



**MECANISMOS DE AÇÃO E
ATIVIDADE DE FRAÇÕES DO
LEITE NO CONTROLE BIOLÓGICO
DO OÍDIO DA ABOBRINHA**

**FLÁVIO HENRIQUE VASCONCELOS DE
MEDEIROS**

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2005

FLÁVIO HENRIQUE VASCONCELOS DE MEDEIROS

**MECANISMOS DE AÇÃO E ATIVIDADE DE FRAÇÕES DO LEITE
NO CONTROLE BIOLÓGICO DO OÍDIO DA ABOBRINHA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Lavras como parte das exigências do Curso de
Mestrado em Fitopatologia, para a obtenção do
título de “Mestre”.

Orientador

Dr. Wagner Bettiol

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

2005

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Medeiros, Flávio Henrique Vasconcelos de

Mecanismos de ação e atividade de frações do leite no controle biológico do oídio da abobrinha / Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros. -- Lavras : UFLA, 2006.

64p. : il.

Orientador: Wagner de Ebbtiol.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Podosphaera xanthii. 2. Abobrinha. 3. Leite. 4. Mecanismos de ação. 5. Oídio. 6. Produto alternativo. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.62

FLÁVIO HENRIQUE VASCONCELOS DE MEDEIROS

**MECANISMOS DE AÇÃO E ATIVIDADE DE FRAÇÕES DO LEITE
NO CONTROLE BIOLÓGICO DO OÍDIO DA ABOBRINHA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Fitopatologia, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 16 de dezembro de 2005

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza

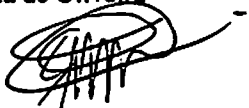
UFLA

Prof. Dr. Eduardo Alves

UFLA

Prof. Dr. Luiz Edson Motta de Oliveira

UFLA



Dr. Wagner Bettiol
EMBRAPA/CNPMA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais,

Hamurabi e Paula;

pelo incansável estímulo aos

estudos e exemplo de sucesso,

OFEREÇO

À minha esposa Fernanda,

fonte eterna de minha inspiração que,

mesmo à distância, sempre me ajudou

a enfrentar os problemas mais impossíveis;

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia, por proporcionarem a realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro concedido para a realização do curso.

À Embrapa Meio Ambiente, pela oportunidade de desenvolver o trabalho de dissertação para tudo o que foi necessário.

Ao Dr. Wagner Bettiol, pela confiança desde os primeiros contatos, compreensão nos tantos erros e acertos obtidos e, principalmente, pela amizade construída ao longo do mestrado.

Ao professor Ricardo Magela, pela “adoção” durante o período de disciplinas e compreensão em todos os momentos em que solicitei sua ajuda no decorrer do curso.

Aos técnicos e professores do Departamento de Fitopatologia de UFLA, pelo apoio e amizade.

Aos técnicos, pesquisadores e colegas de trabalho da Embrapa Meio Ambiente, pela acolhida fraterna durante quase um ano de convivência amigável.

À minha turma de mestrado e colegas de curso pela amizade e espírito de equipe, indispensáveis para realização desta pesquisa.

A todos aqueles que, em maior ou menor grau, contribuíram dando sugestões e ajudando nos trabalhos, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

| | |
|---|------------|
| RESUMO | i |
| ABSTRACT | iii |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 3 |
| 2.1 O oídio e sua importância | 3 |
| 2.2 Etiologia e sintomatologia do oídio em cucurbitáceas | 4 |
| 2.3 Métodos de controle disponíveis | 5 |
| 2.4 O leite no controle de oídio | 8 |
| 2.5 Microbiota associada ao controle do oídio: o leite como regulador e fonte de microrganismos | 10 |
| 2.6 Técnicas de visualização da superfície foliar | 13 |
| 2.7 Composição do leite e atividade no controle do oídio | 15 |
| 2.8 Fontes de leite e o tratamento térmico | 17 |
| 2.9 Efeito do tratamento com leite no desenvolvimento do oídio | 18 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 20 |
| 3.1 Envolvimento de fungos e bactérias do filoplano das plantas de abobrinha tratadas com leite no controle do oídio | 20 |
| 3.1.1 Relação entre flutuação da comunidade de bactérias e fungos não fastidiosos na superfície foliar e severidade do oídio | 20 |
| 3.1.2 Eficiência de bactérias e fungos do filoplano de plantas tratadas com leite no controle do oídio | 22 |
| 3.2 Atividade fungicida do leite | 24 |
| 3.3 Alterações morfológicas por microscopia eletrônica de varredura de folhas infectadas e tratadas com água, fungicida e leite | 25 |
| 3.4 Efeito do leite na germinação e na esporulação de oídio | 27 |

| | |
|---|-----------|
| 3.5 Atividade de frações e níveis de esterilização do leite no controle do oídio | 28 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 31 |
| 4.1 Envolvimento de fungos e bactérias do filoplano de plantas de abobrinha tratadas com leite no controle do oídio | 31 |
| 4.2 Atividade fungicida do leite | 35 |
| 4.3 Alterações morfológicas por microscopia eletrônica de varredura de folhas infectadas e tratadas com água, fungicida e leite | 36 |
| 4.4 Efeito do leite na germinação e na esporulação de oídio | 44 |
| 4.5 Atividade de frações e níveis de esterilização do leite no controle do oídio..... | 45 |
| 5 CONCLUSÕES | 49 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 50 |

RESUMO

MEDEIROS, Flávio Henrique Vasconcelos de. **Mecanismos de ação e atividade de frações do leite no controle biológico do oídio da abobrinha.** 2005. 64p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Trabalhos têm mostrado que o leite de vaca é eficiente no controle do oídio, mas são poucos os estudos sobre os mecanismos de ação. O objetivo deste trabalho foi estudar o envolvimento de microrganismos epifíticos após aplicação de leite no controle do oídio; sua germinação e esporulação em aplicações preventivas ou germinação quando da exposição prolongada; verificar alterações na superfície foliar da abobrinha após a aplicação de leite e avaliar fontes e frações do leite no controle a doença. No primeiro ensaio, plantas tratadas com leite a 30% (v/v), água ou fungicida, no início e a cada três (leite e água) ou seis dias (fungicida), foram amostradas aos 5, 8 e 11 dias após a primeira aplicação (DAPA), passadas em sonicador 5 minutos, diluídas em série até 10^{-5} (v/v), plaqueadas seletivamente para quantificação de bactérias ou fungos, incubadas e contadas a partir das 12 horas as unidades formadoras de colônias por mL e área foliar ($\text{ufc}/(\text{mL}/\text{cm}^2)$). Estes dados foram transformados para \log_{10} e calculada a área abaixo da curva de progresso (AACP) das populações de microrganismos. A partir de dados de porcentagem média de área foliar infectada foi calculada a AACP da doença. Para o segundo ensaio, discos de folhas, tratadas como mencionado, foram amostrados, clareados, fixados e montados e nos tempos de 24, 48 e 72 horas, tendo avaliada a germinação e às 120 horas foi avaliado o número de conidióforos. No terceiro ensaio, suspensões de oídio foram incubadas por 1 hora em leite de vaca autoclavado a 0%, 5%, 10%, 30% e 50% (v/v) e pulverizadas sobre plantas sadias. Após sete (folhas tratadas) e quatorze dias (folhas tratadas e não tratadas) foi avaliado o número de colônias de oídio por folha. Os dados foram submetidos à análise de variância e ajustados a modelos de regressão. Realizaram-se, ainda, amostragens de folhas de plantas tratadas semelhante ao primeiro ensaio, as 0, 24, 48, 72 horas e 6, 12 e 15 DAPA. Os discos foram fixados em Karnovsky até processamento padrão para microscopia eletrônica de varredura. No último ensaio, compararam-se leite cru, pasteurizado, UHT e UHT desnatado e as frações lactose, principais cátions, cloro e fósforo em concentrações equivalentes a 30% (v/v) daquela encontrada no leite. A água foi usada como controle e as pulverizações foram realizadas de forma semelhante ao primeiro ensaio, sendo avaliada a porcentagem média de área foliar infectada aos 5, 8 e 11 DAPA por planta e calculada a AACP da doença. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias

comparadas pelo teste de Tukey ($p=0,05$). A população de bactérias aumentou significativamente após a aplicação de leite e estas estão envolvidas no controle do oídio. O leite demonstrou ação fungicida e o efeito foi maior com o aumento da concentração do produto inclusive na folha não tratada. Não foi observada inibição da germinação ou esporulação em aplicações preventivas. O leite cru e o pasteurizado foram os mais eficientes e a lactose semelhante ao leite UHT no controle do oídio. Nenhum dos sais ou caseína foi efetivo.

