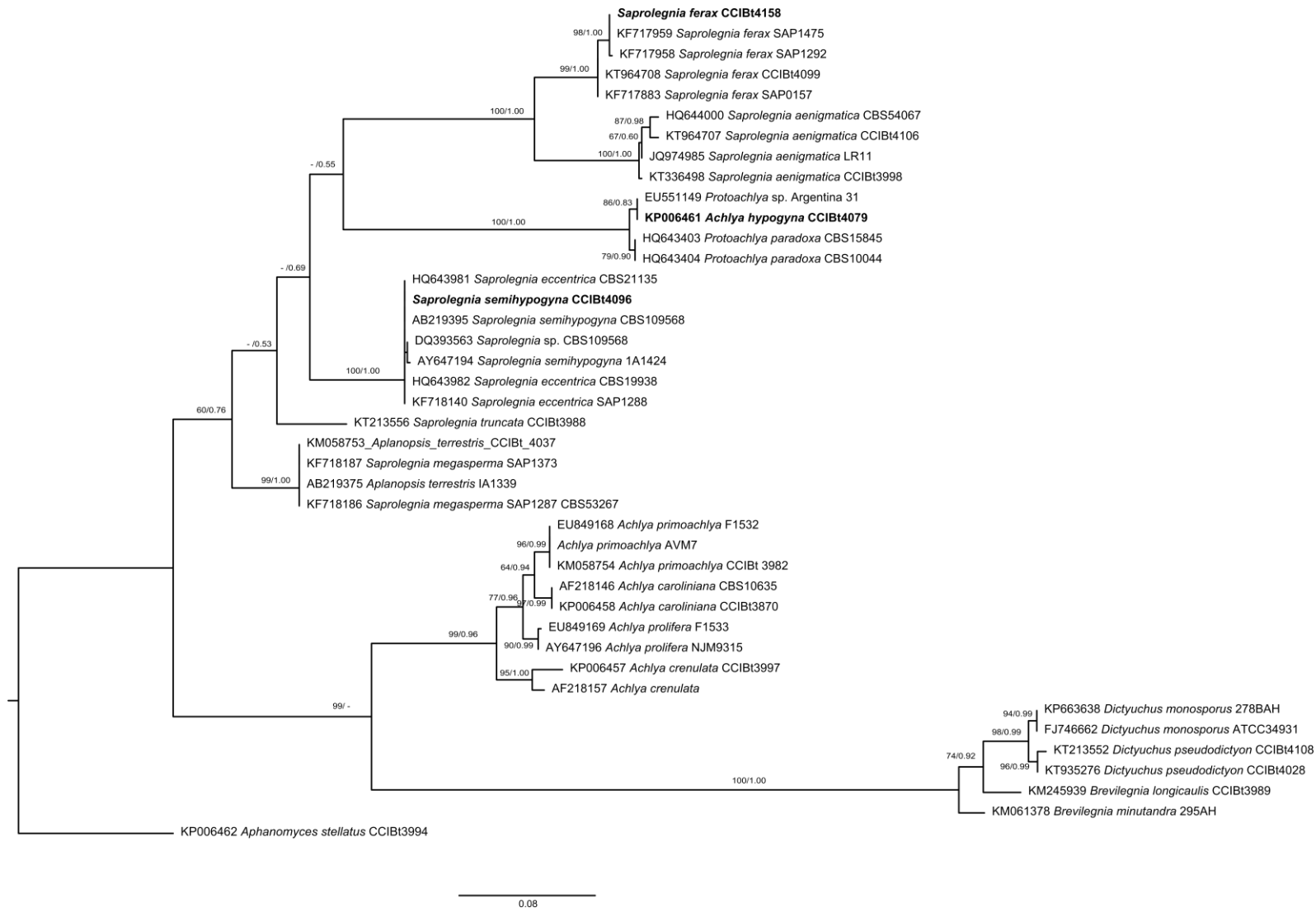


Figura 18. Arvore de máxima verossimilhança da região ITS rDNA com isolados de Saprolegniales. Valores de bootstrap > 50% são indicados numericamente, valores < que 50% são indicados com (-). Valores de probabilidade posterior > 0.50 são indicados numericamente, valores < 0.50 são indicados com (-). Clados não presentes na análise baesiana são indicados com (o) e a barra de escala representa o número de substituições por site.