Comitê Orientador: Wagner Bettiol – EMBRAPA/CNPMA (Major Professor),
Ricardo Magela de Souza - UFLA

ABSTRACT

MEDEIROS, Flávio Henrique Vasconcelos de. **Mechanisms of action and activity of fractions of milk in the biological control of powdery mildew in cucurbit.** 2005. 64p. Dissertation (Master in Phytopathology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Works proved the efficacy of cow milk is efficient in the control of powdery mildew but there is a lack of research on the mechanisms by which it works. The aim of this work was to study the participation of epiphyte microorganisms in the powdery mildew control; on its germination and sporulation on preventive sprays or germination after a longer exposure; changes on leaf surface by milk delivery and evaluation of sources and fractions of milk on the disease control. In the first assay, plants treated with milk 30%(v/v), water or fungicide, at the beginning and after three (milk and water) or six (fungicide) days, were sampled at 5, 8 and 11 days after the first spray (DAFS), passed through sonicator for 5 min, serially diluted to 10^{-5} (v/v), selectively plated for bacterium and fungus and quantified from 12h incubation onwards to determine the colonies forming units per mL and leaf area (cfu/(mL.cm²)). These data were transformed to log₁₀ and calculated the area under the microorganisms population progress curves (AUMPPC) and from the average percent infected leaf area, it was calculated a similar area for disease (AUDPC). For the second assay, disks of leaves treated similarly to the first one, were sampled, cleared off, fixed and mounted. At samplings at 24, 48 and 72h, germination was accessed and at 120h the number of conidiophores. At the third assay, suspensions of powdery mildew were incubated for 1h in autoclaved cow milk at concentrations of 0; 5; 10; 30 e 50%(v/v) and sprayed on health leaves, after seven days (treated) and fourteen days (treated and untreated), colonies per leaf were accessed at the treated and untreated leaves, respectively. Data were submitted to variance analysis and adjusted to a regression model. For the fourth assay, samplings of leaves treated similarly to the first one were performed at 0, 24, 48, 72h and 6, 12, 15 DAFS. Disks were fixed in Karnovsky until regular processing for scanning electronic microscopy. In the last assay, it was compared raw, pasteurized, UHT, skim UHT and fractions lactose, main cations, chloride and phosphorus in concentrations equivalent to 30% (v/v) the one found in milk. Water was used as a control and sprays performed similarly to the first assay, assessed the average percent infected leaf area at 5, 8 e 11 DAFS per plant and calculated the AUDPC. Unless mentioned, in all trials, data was submitted to variance analysis and means compared by Tukey's test (p=0,05). Bacterial population

significantly increased after milk treatment and they potentially controlled powdery mildew. Milk showed fungicide activity, which was higher as the product concentration increased in either treated or untreated leaves. It was not observed inhibition of germination or sporulation at preventive sprays. Raw and pasteurized milk were the most efficient sources and lactose similarly efficient to UHT milk. None of the salts or casein displayed significant control.

Guidance Committee: Wagner Bettiol – EMBRAPA/CNPMA (Major Professor), Ricardo Magela de Souza - UFLA

1 INTRODUÇÃO

A família das Cucurbitaceae abriga espécies de plantas cultivadas de grande importância econômica, como melão, melancia, pepino, abóbora e abobrinha. O cultivo destas plantas é realizado em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo. Contudo, várias são as perdas decorrentes do ataque de pragas e doenças. Dentre elas, o oídio é aquela com ocorrência mais amplamente relatada. Em temperaturas amenas e umidade relativa alta, sem água livre na superfície foliar, são observadas as maiores perdas decorrentes desta doença.

O controle de doenças de cucurbitáceas é feito, principalmente, pelo uso de fungicidas e o oídio é a doença de cucurbitáceas para a qual existe o maior número de produtos registrados no Brasil. No entanto, com o conhecimento atual sobre os problemas relacionados à intoxicação do homem e sobre os impactos ambientais, assim como a perda de eficiência dos agrotóxicos usados, pesquisas têm sido direcionadas para a busca de produtos alternativos de baixo custo e inócuos ao homem e ao ambiente (Stadnik & Rivera, 2001). Neste contexto, Bettioli et al. (1999) descobriram o potencial do leite como alternativa para o controle do oídio da abobrinha. Posteriormente, foi comprovada a sua eficiência no controle do oídio da videira (Crisp et al., 2002), do trigo (Drury et al., 2003) e do eucalipto (Santos et al., 2003). Apesar de ter sido desenvolvido para a agricultura orgânica, principalmente produtores convencionais vêm adotando este produto no controle de oídios. Ele atende aos principais requisitos desejáveis de um produto alternativo: custo equivalente ou inferior aos dos fungicidas recomendados (Crisp et al., 2004): é encontrado em qualquer lugar do mundo, muitas vezes na própria propriedade e é inócuo ao homem e ao ambiente, sem período de carência, por ser um alimento.

Bettiol et al. (1999) sugeriram, como possíveis mecanismos de ação, a atividade germicida direta sobre o patógeno, a indução de resistência do hospedeiro ou o estímulo de potenciais antagonistas. Stadnik & Bettiol (2001) não encontraram resposta de indução de resistência, mas comprovaram a redução no desenvolvimento de colônias de oídio (número, tamanho e taxa de esporulação). Estes autores, assim como Crisp et al. (2004), comprovaram o potencial do leite no estímulo da microbiota epifítica. Estes últimos também observaram alterações na morfologia de hifas e conídios em videiras tratadas. Em relação à eficiência de frações do leite, até então foi comprovada a atividade do soro, gordura e lactoferrina (Crisp et al., 2004). Apesar da ampla utilização do leite e da sua eficiência no controle do oídio e dos conhecimentos em relação aos mecanismos de ação, atividade de frações e fontes do leite ainda não são conclusivos. É imprescindível continuar os estudos nesta direção para que se possa fazer uma recomendação de uso a fim de garantir a sustentabilidade da técnica e também verificar a possibilidade de obter frações do leite que apresentem menor custo e maior facilidade de uso.

Este trabalho teve por objetivos: quantificar a população de microrganismos e sua eficiência de controle do oídio após aplicação de leite; estudar as alterações na superfície foliar de plantas tratadas com leite; verificar a atividade de frações e fontes de leite; e avaliar a ação direta do leite sobre o ciclo de vida do patógeno.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O oídio e sua importância

Os oídios são fungos parasitas biotróficos de plantas e formam colônias esbranquiçadas, de aspecto pulverulento, sobre as superfícies da parte aérea de seus hospedeiros (Stadnik & Rivera, 2001). Plantas pertencentes às diversas famílias botânicas têm pelo menos uma espécie de oídio que potencialmente as parasita. Dentre elas, podem-se citar alguns patossistemas como importantes economicamente no Brasil: *Uncinulla necator* x videira, *Blumeria graminis* var. *tritici* x trigo, *Sphaerotheca pannosa* x roseira e *Podosphaera xanthii* x cucurbitáceas.

Heger et al. (1988) observou que o nível de dano econômico do oídio em pepino, cultivado em casa de vegetação, foi de 20% de média de área foliar infectada por planta e que se essa média atingir 50%, perde-se 35% da produção. O mesmo autor ainda estudou o efeito da época de infecção nas perdas e observou que as perdas são tanto maiores quanto mais cedo ocorrer infecção. Para infecções de apenas 5% de média de área foliar lesionada no início do ciclo da cultura tem-se perdas de 6% da produção, para plantas de ciclo de 60 dias.

As perdas decorrentes da infecção por oídio são observadas pela rápida senescência de folhas; menor número, tamanho e peso de frutos; e redução no período produtivo (Zitter et al., 1996). Estes sintomas são resultantes da redução na fotossíntese e na transpiração (Large & Doling, 1962).

Dentre as plantas mais susceptíveis, estão as cucurbitáceas cultivadas: melão, pepino, abóbora e abobrinha (Filgueira, 2000). Além do mais, são desejáveis como sistema modelo para estudos de interação fungo biotrófico-planta (McNally et al., 2003). Como exemplo, dentre elas, a abobrinha

(*Cucurbita pepo*) cv. Caserta vem sendo empregada nestes estudos (Bettioli et al., 1999) por ser uma cultura de ciclo curto (45 dias), crescimento determinado, susceptibilidade ao oídio, boa resistência a outras doenças fúngicas e tolerância a viroses (Filgueira, 2000; Hortec, 2005).

2.2 Etiologia e sintomatologia do oídio em cucurbitáceas

Este fungo ataca toda a parte aérea da planta, especialmente ramos e folhas. O desenvolvimento do micélio pode ocorrer em ambas as faces das folhas, sendo, contudo, mais encontrado na superfície adaxial, onde se observa inicialmente um crescimento branco pulverulento, formado por micélio, conidióforos e conídios do fungo e restrito a pequenas áreas, podendo estas coalescerem, chegando a tomar toda a área foliar. A doença reduz a capacidade fotossintética, produz deformação e perda de sabor dos frutos. Com o seu progresso, as folhas ficam cloróticas e caem, aumentando a entrada de raios solares na subcopa e, conseqüentemente, causando a queima de frutos (Blancard et al., 1996; Stadnik & Rivera, 2001).

Os fungos causadores de oídio pertencem à classe Ascomycete, ordem Erysiphales, família Erysiphaceae (Gargas & Taylor, 1995) e a diferenciação de espécies é baseada em características do corpo de frutificação, ascos e ascóscoporos. Contudo, nas condições tropicais e subtropicais brasileiras, raramente é encontrada a fase sexuada (Stadnik & Rivera, 2001). Portanto, a taxonomia de morfoespécies de oídio é, nesses casos, baseada em características do conídio e do tubo germinativo (Ballantyne, 1975).

Dentre as várias espécies já descritas com sintomatologia semelhante a oídio em cucurbitáceas, as mais comumente encontradas são *Erysiphe cichoracearum* DC. Ex Mérat e *Podosphaera xanthii* (syn. *P. fusca* (Castagne) U. Braun & Shishkoff, antes denominado *Sphaerotheca fuliginea* (Shishkoff,

2000). Entretanto, na maioria dos relatos de ocorrência de oídio em cucurbitáceas, recentemente descritos no Brasil, tanto em casa de vegetação (Reis & Buso, 2004), como no campo (Fazza et al., 2005), *P. xanthii* foi a espécie encontrada. Neste patógeno, ocorre diferenciação em raças 1, 2 e 3 em ordem decrescente de distribuição, isto é, a raça 1 está amplamente distribuída no mundo, a 2 foi recentemente relatada no Brasil sendo em São Paulo por Kobori et al. (2002) e no Rio Grande do Norte por Fazza et al. (2005), e a 3 está restrita a algumas regiões dos Estados Unidos (McCreight et al., 1987), Índia (Khan & Sharma, 1993) e Israel (Cohen et al., 1996). A determinação da raça é importante nos programas de melhoramento para resistência ao oídio em andamento no Brasil e hoje ainda não foram obtidos genótipos resistentes à raça 2 do patógeno (Reis & Buso, 2004).

Os conídios produzidos em abundância na superfície foliar infectada são facilmente disseminados pelo vento ou insetos e, para germinar, dependem de umidade relativa do ar (UR) de 95%, sem água livre na superfície, a qual pode inibi-los e inviabilizá-los. Por outro lado, mesmo em condições de baixa UR, podem germinar e infectar plantas susceptíveis (Blancard et al., 1996; Cheah et al., 1996).

Em condições de campo, a temperatura não lhe é, em geral, limitante, podendo se desenvolver de 10°C a 35°C, com ótimo entre 23°C e 26°C. O sombreamento ou baixa luminosidade aumentam a severidade do oídio. O ciclo da doença é relativamente curto, em média sete dias da germinação à formação de novos esporos (Blancard et al., 1996; Cheah et al., 1996).

2.3 Métodos de controle disponíveis

A principal medida de controle do oídio é o emprego de fungicidas (Stadnik & Rivera, 2001; Olalla, 2001). No manejo de doenças de cucurbitáceas

no Brasil, o oídio é a doença de melão, melancia, abóbora, abobrinha e melancia para a qual existe o maior número de fungicidas registrados, com quarenta diferentes produtos (Agrofit, 2003).

Apesar do aparente grande número de fungicidas 85% do total, pertencentes a quatro grupos químicos: 50% são inibidores da dimetilação ou biossíntese de esterol (triazóis), 15% inibidores da formação dos microtúbulos (benzimidazóis), 12,5% bloqueadores da cadeia de elétrons na respiração (estrobilurinas) e 7,5% competidor de receptores de hidrogênio (produtos a base de enxofre).

Um dos problemas do uso de fungicidas como única medida de controle e poucos sítios de ação é a seleção de populações resistentes (Azevedo & Oliveira, 2003) e os oídios são classificados como fungos de maior risco de desenvolvimento de resistência a fungicidas (Dekker, 1995), principalmente quando o cultivo é feito em casa de vegetação (Dekker, 1977). Dentre eles, os benzimidazóis são aqueles de maior e mais antigo risco na seleção de populações resistentes, relatada desde 1968 (Schroeder & Provvidenti, 1968) até recentemente (McGrath & Shishkoff, 2001). Hoje, além do referido grupo, foram relatadas populações de oídio resistentes a inibidores da dimetilação (Eckert, 1994) e estrobilurinas (Ishii et al., 2001). Pela ação de ventos de velocidade a partir de 0,6m/s, os esporos de *P. xanthii* são desprendidos dos conidióforos e disseminados para outras plantas ou outros campos de produção (Fernández-Ortuño et al., 2004). Assim, ocorre a disseminação de populações resistentes aos fungicidas onde nunca antes tinham sido utilizados ou que a pressão de seleção exercida pelo referido produto tivesse sido baixa (Ishii et al., 2001).

Outra restrição ao uso de fungicidas em cucurbitáceas está relacionada ao enxofre. Apesar de ser usado desde 1814 (Boriani, 1994), com boa eficiência, não apenas para o controle de oídio, mas também para afídios e ácaros (Brown,

1978), em temperaturas superiores a 25°C pode ser observada reação de fitotoxicidade, queima de folhas, desfolha e redução na produção (Stadnik & Rivera, 2001). Estas temperaturas são frequentes em ambientes onde a doença comumente ocorre. Além disso, a germinação ótima de conídios ocorre entre 23°C e 26° C (Cheah et al., 1996), o que torna esta medida de controle de oídio de grande risco para cucurbitáceas.

Diante da preocupação com a seleção de populações de *P. xanthii* resistentes a fungicidas, pesquisas têm buscado a redução de sua utilização (Everts, 2002) ou o registro de novas moléculas como o quinoxifen (Richardson et al., 2004), no manejo do oídio das cucurbitáceas.

Além da preocupação da perda de eficiência dos fungicidas no controle do oídio, os resíduos sobre os produtos agrícolas têm despertado a atenção da sociedade quanto aos riscos à saúde humana e ao ambiente. Outra crescente preocupação por parte dos produtores é a necessidade de redução de custos de produção e baixa eficiência dos métodos convencionais de controle. Isto tem levado ao desenvolvimento de diversos métodos alternativos para controlar oídios e os principal deles é o emprego de práticas culturais e de produtos alternativos (Stadnik & Rivera., 2001). Dentre os principais produtos alternativos testados, alguns são compostos de um ou vários sais de potássio, fosfato, sódio, silício, cal, argila e materiais antitranspirantes (Ziv & Zitter, 1992; Reuveni et al., 1995; Garibaldi et al., 1994; Marco et al., 1994), bicarbonato de sódio (Homma et al., 1981), biofertilizantes (Bettiol, 1996; Bettiol et al., 1998; Ishida et al., 2001), extratos de planta (Pasini et al., 1997; Stadnik et al.; 2003) e óleos vegetais e sintéticos (Pasini et al., 1997). A combinação de mais de um método alternativo pode ter efeito aditivo ou sinérgico como foi observado por Ziv & Zitter (1992).

2.4 O leite no controle de oídio

Além dos produtos citados anteriormente, Bettioli & Astiarraga (1998) obtiveram alta eficiência no controle do oídio das cucurbitáceas (75% a 91%) com o leite fermentado por *Lactobacillus* sp. (produto comercial Yakult®) a 10% (v/v). Apesar da alta eficiência de controle deste produto, a sua inviabilidade econômica levou os autores a testar o leite de vaca cru no controle da doença.

O leite de vaca cru foi testado em concentrações de 5% a 50% v/v e a partir de 10%, apresentou resultado tão eficiente quanto o controle padrão com o fungicida fenarimol (0,1mL/L) (Rubigan, Dow AgroSciences) com reduções de área foliar infectada de 56% a 75% e 75% a 97%, aplicado, respectivamente, uma ou duas vezes por semana (Bettioli et al., 1999). O preço do leite é quase duas vezes maior que o dos fungicidas à base de enxofre (Tabela 1), mas, com o risco inerente ao uso de fungicidas deste último grupo para cucurbitáceas e o preço igual ou inferior à maioria dos fungicidas recomendados, o leite é uma alternativa viável para o controle do oídio em cucurbitáceas. Deve-se ainda considerar que, mesmo que se equiva ao custo dos fungicidas, o leite dispensa a utilização de equipamentos de proteção individual, o que representa redução nos custos de aplicação a longo prazo e pode ser conseguido a menor custo se for produzido na propriedade. Além do mais, não tem período de carência e, portanto, vem ganhando a aceitação, não só de produtores orgânicos como também de convencionais (Bettioli, 2003). Uma análise comparativa de custo de uso do leite cru para controle do oídio da videira (*Uncinula necator*) encontrou resultado semelhante (Crisp et al., 2004).

TABELA 1: Análise de custo do leite e dos principais fungicidas registrados para cucurbitáceas no Brasil

| <i>Insumo</i> | <i>Custo do insumo concentrado (R\$/litro ou kg)</i> | <i>Recomendação³</i> | <i>Custo por litro de calda</i> |
|----------------------------|--|---------------------------------|---------------------------------|
| Leite bovino cru | 0,49 a 0,54 ¹ | 5% (v/v) | 0,025 a 0,027 |
| Triazol ² | 124,65 a 254,13 | 20mL de EC/100L | 0,025 a 0,051 |
| Estrobilurina ² | 625,30 | 0,6g PM/L | 0,38 |
| Benzimidazol ² | 55,59 | 0,7g PM/L | 0,039 |
| Enxofre (fungicida) | 6,61 | 2g PM/L | 0,013 |

¹preço mais baixo para leite tipo C. dados da cotação de 21/10/2005 da Scot Consultoria e Invertia, disponível em <http://www.milkpoint.com.br/mn/home/>; ²principais grupos químicos de fungicidas registrados para cucurbitáceas no Brasil, preço mais baixo para fungicida genérico do mesmo grupo químico obtido a partir de levantamento da FUNDAÇ para o estado de São Paulo (Ferreira et al., 2005); ³recomendação para o leite baseada em Bettiol et al. (2003) e fungicidas pelo Agrofit/Ministerio da Agricultura, disponível em : http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons

Logo após a descoberta do potencial do leite no controle do oídio em abobrinha, foi comprovada sua eficiência contra o oídio da videira (Crisp et al., 2002; Naves et al., 2005), do trigo (Drury et al., 2003) e do eucalipto (Santos et al., 2003), todos com eficiência comprovada para os respectivos oídios, obtida com concentrações de leite a partir de 10% (v/v) aplicado uma vez por semana. Apesar da ampla utilização do leite nos patossistemas em que sua eficiência já foi comprovada e testes em novos patossistemas, poucos foram os esforços para elucidar os mecanismos de ação desta medida de controle (Stadnik & Bettiol, 2001; Crisp et al., 2004).