CONCLUSÕES

Das 30 propriedades hidropônicas visitadas pôde ser constatado que as culturas mais produzidas são a alface (diversas variedades), rúcula e agrião. Dos produtores entrevistados, 96% relataram que já perderam a produção em algum momento devido a problemas causados por *Pythium* spp., sendo que na maioria da vezes os problemas ocorreram no verão. Diversos produtos químicos e biológicos são utilizados pelos produtores na tentativa de controlar surtos de podridão causados por *Pythium* spp. durante a produção hidropônica.

Das amostras coletadas e analisadas, foi possível isolar espécimes de *Pythium s. l.* dos quatro tipos de amostras, sendo a maioria dos isolados provenientes de raízes de hortaliças assintomáticas e solução nutritiva. Apesar de terem sido isolados dois espécimes de *Pythium s. l.* de água de poço artesiano, esta ainda é uma boa solução para abastecimento dos sistemas hidropônicos. Por outro lado, os produtores devem se atentar a qualidade do substrato utilizado, uma vez que este pode ser fonte introdutória de inóculo no sistema. Das seis marcas de substratos analisadas, em três foi possível isolar espécimes do gênero.

De todas as coletas foi possível isolar e identificar seis espécies de *Pythium* (*P. kashmirens*e, *P. middletonii*, *P. oopapillum*, *P. periplocum*, *P. segnitium* e *Pythium* sp.1) e duas espécies de *Phytopythium* (*Py. helicoides* e *Py. vexans*), além de isolados de *Pythium* do Grupo F e outros oomicetos (*Achlya hypogyna*, *Saprolegnia ferax* e *S. semihypogyna*). Destes, *P. kashmirens*e, *P. oopapillum* e *P. segnitium* são relatados pela primeira vez na América do Sul.

A patogenicidade *in vitro* de cinco espécies de *Pythium s. l.* foi testada demonstrando que *P. periplocum* e *Py. helicoides* podem, em condições de laboratório, causar morte das plântulas de rúcula e alface, respectivamente.

A prevenção da entrada de *Pythium* spp. nos sistemas é ainda a melhor solução para evitar surtos de podridão de raiz causada por este organismo, sendo que técnicas básicas de higiene são a melhor forma de manter o sistema limpo e livre do patógeno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bala K., Robideau, G. P., Désaulniers, N., de Cock A. W. A. M., Lévesque, C. A.** 2010b. Taxonomy, DNA barcoding and phylogeny of three new species of *Pythium* from Canada. *Persoonia* 25:22–31.
- Bala, K., Robideau, G. P., Lévesque, C. A., de Cock, A. W. A. M., Abad, Z. G., Lodhi, A. M., Shahzad, S., Ghaffar, A., Coffey, M. D.** 2010a. *Phytopythium* Abad, de Cock, Bala, Robideau & Lévesque, gen. nov. and *Phytopythium sindhum* Lodhi, Shahzad & Lévesque, sp. nov. *Persoonia* 24:136–137
- Baptista, F. R.** 2007. *Pythium middletonii* Sparrow e *Pythium dissotocum* Drechsler em alface (*Lactuca sativa* L.): avaliação patogênica e controle biológico. Dissertação de Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Instituto de Botânica, São Paulo.
- Baptista, F. R., Pires-Zottarelli, C. L. A., Teixeira, L. D. & Santos-Júnior, N. A.** 2011. Avaliação patogênica *in vitro* de *Pythium middletonii* Sparrow e *Pythium dissotocum* Drechsler em alface. *Summa Phytopathologica* 37: 52-58.
- Baten, M. D. A., Asano, T., Motohashi, K., Ishiguro, Y., Rahman, M. Z., Inaba, S., Suga, H., Kageyama, K.** 2014. Phylogenetic relationships among *Phytopythium* species, and re-evaluation of *Phytopythium fagopyri* com. nov., recovered from damped off buckwheat seedling in Japan. *Mycological Progress* 13:1145-1156.
- Baten, M. D. A., Mingzhu, L., Motohashi, K. Ishiguro, Y., Rahman, S., Suga, H., Kageyama, K.** 2015. Two new species, *Phytopythium iriomotense* sp. nov. and *Phytopythium aichiense* sp. nov., isolated from river water and water purification sludge in Japan. *Mycological Progress* 14:1–12.
- Bayer.** 2015. Disponível: <http://www.bayer.com.br> (acesso em Dezembro de 2015).
- Beakes G. W., Honda D., Thines M.** 2014. Systematics of the Labyrinthulomycota, Hyphochytriomycota and Oomycota. In: McLaughlin DJE, Spatafora JW (eds) *The Mycota*, vol

7a. Springer, Heidelberg, pp 39–97.