Davidse (1988) descreve os objetivos do estudo dos mecanismos de ação de fungicidas como a determinação dos sítios de ação, os processos fisiológicos nos fungos e a sua regulação. Assim, como para os fungicidas, os estudos dos mecanismos de ação pelos quais os produtos alternativos controlam doenças de plantas são objeto de estudos para muitos casos (McGrath & Shishkoff, 2000; Reuveni et al., 1997; Marco et al., 1994).

2.5 Microbiota associada ao controle do oídio: o leite como regulador e fonte de microrganismos.

Em plantas de abobrinha infectadas por oídio e pulverizadas com leite em concentrações de 30% ou superior, Bettiol et al. (1999) observaram o desenvolvimento de um emaranhado de hifas na superfície adaxial das folhas. Este emaranhado foi caracterizado, principalmente, por fungos filamentosos, pertencentes aos gêneros *Fusarium* sp. e *Cladosporium* sp. (Stadnik & Bettiol, 2001). Apesar destes autores não terem feito testes de antagonismo, ambos os gêneros já foram isolados de filoplano de cucurbitáceas e relatados como potenciais agentes de controle do oídio, com reduções da doença de 49,3% para *Fusarium oxysporum* (Srivastava & Bisht, 1986) e 90% para *Cladosporium* sp. (Minuto et al., 1991).

Crisp et al. (2004) observaram que, 14 dias após o tratamento de folhas destacadas de videira com leite ou enxofre, seguido do tratamento com *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis*, previamente selecionados como potenciais agentes de controle do oídio da videira (*Uncinula necator*) (Crisp et al., 2002), a população do fungo se mantinha mais alta do que em plantas tratadas com enxofre e, apenas no tratamento com leite, foi recuperado *B. subtilis*. Além de estudar a persistência destes agentes de controle biológico do oídio, os autores observaram o desenvolvimento abundante de leveduras de importância no controle de oídio (*Aureobasidium pullulans*) (Lima et al., 2002), bactérias e outras leveduras ainda não identificadas no filoplano de videira após o tratamento de plantas com leite.

Dentre as espécies de potenciais antagonistas a fungos fitopatogênicos, *B. subtilis* e *T. harzianum*, provavelmente, são os organismos mais amplamente estudados (Paulitz & Belanger, 2001; Howell, 2003), e eficientes para o controle do oídio (Bettiol et al., 1997; Vozenilkova et al., 1992). Outros fungos e



bactérias habitantes do filoplano já foram relatados como potenciais agentes de controle do oídio (Tabela 2); muitos são hiperparasitas, facilmente visualizados na superfície de colônias de oídio sempre que estas adquirem uma coloração marrom a pardo oliváceo (Minuto et al., 1991; Blancard et al., 1996). No entanto, o crescimento, a atividade e a sobrevivência destes microrganismos estão associados às condições de alta (90%) umidade relativa e fontes de nutrientes. Estas condições podem ser superadas pela adição de óleo (Shishkoff & McGrath, 2002), para redução do dessecamento e fontes de nutrientes, inclusive leite em pó (Lin & Tsay, 2004), para aumentar a competitividade do antagonista. Com a adição de mistura de óleo de canola e lecitina de soja ao inóculo de *Tilletiopsis pallescens*, foi aumentada a eficiência do parasitismo a *P. xanthii* e o tempo de sobrevivência do antagonista, mesmo sob condições de baixa umidade relativa do ar (Urquhart & Punja, 1997).

Além de potencial regulador da comunidade de microrganismos habitantes do filoplano, saprófitas ou antagonistas ao oídio, o leite é rico em bactérias (Tabela 3). Esta população tem origem no próprio animal (tecidos internos e externos), ambiente (ar, recipientes de armazenamento ou ordenhadeira) ou homem (Brasil, 1997) e sua comunidade e diversidade são funções do tempo e da temperatura de exposição e sanidade ou higienização das suas fonte de origem: sanidade do animal, higienização de ordenhadeiras, ordenhador e recipientes de armazenamento (Ribeiro & Carvalho, 2002).

TABELA 2: Microrganismos (bactérias e fungos) com eficiência já comprovada no controle do oídio.

| Microrganismo antagonista | Espécie alvo | Autor |
|----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Tilletiopsis minor</i> | <i>Podosphaera xanthii</i> | Hijwegen (1992) |
| <i>Bacillus</i> spp. | <i>P. xanthii</i> . | Romero et al. (2003) |
| <i>Lecanicillium lecanii</i> | <i>P. xanthii</i> | Dik et al. (1998) |
| <i>Sporotrix flocculosa</i> | <i>P. xanthii</i> | Dik et al. (1998) |
| <i>Ampelomyces quisqualis</i> | <i>P. xanthii</i> | Dik et al. (1998) |
| <i>Tilletiopsis albescens</i> | <i>P. xanthii</i> | Knudsen & Skou (1993) |
| <i>Cladosporium</i> sp. | <i>P. xanthii</i> | Minuto et al. (1991) |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | <i>Sphaerotheca mors-uvae</i> | Kharchenko & Ryabchinskaya (2000) |
| <i>Phoma glomerata</i> | <i>P. xanthii</i> | Sullivan & White (2000) |
| <i>Tilletiopsis pallescens</i> | <i>S. pannosa</i> | Ng & McDonald (1997) |
| <i>Rhodotorula glutinis</i> | <i>P. xanthii</i> | Lima et al. (2002) |
| <i>Cryptococcus laurentii</i> | <i>P. xanthii</i> | Lima et al. (2002) |
| <i>Aureobasidium pullulans</i> | <i>P. xanthii</i> | Lima et al. (2002) |
| <i>Acremonium alternatum</i> | <i>P. xanthii</i> | Romero et al. (2002) |
| <i>Alternaria alternata</i> | <i>P. xanthii</i> | Srinivastana & Bisht (1986) |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>P. xanthii</i> | Srinivastana & Bisht (1986) |
| <i>Dreschlera spicifera</i> | <i>P. xanthii</i> | Srinivastana & Bisht (1986) |
| <i>Curvularia lunata</i> | <i>P. xanthii</i> | Srinivastana & Bisht (1986) |
| <i>Penicillium fellutanum</i> | <i>P. xanthii</i> | Srinivastana & Bisht (1986) |
| <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> | <i>P. xanthii</i> | Kavkova & Urn (2005) |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | <i>P. xanthii</i> | Georgieva (2002) |
| <i>Meira geulakonigii</i> | <i>P. xanthii</i> | Sztejnberg (2004) |

Dentre os microrganismos comumente encontrados no leite, há aqueles patogênicos ao homem e animais, como: *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp., *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp. (Ferri et al., 1992; Masud et al., 1991; Ramaswamy et al., 1995, Thomas et al., 1995), alguns de importância industrial na produção de produtos lácteos, como *Lactobacillus acidophilus* e

Bifidobacterium spp., com inúmeros benefícios à saúde humana, como aumento da imunidade contra infecções intestinais, prevenção de diarreias, câncer de colo e de útero, hipercolesterolemia, aumento do aproveitamento da lactose, prevenção de doenças da parte superior do intestino e estabilização da mucosa do intestino (Kailasapathy & Chin, 2000). Ainda há aqueles que são comensais e antagonistas a *Staphylococcus aureus*. Foram três os principais gêneros de bactérias antagonistas encontrados no leite cru: *Staphylococcus* sp. (64% dos isolados), *Streptococcus* sp. (30% dos isolados) e *Lactobacillus* spp. (12,5% dos isolados) (Heikkila & Saris, 2003).

Os mecanismos pelos quais estas bactérias antagonistas controlam patógenos ainda é um campo para estudos, mas, algumas interações já foram esclarecidas. Dentre elas, foi descoberto que um isolado de *L. lactis* produz nicina, uma bacteriocina de amplo espectro, usada na indústria para prevenir o desperdício de alimentos (May, 1994) e uma proteinase com ação hidrolítica sobre caseína e lítica sobre *Xanthomonas campestris* (Shastry & Prasad, 2002).

TABELA 3: Comunidade de batérias mesófilas, psicrófilas e termófilas em unidades formadoras de colônia por mL de leite cru obtido por ordenha manual.

| | Oliveira (2000) | Ribeiro & Carvalho (2002) |
|--------------------|-------------------|---------------------------|
| Mesófilos | 8×10^6 | $2,5 \times 10^5$ |
| Psicrófilos | $1,8 \times 10^4$ | $1,5 \times 10^4$ |
| Termófilos | 8×10^0 | $3,3 \times 10^4$ |

2.6 Técnicas de visualização da superfície foliar

É grande a diversidade entre plantas em relação à morfologia da epiderme foliar (Procópio et al., 2003). Estas diferenças são responsáveis, entre

outros, pelo nível de resistência de plantas a patógenos e pela regulação da população de microrganismos antagonistas da filosfera (Dal Soglio, 2003), deposição, penetração e persistência de produtos fitossanitários (Hess & Falk, 1990). Como forma de estudar estas relações, muitos autores têm usado a microscopia, tanto a eletrônica com a de luz.

Stadnik & Buchenauer (2000), estudando o efeito da aplicação de benzotiadiazole no desenvolvimento do oídio, *Blumeria graminis* var. *tritici* em trigo, usaram uma técnica simples de clareamento de tecido em uma série de ácido acético e álcool (1:3 v/v) para clareamento, transferência para ácido láctico:glicerol:água destilada (1:1:1) para fixação e preservação das estruturas e, finalmente, coloração das estruturas fúngicas com azul de algodão, com posterior observação em microscopia de luz.

Tendo em vista que o desenvolvimento micelial e a formação de conidióforos de oídio ocorrem na superfície foliar (Stadnik & Rivera, 2001), o uso da microscopia eletrônica de varredura é uma importante ferramenta para estudos morfológicos do oídio e relação com a epiderme da planta hospedeira (Kumar & Gupta, 2004). Fazendo uso desta técnica, Celio & Hausbeck (1997) estudaram os eventos iniciais do desenvolvimento de *Oidium* sp sobre Poinsetia (*Euphorbia pulcherrima*). No estudo das alterações da estrutura de oídio após a aplicação de leite a 10% (v/v), Crisp et al. (2004) observaram alterações sobre conídios e conidióforos por estudos de microscopia eletrônica de varredura, 24 horas após o tratamento de folhas infectadas. Por esta técnica, ainda pode ser observada a presença de produtos aplicados ou naturalmente acumulados na superfície foliar e ou microrganismos livres ou em associação com substratos formando biofilmes (Alves, 2003; Romero et al., 2003).

2.7 Composição do leite e atividade no controle do óidio

O leite contém elementos benéficos à saúde humana, como vitaminas A, C, D, E, K, B12 e B6, bem como ácidos graxos do tipo ômega-3 e 6, e uma variedade de 20 isômeros do ácido linoleico, com propriedades as mais diversas, desde anticancerígenas até relacionadas à saúde cardiovascular (Lee, 1980; Haines, 2004). É um dos mais completos alimentos líquidos, com 87% de água e 3,6% de gordura, 4,9% de carboidratos, 3,5% de proteínas e 0,7% de minerais .

As proteínas do leite são compostas por duas principais frações: caseína e proteínas do soro (lactoalbumina e lactoglobulina). Estas ainda são divididas em várias proteínas menores com composição de aminoácidos e funções distintas (Webb et al, 1974). A caseína representa a maior parte das proteínas do leite (76% a 86%) e é química e estruturalmente mais complexa que as proteínas do soro. Compõe-se das frações α_{s1} -caseína (38%), α_{s2} -caseína (10%), β -caseína (36%) e κ -caseína (13%). Todas estas frações, exceto a última (ligada a um grupo glicolilado), estão ligadas a um grupo fosforilado que tem afinidade por cálcio e, na presença do cálcio, tende a precipitar rapidamente, ficando apenas solúvel a fração κ -caseína. Esta afinidade com o cálcio também tem a função de estabilização das proteínas do leite pela formação de micelas com a formação de pontes cálcio inter e intramoleculares. Esta formação depende da temperatura, pH (superior a 5) e força iônica do meio (Lourenço, 2000).

Quando da precipitação da caseína do leite (pH 4,6 e temperatura de 20°C), as proteínas dissolvidas na fase aquosa são denominadas de proteínas do soro. Estas são compostas, principalmnete, de α -lactoalbumina (2% a 5%), β -lactoalbumina (7% a 12%), soroalbumina (0,7% a 1,3%), proteose peptona (2% a 6%) e imunoglobulinas (1% a 2%). Todas possuem conformação nativa globular compacta termolabel, com número variável de ligações dissulfeto que

lhes conferem alta solubilidade em água em todas as faixas de pH. Esta fração, quando aplicada no controle de oídio, teve eficiência significativamente semelhante ao próprio leite cru, ambos em concentrações equivalentes a 10% (v/v) de leite (Crisp et al., 2002)

Em ambas as frações protéicas ocorrem, em menor quantidade, mas com importantes funções biológicas, as enzimas. Estas têm como principais funções a de indicador de qualidade, síntese de compostos e diagnose de enfermidades (desequilíbrio biológico), lactose sintase (síntese de lactose), lipase (produção de aromas indesejáveis), superóxido dismutase (antioxidante), catalase (prooxidação e diagnose de mastite), fosfatase alcalina (marcador de eficiência de pasteurização) e plasmina (regulador da coagulação e cicatrização). Outras ainda têm atividade antimicrobiana: lactoperoxidase, lisozima e lactoferrina. Esta última, sob ação de pepsinas e quimosinas, libera peptídeos de poder antimicrobiano de amplo espectro chamado lactoferricinas, resistentes à digestão gástrica e imunoestimuladoras (Lourenço, 2000; Parry et al., 2000; Walzem et al, 2002). Sua atividade já foi comprovada no controle do oídio da videira, com resultado significativamente semelhante ao tratamento com leite (Crisp et al., 2004).

Os carboidratos do leite são representados por lactose, glicose, galactose, manose, acetilglucosamina e glicoproteínas, mas, a primeira é não só a principal fração carboidrato, como a principal fração sólida do leite, representando de 50% a 52% m/m de sólidos no leite desnatado (Lee, 1980).

A lactose compõe-se de α e β -lactose, composto, por sua vez, de monômeros de D-glicose e D-galactose que, por atividade de bactérias acidificantes (*Lactobacillus* spp.), são convertidos em ácidos lácticos que reduzem o pH do leite e induzem a precipitação das micelas de caseína (Amrane & Prigent, 1996).

Os lipídios do leite se compõem principalmente de triglicerídios de mais de 60 diferentes ácidos graxos saturados (os que ocorrem em maior quantidade são butírico, caprótico, caprílico, láurico, mirístico, esteárico) e insaturados (os que ocorrem em maior quantidade são oléico e linoléico) (Kurtz, 1965). A combinação dos ácidos graxos compõe a gordura do leite, que representa 3,6% m/v do total. Apesar de não ter atividade antimicrobiana relatada, a gordura teve papel regulador da eficiência do leite (Crisp et al., 2002).

As cinzas do leite se compõem de diversos íons, sendo os principais os de potássio (35,3mmol/L), sódio (25,2mmol/L), cloro (28,0mmol/L), enxofre (1mmol/L), cálcio (30,1mmol/L), magnésio (5,1mmol/L) e fósforo inorgânico (22,3mmol/L). As suas funções são as mais diversas: desde a estabilidade das micelas de caseína e regulação do pH (íons de cálcio e magnésio), à composição de aminoácidos (enxofre). Os sais também funcionam como tampões, garantindo a manutenção do pH próximo à neutralidade. Os principais íons responsáveis pela manutenção do pH ácido são fosfato e citrato, enquanto os de cálcio e magnésio são responsáveis pelo básico. Estes grupos estão em equilíbrio e a maior concentração de um dos grupos desloca o equilíbrio para o pH pelo qual eles são responsáveis (Sommer & Hart, 1919). Esta variação é comum em animais com mastite, em final de lactação, número de parições e idade, em que aumenta-se a concentração de fosfato de cálcio e eleva-se o pH (Holt, 2004). Diversos sais de fósforo e potássio já foram relatados como eficientes para o controle do oídio e agem por indução de resistência (Mucharromah & Kuc, 1991) e formação de um gradiente osmótico (Kettlewell et al., 2000).

2.8 Fontes de leite e o tratamento térmico

Em relação à composição, o leite pode variar grandemente com a sazonalidade, alimentação do animal, estágio de lactação, espécie e raça (Lee,

1980; Jennes, 1995; Lourenço, 2000). Entretanto, o controle do oídio tem sido satisfatório quando aplicado na concentração de 5% (Bettioli, 2003), sem qualquer referência à padronização do leite aplicado.

Tendo em vista que o leite é um alimento rico em nutrientes, funciona como um meio de cultura para o desenvolvimento de bactérias endógenas ou contaminantes (Tabela 3) e, mesmo sob refrigeração (até 4°C), sofre degradação por microrganismos psicrófilos, principalmente por *Bacillus* spp. aeróbios e *Pseudomonas* spp. Neste último grupo, em especial estirpes de *P. fluorescens* são consideradas as bactérias de maior nível de especialização na degradação do leite, com potencial para degradar mais de 100 diferentes substâncias (Martín et al., 2005). Como forma de conter estes microrganismos, a indústria de laticíneos adota o tratamento térmico: 63°C por 30 minutos ou 72°C por 15 segundos. O primeiro tratamento mata a maioria das células vegetativas, incluindo patógenos, tais como *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp. e *Mycobacterium tuberculosis*. O segundo tratamento age semelhantemente ao anterior, mas, é preferido pela indústria de laticíneos por causar menor efeito adverso na qualidade e sabor do leite. Após a pasteurização, comumente faz-se o resfriamento para evitar o sabor cozido (Harris & Schmidt, 2003). Ainda pode ser feito o tratamento UHT (*ultra high temperature*), no qual o leite é aquecido a 138°C por, pelo menos, dois segundos. Neste caso, são eliminados todos os microrganismos, podendo conferir maior vida de prateleira ao produto (Sahoo et al., 2005). Do ponto de vista industrial, o tratamento térmico não afeta a estabilidade organoléptica do leite (Singh, 2004).