Beltrão, J.; Trindade, D.; Correia, P.J. 1997. Lettuce yield response to salinity of sprinkle irrigation water. *Acta Horticulturae* 449: 623-627.

Calvano T. P., Blatz, P. J., Vento, T. J., Wickes, B. L., Sutton, D. A., Thompson, E. H., White, C. E., Renz, E. M., Hospenthal. 2011. *Pythium aphanidermatum* infection following combat trauma. *Journal of Clinical Microbiology* 49:3710–3713.

Castillo-Múnera, J. D. 2015. Characterization, population genetics and management of *Pythium* spp. from floriculture crops in Michigan. Tese de Doutorado em Plant Pathology, Michigan State University, Estados Unidos.

Coker, W. C. & Pemberton, J. D. 1908. A new species of *Achlya*. *Botanical Gazette* Crawfordsville. 45(3): 194-196.

De Cock, A. W. M., Lodhi, A. M., Rintoul, T. L., Bala, K., Robideau, G. P., Abad, Z. G., Coffey, M. D., Shahzad, S., Lévesque, C. A. 2015. *Phytopythium*: molecular phylogeny and systematics. *Personia* 34: 25–39.

Drechsler, C. 1930. Some new species of *Pythium*. *Journal of the Washington Academy of Sciences* 20: 398-418.

Filgueiras, R. C.; Takahashi, H.W.; Beninni, E. R. Y. 2002. Produção de alface hidropônico em diferentes condutividades elétricas. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 23(2):157-164.

FMC Agricola. 2015. Disponível: <https://www.fmcagricola.com.br> (acesso em Junho de 2015).

Frezzi, M. J. 1956. Espécies de *Pythium* fitopatógenas identificadas en la República Argentina. *Revista de Investigaciones Agrícolas* 10:113-241.

Furlani, P.R. 1996. Hidroponia. Instituto Agronômico de Campinas, Boletim Técnico. 100: 1-277.

Furlani, P.R. 1999. Hydroponic vegetable production in Brazil. *Acta Horticulturae* 481:777-778.

Guindon, S. & O. Gascuel 2003. A Simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by Maximum Likelihood. *Systematic Biology* 52:679–704.

Gull, C., Labuschagne, N. & Botha, W. J. 2004. *Pythium* species associated with wilt and root of

- hydroponically grown crops in South Africa. *African Plant Protection* 10:109-116.
- Herrero, M. L., Hermansen, A. & Elen, O. N.** 2003. Occurrence of *Pythium* spp. and *Phytophthora* spp. in Norwegian greenhouses and their pathogenicity on cucumber seedlings. *Journal of Phytopathology* 151:36–41.
- Hidrogood.** 2015. Disponível em <http://www.hidrogood.com.br> (acesso em Junho de 2015).
- Inaba, S., Tokumasu, S.** 2002. *Saprolegnia semihypogyna* sp. nov. a saprolegniaceous oomycete isolated from soil in Japan. *Mycoscience* 43: 73–76.
- Ishiguro, Y., Otsubo, K., Watanabe, H., Suzuki, M., Nakayama, K., Fukuda, T., Fujinaga, M., Suga, M., Kageyama, K.** 2014. Root and crown rot of strawberry caused by *Pythium helicoides* and its distribution in strawberry production areas of Japan. *Journal of General Plant Pathology*. 80: 423-429.
- Jenkins, S.F. & Averre, C.W.** 1983. Root diseases of vegetables in hydroponic culture systems in North Carolina greenhouses. *Plant Disease* 67(9): 968–970.
- Johnson, Jr T. W., Seymour, R. L., Padgett, D. E.** 2002. Biology and systematics of Saprolegniaceae.
- Johnson Jr., T. W., Seymour, R. L., Padgett, D. E.** 2005. Systematics of the Saprolegniaceae: New combinations. *Mycotaxon* 92:11-32.
- Kageyama, K.** 2014. Molecular taxonomy and its application to ecological studies of *Pythium* species. *Journal of General Plant Pathology* 80: 314-326.
- Kageyama, K., Aoyaagi, T., Sunouchi, R., Fukui, H.** 2002. Root rot of miniature rose caused by *Pythium helicoides*. *Journal of General Plant Pathology*. 68: 15-20.
- Kazutaka, K. & M. Daron.** 2013. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. Disponível em: <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server>.
- Labhidro.** 2015. Hidroponia. Disponível: <http://www.labhidro.cca.ufsc.br> (acesso em Dezembro de 2015).
- Lamour K. & Finley L.** 2006. A strategy for recovering high quality genomic DNA from a large