2.9 Efeito do tratamento com leite no desenvolvimento do oídio

A pulverização com leite cru a 30% (v/v) quatro dias antes da inoculação reduziu significativamente o número (90%), tamanho (30%) e a taxa

de esporulação (25%) das colônias de oídio, mas, não afetou a germinação de conídios nem a penetração do fungo. Também não foi observado aumento significativo na atividade da peroxidase nas plantas tratadas e inoculadas (Stadnik & Bettiol, 2001). Por outro lado, Crisp et al. (2002) mostraram que aplicações de leite inviabilizaram conídios e hifas, mas não produziram alterações sobre cleistotécios, e que os conídios danificados pela ação do leite possuíam conformação característica “hernia-like”, diferente da alteração provocada por fungicidas de contato. Esta alteração sobre conídios também foi observada para plantas tratadas com lactoferrina ou soro de leite, mas, o dano sobre hifas não foi semelhante.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Envolvimento de fungos e bactérias do filoplano das plantas de abobrinha tratadas com leite no controle do oídio

3.1.1 Relação entre flutuação da comunidade de bactérias e fungos não fastidiosos na superfície foliar e severidade do oídio

Plantas de abobrinha (*Cucurbita pepo*) cv Caserta foram cultivadas livres de inóculo de oídio em vasos de 4L contendo substrato comercial TECHNES® e latossolo (1:3), adubadas de acordo com a recomendação para a cultura e irrigadas diariamente até capacidade de campo. Assim que as plantas atingiram o estágio de quarta folha definitiva expandida, foram pulverizadas com água, leite cru a 30% v/v e fungicida fenarimol 0,15mL/L (Rubigan, Dow AgroSciences), no momento da instalação. Posteriormente, uma (fungicida) ou duas vezes por semana (leite e água) as plantas foram pulverizadas com pistola de pintura acoplada a um compressor à pressão de 10lb/pol² até escorrimento. Após a primeira pulverização, as plantas foram transferidas para casa de vegetação contendo alto potencial de inóculo (uma planta doente para cada três plantas saudáveis), distribuídas em três blocos casualizados com uma planta por vaso e período de amostragem. Os períodos de amostragem foram sempre de dois dias após cada pulverização até a quarta pulverização. A amostragem consistiu da coleta da terceira folha definitiva por planta e retirada de discos de aproximadamente 1,1 cm de diâmetro com um furador metálico esterilizado por flambagem. Os discos foram transferidos para tubo com rosca de 10mL de capacidade, contendo 1mL de tampão fosfato autoclavado [(KH₂PO₄ 6,75g e K₂HPO₄ 8,75g) por litro de água destilada]. Os tubos foram posteriormente colocados em banho com ultrassom por três minutos. As suspensões foram diluídas em série até 10⁻⁷ (para plantas tratadas com leite) ou 10⁻⁶ para plantas

tratadas com água ou fungicida e plaqueadas em ágar nutriente (16g de ágar, 3g de extrato de carne, 10g de cloreto de sódio, 5g de peptona por litro de água destilada) para bactérias ou batata dextrose ágar (16g de ágar, 200mL de caldo de batata e 20g de dextrose) adicionado de 50ppm de sulfato de estreptomicina, após autoclavagem, para fungos. A placa de Petri de 9cm foi dividida em oito partes e em cada uma foram plaqueadas três gotas de 10 μ L de cada uma das diluições, usando-se uma placa para cada parcela amostrada e período de amostragem. Entre cada diluição e plaqueamento, o tubo foi agitado em Vortex para uniformização da amostra. As placas foram mantidas em sala climatizada ajustada para 25 \pm 2°C por 12 a 24 horas para quantificação de bactérias e 48 a 72 horas para fungos. A população de microrganismos, separadamente, foi dividida pela área $2 \times \pi r^2$, fórmula para cálculo da área do disco multiplicada por "2", por serem ambos os lados nichos potenciais dos microrganismos. O resultado foi transformado para log₁₀ e expresso em unidades formadoras de colônias por cm² de folha (log ufc /cm²). Os dados de cada avaliação foram usados para cálculo da área abaixo da curva de progresso AACP em que AACP = $[\sum (y_i + y_{i-1})/2 \cdot d_i]/n$, em que y_i e y_{i-1} são os valores de log. ufc/cm² observados em duas avaliações consecutivas, d_i o intervalo entre as avaliações e n a duração do período de avaliação (Fry, 1978).

Além das plantas usadas para a quantificação dos referidos microrganismos, para cada um dos blocos foram mantidas duas plantas para quantificação da porcentagem da área foliar infectada por oídio (McGrath & Shishkoff, 1996), aos seis e doze dias após a primeira pulverização. A doença foi avaliada em todas as folhas das plantas e foram calculadas a porcentagem média por planta e a média das duas plantas por bloco para cada tratamento. No cálculo da porcentagem média de área foliar infectada por planta, apenas foram consideradas as folhas até aquela de número (considerando-se uma numeração das folhas crescente, da mais velha para mais nova, como uma medida



fenológica) igual à folha de maior número nas plantas tratadas com água que apresentou sintomas. Esta medida visa reduzir os erros resultantes de “falsos baixos resultados” de severidade da doença na testemunha observados no ensaio. Assim como para a comunidade de bactérias e fungos, foi calculada a área abaixo da curva de progresso.

As médias de AACP da doença e da comunidade foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p = 0,05$), usando-se o programa computacional SISVAR (Sisvar, 2000).

3.1.2 Teste da eficiência de bactérias e fungos do filoplano de plantas tratadas com leite no controle do oídio

Plantas de abobrinha (*Cucurbita pepo*) cv. Caserta foram cultivadas livres de inóculo de oídio em vasos de 4L contendo substrato comercial à base de pó de coco (GoldenMix, Amafibra, Holambra) e latossolo (1:3), adubadas de acordo com recomendação para a cultura e irrigadas diariamente até capacidade de campo. Assim que as plantas atingiram o estágio de quarta folha definitiva expandida, foram tratadas com leite a 30% (v/v) ou água no momento da instalação e duas vezes por semana até escorrimento, com pulverizador manual de 5L de capacidade com bico tipo cone. Em seguida, foram transferidas para casa de vegetação contendo alta pressão de inóculo (uma planta doente para cada três plantas sadias) distribuídas em três blocos casualizados, com uma planta por vaso e período de amostragem. Às 0, 24, 48, 72 horas e 5, 7, 9, 15 e 23 dias (Tabela 2), foi coletada a terceira folha definitiva de uma planta por bloco. A folha foi colocada no interior de uma garrafa com rosca de 400mL de capacidade, autoclavada e tarada, pesado o conjunto e, por diferença, obtido o peso da folha. O conjunto foi preenchido com solução salina (0,85% m/v de cloreto de sódio em água destilada) para perfazer uma diluição de 1:100 (m/v). A solução foi agitada vigorosamente e retirada uma alíquota de 1mL para

diluição em série até 10^{-8} . Em seguida, foi retirada uma alíquota de $10\mu\text{L}$ de cada uma das diluições até a última e plaqueadas em meio ágar nutriente para bactérias e até a penúltima para meio de Martin, sem rosa bengala (Cardoso et al., 1999) para fungos.

Os isolados que cresceram na última diluição, para ambos os microrganismos, foram purificados e preservados em tubos com BDA até utilização nos ensaios de potencial de controle.

Para testar a eficiência de controle dos microrganismos obtidos, estes foram cultivados em meio BD por 48 horas a partir de colônias puras com 48 horas.

A partir de plantas de abobrinha cv. Caserta, com cinco a sete dias de plantio em mistura de solo e substrato comercial à base de pó de coco (Golden Mix, Amafibra, Holambra), foram obtidos discos de folhas cotiledonares com $1,1\text{cm}$ de diâmetro e transferidos para bandejas plásticas contendo espuma saturada com água destilada e cobertas por lâmina de vidro, de maneira a manter umidade alta no interior da bandeja, mantidas em sala de incubação com temperatura ajustada para $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas.

As bactérias e leveduras obtidas foram cultivadas por 48h em batata-dextrose a partir de culturas puras, transferidas para tubos de microcentrifugas de 2mL , preenchidos com o meio de cultura e crescimento microbiano, centrifugado a 12.000rpm por 10 minutos, retirado o sobrenadante, ressuspendendo-se o pellet com tampão fosfato esterilizado. As suspensões foram ajustadas para 10^6 células/mL, aferidas em hemacitômetro para leveduras e absorvância de 0,7, medida em espectrofotômetro a 580nm para bactérias. Foram utilizados 18 isolados, entre bactérias e leveduras, e tampão fosfato como controle negativo para comparar a eficiência dos microrganismos no controle do oídio em discos. Para tanto, uma gota de $50\mu\text{L}$ da suspensão de cada isolado e tampão fosfato foi aplicada 24 horas antes ou após a inoculação do oídio. O

inóculo foi obtido a partir de plantas novas de abobrinha infectadas por oídio, com colônias em ativa esporulação. As folhas foram coletadas, cortadas em fragmentos de 1 a 2cm², misturados a 50mL de água de torneira e submetidos a banho de ultra-som por 5 minutos.

O delineamento experimental foi composto por dois discos por bandeja e três bandejas por tratamento e período de aplicação, representando seis blocos. As bandejas foram mantidas em sala climatizada ajustada para $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sob fotofase de 12 horas de luz artificial por seis dias após a inoculação, quando foi feita a avaliação da área de disco infectada. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, usando-se o software SISVAR (Sisvar, 2000).

3.2 Atividade fungicida do leite

Para determinar a atividade fungicida do leite, esporos de oídio foram incubados em diferentes concentrações de leite e avaliada a viabilidade do inóculo em ensaios *in vivo*.

O inóculo estoque do patógeno foi preparado a partir de colônias de oídio (*P. xanthii*) de folhas com ativa esporulação. As folhas foram imersas em Beaker de 250mL contendo água destilada esterilizada. O conjunto foi transferido para banho de ultrassom por cinco minutos, em seguida a suspensão foi calibrada para 1×10^5 conídios/mL em hemacitômetro. Uma alíquota de 5mL desta suspensão foi transferida para Erlenmeyer de 250mL. Em seguida, foram transferidos para o mesmo recipiente, 45mL de leite de vaca cru autoclavado, de maneira a isolar a contribuição da microbiota no controle do oídio. Foram incubados em Erlenmeyers de 250mL, com 50mL de leite a 0%, 5%, 10%, 30% e 50% (v leite/v de água). O conjunto foi agitado por uma hora em agitador orbital a 150rpm e temperatura de aproximadamente $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Foi adicionada

uma gota de Tween 80 para cada 50mL de solução e estas foram pulverizadas até escorrimento sobre ambas as faces de ambas as folhas de plantas de abobrinha cv. Caserta (cultivada conforme citado anteriormente) com um atomizador De Vilbiss acionado manualmente por uma pêra. As plantas foram distribuídas em quatro blocos casualizados com três plantas por parcela, totalizando 12 plantas por tratamento. Na extremidade dos blocos, foi colocada uma bordadura composta por uma fileira de três plantas para reduzir a interferência de inóculo externo no experimento. As plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura controlada (variação de 16°C a 25°C) por 15 dias. Aos seis e aos quinze dias após a pulverização, as duas folhas pulverizadas de cada planta foram avaliadas, contando-se o número de colônias de oídio por folha. Como forma de comprovar possível resposta de indução de resistência sistêmica mediada pelo tratamento com leite nas referidas concentrações, aos 15 dias foi avaliada a terceira folha de cada planta, não tratada e não inoculada, mas, com a pressão de inóculo das folhas subjacentes e plantas vizinhas, desenvolveram colônias de oídio contáveis. A análise de variância (ANOVA) para o ensaio e o contraste de médias entre as dosagens de leite foram feitos usando-se o teste F para avaliar a significância e feito o ajuste a um modelo de regressão usando o software SISVAR (Sisvar, 2000). As curvas de regressão foram geradas usando-se o software Excel (Excel 97, 1997)

3.3 Alterações morfológicas por microscopia eletrônica de varredura de folhas infectadas e tratadas com água, fungicida e leite

Plantas de abobrinha (*Cucurbita pepo*) cv. Caserta foram cultivadas em vasos de 4L contendo uma mistura de pó de coco (Goldenmix, Amafibra, Holambra) e solo (1:3 m/m), adubados de acordo com a recomendação para a cultura (Raij et al., 1997) e irrigados diariamente até capacidade de campo, mantidas em casa de vegetação livres de inóculo de oídio. Quando estas

atingiram o estágio de segunda folha verdadeira expandida e a cada três (água e leite) ou seis dias (apenas para o fungicida), foram pulverizadas com pulverizador costal manual com água, leite cru a 10% e 30% v/v (usando bico tipo cone e pulverizador de 5L), fenarimol 0,15mL/L (usando bico tipo leque e pulverizador de 20L) até escorrimento. Em seguida, foram transferidas para casa de vegetação contendo alta pressão de inóculo de oídio, mantendo-se a proporção de uma planta infectada para cada quatro plantas sadias.

Nos intervalos de 0, 24, 48 e 72 horas e 6, 9, 12 e 15 dias após a primeira pulverização, as plantas foram amostradas. A amostragem foi destrutiva, coletando-se a segunda folha definitiva de cada planta. Para cada folha amostrada, foram retirados três discos de aproximadamente 0,5cm de diâmetro: (a) na nervura principal, próximo à base da folha, (b) no limbo foliar, no meio da folha a cerca de 3cm distante da nervura principal e (c) na borda da folha. Os discos foram colocados em tubos de microcentrifuga de 1mL e fixados com solução fixativa de Karnovisk modificada, pH 7,2 por, pelo menos, 24 horas.

As amostras foram levadas para preparação e observação em microscópio eletrônico de varredura, no Laboratório de Microscopia de Precisão no Departamento de Fitopatologia, da Universidade Federal de Lavras, MG. Inicialmente, as secções obtidas foram lavadas em tampão cacodilato 0,05M por duas vezes de 10 minutos cada e, após a última lavagem, foi adicionada uma gota de tetróxido de ósmio 2% em tampão cacodilato m/v, lavadas em água destilada por duas vezes e, subseqüentemente, desidratadas em uma série de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100% por três vezes) e depois levadas para o aparelho de ponto crítico. Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio stubs, com uma fita de carbono dupla face colocada sobre uma película de papel alumínio, cobertos com ouro e observados em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40XVP. Foram geradas e registradas digitalmente, em

aumentos variáveis, diversas imagens para cada amostra, nas condições de trabalho de 20Kv e distância de trabalho de 9 a 11mm. O processamento e preparação das amostras foram feitos de acordo com técnicas descritas anteriormente (Vineet & Gupta, 2004; Alves, 2003).

O delineamento experimental foi composto por quatro tratamentos com três repetições, distribuídas em blocos casualizados, com um vaso com uma planta cada para cada um dos oito períodos de amostragem.

3.4 Efeito do leite na germinação e na esporulação de oídio

Plantas de abobrinha cv. Caserta foram cultivadas em casa de vegetação livres de inóculo de oídio em vasos de 3L contendo uma mistura de substrato comercial TECHNES® e solo (1:3), adubados para N, P e K, de acordo com recomendação para a cultura (Raj et al., 1997). Assim que as plantas atingiram o estágio de terceira folha expandida, foram transferidas para casa de vegetação também livre de inóculo de oídio, tratadas com leite cru autoclavado nas concentrações de 10% e 30%, água e fungicida fenarimol 0,15mL/L (Rubigan, Dow AgroSciences), deixadas secar por aproximadamente três horas e inoculadas com oídio.

O inóculo foi obtido a partir de plantas com alta severidade da doença e em ativa esporulação. A inoculação foi feita movimentando-se levemente estas folhas a cerca de 10cm de altura das folhas das plantas sadias tratadas, mantendo-se a proporção de uma folha doente para cada três folhas sadias.

As 24, 48, 72 e 120 horas após a inoculação, a terceira folha de cada planta foi amostrada e dela retiraram-se dois discos de 1,1cm de diâmetro com um furador metálico. Estes foram imediatamente transferidos para uma placa de petri de 5cm de diâmetro contendo 5mL de solução de etanol/ácido acético glacial (3:1, v/v) para fixação e clareamento dos tecidos. A solução foi trocada a

saprófitas pela contribuição dos nutrientes do leite ou uma combinação de ambos.

Assim como já havia sido comprovado anteriormente (Bettiol et al., 1999), o leite foi eficiente no controle do oídio, com redução de 95,3% na área abaixo da curva do progresso da doença. Esta eficiência foi ainda maior que aquela obtida pelo tratamento com fungicida (Tabela 5).

Tendo em vista que, como controle positivo, foi usado exclusivamente o fenarimol por quase um ano, gerando uma alta pressão de seleção, e que o inóculo foi mantido e multiplicado em apenas duas casas de vegetação (uma para cada fim), reduzindo-se as contribuições de inóculo selvagem suscetível, pode-se supor que parte da população já está resistente ao fungicida. Ainda, considerando-se que, durante o mesmo período, foram realizados, paralelamente aos tratamentos com fungicida, tratamentos com leite e que não foi observada perda de eficiência semelhante, sugere-se em ensaios posteriores, investigar a pressão de seleção exercida pelo leite.

Os isolados bacterianos e fúngicos obtidos foram pré-selecionados com base na diferença de morfologia de colônias, totalizando 16 isolados obtidos de plantas tratadas com leite (isolados cujo código é precedido de L) e 2 de plantas tratadas com água (isolados cujo código é precedido de A). Os principais fungos obtidos foram aqueles leveduriformes, semelhantes morfologicamente às bactérias, mas diferentes destas pelo tamanho de células, observado em lâminas coradas com cristal violeta.

Dentre os períodos de aplicação dos antagonistas testados (Tabela 6), aqueles em que os discos foram tratados simultaneamente (0h) ou 24 horas após a inoculação foram aqueles nos quais se observaram diferenças significativas entre os tratamentos e a média dos três (-24, 0 e +24h), melhor separou os grupos mais eficientes. Este grupo foi composto pelo isolados L17, L34, L13, L38, L43, L36, A4, L39. Discos tratados com estes isolados não diferiram



significativamente ($p=0,05$) daqueles tratados com leite a 20% (v/v) e diferiram daqueles tratados com água. Ainda se for considerada a importância do inóculo inicial na epidemiologia de doenças de plantas (Agrios, 1997), os discos que tiverem maior número de colônias iniciais tendem a ter uma severidade maior que aqueles com menor inóculo inicial. No grupo dos isolados mais eficientes, os seis primeiros (L17, L34, L13, L38 e L43) foram aqueles nos quais não foi observada qualquer colônia de oídio após sete dias da inoculação. Todos estes isolados foram obtidos de plantas tratadas com leite e da última diluição, ou seja, de maior ocorrência. Portanto, pode-se sugerir o envolvimento de bactérias e leveduras no controle do oídio da abobrinha, mediado pela aplicação do leite.