- number of *Phytophthora* isolates. *Mycologia* 98:514-517.
- Lévesque, C. A. & de Cock A. W. A. M.** 2004. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycological Research* 108:1363–1383.
- Lopes, C. A.** 2003. Manejo integrado de doenças em cultivos hidropônicos. *Fitopatologia Brasileira* 28:195-197.
- Lopes, C. A., Carrijo, O. A. & Makishima, N.** 2005. Contaminação com patógenos em sistema hidropônico: como aparecem e como evitar. Circular Técnica 31. Embrapa Hortaliças, Brasília, DF.
- Lopes, C. A., Silva, J. B. C. & Guedes, I. M. R.** 2015. Doenças em cultivos hidropônicos e medidas de controle. Comunicado Técnico 107. Embrapa Hortaliças, Brasília, DF.
- Maia, L. C., Carvalho Júnior, A. A., Cavalcanti, L. H. , Gugliotta, A. M., Drechsler-Santos, E. R., Santiago, A. L. M. A., Caceres, M. E. S., Gibertoni, T. B., Aptroot, A., Giachini, A. J., Soares, A. M. S., Silva, A. C. G., Goto, B. T., Lira, C. R. S., Montoya, C. A. S., Pires-Zottarelli, C. L. A., Silva, D. K. A., Soares, D. J., Rezende, D. H. C., Luz, E. D. M. N., Gumboski, E. L., Wartchow, F. Karstedt, F., Freire, F. M., Coutinho, F. P., Melo, G. S. N., Sotao, H. M. P., Baseia, I. G., Pereira, J., Oliveira, J. J. S., Souza, J. F. Bezerra, J. L., Araujo-Neta, L. S., Pfenning, L. H., Gusmao, L. F. P., Neves, M. A., Capelari, M., Jaeger, M. C. W., Pulgarin, M. P., Menolli JR, N., Medeiros, P. S., Friedrich, R. C. S., Chikowski, R. S., Pires, R. M., Melo, R. F., Silveira, R. M. B., Urrea-Valencia, S., Cortez, V. G., Silva, V. F.** 2015. Diversity of Brazilian Fungi. *Rodriguésia* (Impresso) 64: 1033-1045.
- Marano, A.V., Jesus, A.L, De Souza, J. I., Leño, E. M., James, T. Y., Jerônimo, G. H., de Cock, A. W. A. M., Pires-Zottarelli, C. L. A.** 2014. A new combination in *Phytopythium*: *P. kandeliae* Oomycetes, Straminipila). *Mycosphere* 5: 510–522.
- Martin F. N. & Loper J. E.** 1999. Soilborne plant diseases caused by *Pythium* spp.: ecology, epidemiology, and prospects for biological control. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18:111-181.

- Mcleod A., Botha, W. J., Meitz, J. C., Sples, C. F. J., Tewoldemedhin, Y. T., Mostert, L.** 2009. Morphological and phylogenetic analyses of *Pythium* species in South Africa. *Mycological Research* 113: 933–951.
- Middleton, J. T.** 1943. The taxonomy, host range and geographic distribution of the genus *Pythium*. *Memoirs of the Torrey Botanical Club* 20: 1-171.
- Milanez, A.I.** 1989. Fungos de águas continentais. *In*: O. Fidalgo & V.L. Bononi (coords.). Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico. Instituto de Botânica, São Paulo, pp. 17-20
- Miranda, F. R., Mesquita, A. L. M., Martins, M. V. V., Fernandes, C. M. F., Evangelista, M. I. P., Sousa, A. A. P.** 2011. Produção de tomate em substrato de fibra de coco. Fortaleza, Embrapa Agroindústria Tropical. Circular Técnica, 33, 20 p.
- Nascimento, W. M., Croda, M. D., Lopes, A. C. A.** 2012. Produção de sementes, qualidade fisiológica e identificação de genótipos de alface termotolerantes. *Revista brasileira de sementes*, 34 (3): 510-517.
- Patekoski, K. S. & Pires-Zottarelli, C.L.A.** 2010. Patogenicidade de *Pythium aphanidermatum* a alface cultivada em hidroponia e seu biocontrole com *Trichoderma*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 45: 805-810.
- Patekoski, K. S.** 2010. Patogenicidade e controle biológico de *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. em variedades de alface (*Lactuca sativa* L.) em sistema hidropônico. Dissertação de Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Instituto de Botânica, São Paulo.
- Paul, B.** 1999. *Pythium periplocum*, an aggressive mycoparasite of *Botrytis cinerea*, causing the gray mould disease of grape-vine. *FEMS Microbiology Letters* 181: 277-280.
- Paul, B.** 2002. *Pythium segnitium* sp. nov., isolated from the Canary islands, its taxonomy, ITS region of rDNA, and its comparison with related species. *FEMS Microbiology Letters* 217: 207–212.

- Paul, B.** 2008. A new species of *Pythium* with inflated sporangia and coiled antheridia, isolated from India. *FEMS Microbiology Letters* 282: 251–257.
- Pinto, Z. V., Cipriano, M. A. P., Galvão, J. A. H., Bettiol, W., Patricio, F. R. A. & Santos, A.A.** 2011. Podridão de raízes causada por *Pythium aphanidermatum* em cultivares de alface produzidas em sistema hidropônico. *Summa Phytopathologica*. 37:180-186.
- Pinto, Z. V., Sousa, A. L. O. P., Silva, C. P., Duarte, D. G., Patrício, F. R. A., Santos, A. S. & Teixeira, L. D.** 2005. Reação de cultivares de alface à podridão de raízes, causada por *Pythium helicoides*, em sistemas hidropônicos. *Summa Phytopathologica* 31: 96.
- Pires-Zottarelli, C. L. A.** 2016. *Pythiales* em Lista de espécies da Flora do Brasil. Disponível em <http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br> (acesso em Janeiro de 2016).
- Plaats-Niterink, A. J. van der.** 1981. Monograph of the genus *Pythium*. *Studies in Mycology* 21. 242 p.
- Posada, D.** 2008: jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253–1256.
- Ribeiro, W. R. C. & Butler, E. E.** 1995. Comparison of the mycoparasites *P. periplocum*, *P. acanthicum* and *P. oligandrum*. *Mycological Research* 99(8): 963-969.
- Robideau, G. P., de Cock, A. W. A. M., Coffey, M. D., Voglmayr, H., Brouwer, H., Bala, K., Chitty, D. W., Désaulniers, N., Eggertson, Q. A., Gachon, C. M. M., Hu, C. H., Küpper, F. C., Rintoul, T. L., Sarhan, E., Verstappen, E. C. P., Zhang, Y., Bonants, P. J. M., Ristaino, J. B. & Lévesque, A. C.** 2011. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular and Ecological Resources* 11: 1002-1011.
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P.** 2003. Mrbayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 19:1572–1574.
- Roy, S. G. & Hong, C. X.** 2008. The first finding of *Pythium* root rot and leaf blight of elephant foot yam (*Amorphophallus paeonifolius*) in India. *Plant Pathology* 57:369.

- Sandoval-Sierra, J.V., Martín, M.P., Diéguez-Uribeondo, J.** 2014. Species identification in the genus *Saprolegnia* (Oomycetes): defining DNA-based molecular operational taxonomic units. *Fungal Biology* 118: 559–578.
- Senda, M., Kageyama, K., Suga, H. & Levésque, C.A.** 2009. Two new species of *Pythium*, *P. senticosum* and *P. takayamanum*, isolated from cool-temperate forest soil in Japan. *Mycologia* 101:439-448.
- Seymour, R. L.** 1970. The genus *Saprolegnia*. *Nova Hedwigia*. 19 (1-2): 1-124
- Shanor, L. & Conover, R. A.** 1942. A new Protoachlya. *The American Midland Naturalist*. 28:746-751
- Silva, M. S. C. da & Lima Neto, V. da C.** 2007. Doenças em cultivos hidropônicos de alface na região metropolitana de Curitiba/PR. *Scientia Agraria* 8:275-283
- Sparrow, F. K.** 1943. Aquatic Phycomycetes, exclusive of the Saprolegniaceae and *Pythium*. Univ. Michigan Press, Ann Arbor; Humphrey Milford, London; and Oxford University Press.
- Sparrow, F. K. Jr.** 1960. Aquatic Phycomycetes. The University Michigan Press, Michigan, 1187p.
- Stanghellini, M.E. & Kronland, W.C.** 1986. Yield loss in hydroponically grown lettuce attributed to subclinical infection of feeder rootlets by *Pythium dissotocum*. *Plant Disease* 70:1053–1056.
- Stanghellini, M.E. & Rasmussen, S.L.** 1994. Hydroponics: a solution for zoosporic pathogens. *Plant Disease* 78:1129–1137.
- Sutton, J. C., Sopher, C. R., Owen-Going, T. N., Liu, W., Grodzinsk, B., Hall, J. C. & Benchimol, R. L.** 2006. Etiology and epidemiology of *Pythium* root rot in hydroponic crops: Current knowledge and perspectives. *Summa Phytopathologica* 32:307-321.
- Sutton, J.C., Sopher, C.R., Owen-Going, T.N., Liu, W., Grodzinsk, B., Hall, J.C. & Benchimol, R.L.** 2006. Etiology and epidemiology of *Pythium* root rot in hydroponic crops: Current knowledge and perspectives. *Summa Phytopathologica* 32:307-321.
- Syngenta.** 2015. Disponível em <https://www.syngenta.com> (acesso em Julho de 2015).

- Tao, Y. H., Zeng, F., Ho, H. N., Wei, J. G., Wu, Y. X., Yang, L. L., He, Y. Q.** 2011. *Pythium vexans* causing stem rot of *Dendrobium* in Yunnan Province, China. *Journal of Phytopathology* 159: 255-259.
- Teixeira-Yañez, L.D.D.** 2000. Identificação, Patogenicidade e Sensibilidade a produtos químicos in vitro de espécies de *Pythium* de cultura hidropônica de alface (*Lactuca sativa* L.). Dissertação de Mestrado em Fitopatologia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – USP, Piracicaba.
- Teixeira, L.D.D., Pires-Zottarelli, C.L.A. & Kimati, H.** 2006. Efeito da temperatura no crescimento micelial e patogenicidade de *Pythium* spp. que ocorrem em alface hidropônica. *Summa Phytopathologica* 32: 221–226.
- Thines M.** 2014. Phylogeny and evolution of plant pathogenic oomycetes – a global overview. *European Journal of Plant Pathology* 138: 431–447.
- Tudo Hidroponia.** 2015. Disponível: <http://www.tudohidroponia.net> (acesso em Dezembro de 2015).
- Utkhede, R.S.; Levesque, C.A. & Dinh. D.** 2000. *Pythium aphanidermatum* root rot in hydroponically grown lettuce and the effect of chemical and biological agents on its control. *Canadian Journal of Plant Pathology* 22: 138-144.
- Uzuhashi, S., Tojo, M., Kakishima, M.** 2010. Phylogeny of the genus *Pythium* and description of new genera. *Mycoscience* 51: 337– 365
- Vanachter, A. & Leuven, K.U.** 1995. Development of *Olpidium* and *Pythium* in the nutrient solutions of NFT grown lettuce, and possible control methods. *Acta Horticulturae* 382: 187-196.
- Vawdrey, L. L., Langdon, P., Martin, T.** 2005. Incidence and pathogenicity of *Phytophthora palmivora* and *Pythium vexans* associated with durian decline in far northern Queensland. *Australasian Plant Pathology*, 34: 127-128.
- Vida, J. B., Zambolim, L., Tessmann, D. J., Brandão Filho, J. U. T., Verzignassi, J. R. & Caixeta, M.P.** 2004. Manejo de Doenças de Plantas em Cultivo Protegido. *Fitopatologia Brasileira* 29: 355–372.

- Waterhouse, G.** 1967. Key to *Pythium* Pringsheim. Mycological Papers 109: 1-15.
- Weiland, J. E., Beck, B. R., Davis, A.** 2013. Pathogenicity and Virulence of *Pythium* species obtained from forest nursery soils on Douglas-Fir seedlings. Plant Disease 97(6): 744-748.
- Zeng, H. C., Ho, H. H., Zheng, F. C.** 2005. *Pythium vexans* causing patch canker of rubber trees on Hainan Island, China. Mycophatologia 159: 601-606.
- Zheng, J.; Sutton, J.C. & Yu, H.** 2000. Interactions among *Pythium aphanidermatum*, roots, root mucilage, and microbial agents in hydroponic cucumbers. Canadian Journal of Plant Pathology 22(4): 368-379.
- Zitnick-Anderson, K. & Nelson Jr., B. D.** 2015. Identification and pathogenicity of *Pythium* on soybean in North Dakota. Plant Disease 99(1): 31-38.