Considerando-se ainda o período de tratamento em relação à inoculação, a eficiência de controle obtida 24 horas após a inoculação é característica de relação hiperparasítica, tendo em vista que este intervalo de tempo foi o suficiente para a maior parte dos conídios germinarem e penetrarem no tecido do hospedeiro (Celio & Hausbeck, 1997). Na seleção de isolados de *Bacillus subtilis* para controle de oídio em plantas, Bettioli et al. (1997) obtiveram eficiência de controle quando os isolados foram aplicados 24 horas após ou 1 hora antes ou depois.

A composição da microbiota mais eficiente no controle é composta, principalmente (80%), de bactérias, mas, apesar de encontrados isolados com potencial antagonico ao oídio em uma pequena população de microrganismos epifíticos, não se sabe se esta característica se reproduz em outros agroecossistemas ou empregando outras fontes de leite. Os isolados deverão ser identificados e comparados filogeneticamente com aqueles oriundos da folha sem tratamento e aqueles oriundos do leite.

No que concerne à variação em composição microbiana do leite, em um levantamento da diversidade de bactérias do leite humano de mulheres sadias de vários países do mundo, constatou-se que predominam aquelas gram-positivas

(Favier et al., 2002). Estas bactérias, principalmente *Lactobacillus lactis* são muito competitivas, produtoras de ácido láctico e peróxido de hidrogênio, além de resistentes a diversos antibióticos (ciprofloxacina, gentamicina, kanamicina, ácido nalidíxico e trimetoprim combinado com sulfametoxazole), mas, é sensível a ampicilina, amoxicilina, cefalotina, cloranfenicol, eritromicina, penicilina e tetraciclina (Martin et al., 2005) e um isolado tem atividade antagonística contra *Xanthomonas campestris* (Shastry & Prasad, 2002).

TABELA 6: Eficiência de microrganismos epifíticos de plantas de abobrinha tratadas com leite ou água no controle do oídio em discos de folha cotiledonares de abobrinha avaliados sete dias após a inoculação.

| Tratamento ¹ | Contagem de colônias ^{1,2} | | | Média ^{1,2} | Microrganismo ³ |
|-------------------------|-------------------------------------|--------|--------|----------------------|----------------------------|
| | -24h | 0h | +24h | | |
| L17 | 0,00 a | 0,00 a | 0,00 a | 0,00 a | Bactéria |
| L34 | 0,00 a | 0,00 a | 0,00 a | 0,00 a | Bactéria |
| L13 | 0,00 a | 0,00 a | 0,00 a | 0,00 a | Bactéria |
| L38 | 0,00 a | 0,00 a | 0,00 a | 0,00 a | Bactéria |
| L43 | 0,00 a | 0,00 a | 0,00 a | 0,00 a | Levedura |
| Leite 20%(v/v) | 0,00 a | 0,00 a | 0,00 a | 0,00 a | - |
| L36 | 0,00 a | 0,00 a | 0,17 a | 0,05 a | Bactéria |
| A4 | 0,00 a | 0,00 a | 0,17 a | 0,05 a | Bactéria |
| L39 | 0,00 a | 0,00 a | 0,17 a | 0,06 a | Levedura |
| L35 | 0,00 a | 0,00 a | 0,25 a | 0,08 a | Levedura |
| L31 | 0,16 a | 0,00 a | 0,17 a | 0,11 a | Levedura |
| L23 | 0,00 a | 0,17 a | 0,33 a | 0,17 b | Levedura |
| L12 | 0,00 a | 0,25 b | 0,25 a | 0,17 b | Bactéria |
| L9 | 0,00 a | 0,00 a | 0,60 b | 0,20 b | Levedura |
| L19 | 0,00 a | 0,25 b | 0,50 b | 0,25 b | Bactéria |
| L1 | 0,25 a | 0,17 a | 0,33 a | 0,25 b | Bactéria |
| L7 | 0,00 a | 0,17 a | 0,75 b | 0,31 b | Levedura |
| A5 | 0,16 a | 0,00 a | 0,83 b | 0,33 c | Levedura |
| L22 | 0,00 a | 0,33 b | 1,25 c | 0,52 c | Bactéria |
| Controle | 0,40 a | 0,60 b | 1,33 c | 0,77 d | - |
| CV (%) | -----12,27----- | | | | |

¹conjunto de isolados oriundos do leite (códigos precedidos de "L") ou água (códigos precedidos de "A"); ²para comparação de médias, os dados foram transformados segundo $\sqrt{(x+0,5)}$ e as médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (p=0,05); ³diferenciação dos microrganismos baseado no tamanho das células após coloração em lâmina com cristal violeta

4.2 Atividade fungicida do leite

O leite teve atividade fungicida diretamente proporcional à sua concentração, com diferença significativa entre os níveis (Figura 1), tanto na avaliação aos sete (Figura 1 A) quanto aos 14 dias (Figura 1 B) medida pelo número de colônias do fungo após os referidos períodos. A exposição de conídios de oídio ao leite reduziu sua viabilidade, seja pela ação fungicida durante a incubação, sua persistência após a aplicação ou combinação de ambos.

Quando se avaliou a folha logo acima da última inoculada, também foi verificado melhor ajuste dos resultados ao modelo de regressão exponencial. Com a separação espacial e temporal entre a inoculação (com o inóculo originado das colônias das folhas subjacentes do mesmo tratamento e ou de plantas vizinhas no mesmo bloco e em blocos vizinhos) e tratamento, respectivamente, tem-se um dos elementos necessários para indício de um mecanismo de indução de resistência sistêmica (Figura 1C) (Hammerschmidt & Yang-Casiman, 1995). Em estudo anterior, Stadnik & Bettiol (2001) não encontraram atividade da enzima peroxidase significativamente maior que o controle. Entretanto, a resposta de indução de resistência pode ser desencadeada por outras enzimas (Schneider & Ullrich, 1994) ou o “time course” de amostragem para avaliação desta pode não ter sido o ideal para determinação da resposta de defesa.

No estudo da variação na produção da peroxidase como resultado da infecção por oídio em pepino, foram feitas amostragens diárias das 24 às 144 horas após a inoculação e diferenças entre os níveis foram observadas a partir das 72 horas, com pico observado na última amostragem (Zavareh et al., 2004). Mais estudos devem ser concentrados no envolvimento da indução de resistência como um dos possíveis mecanismos de ação pelo qual o leite controla o oídio, tendo em vista que paredes celulares de microrganismos mortos pela

autoclavagem e conídios de oídio inativados pelo leite também podem ter agido como eliciadores da indução e que estes não são veiculados pelo leite cru, que é o recomendado.

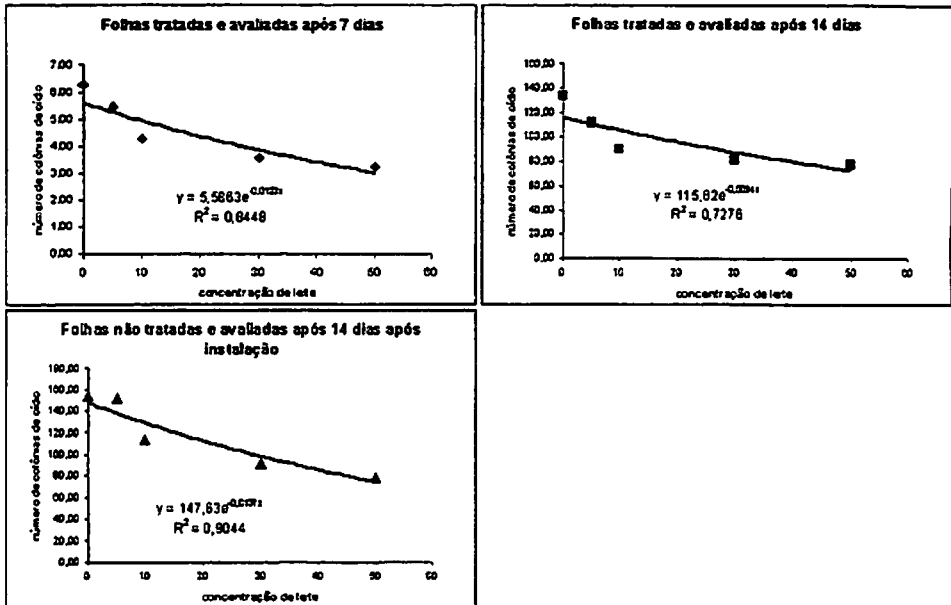


FIGURA 1: Ajuste de modelo de regressão para avaliar o efeito fungicida aos esporos de oídio (*Podospheara xanthii*) de concentrações de leite a 0%, 5% 10%, 30% e 50% (v/v), medido pelo número de colônias do patógeno em folhas tratadas aos sete (A) e 14 dias após o tratamento (B) ou não tratadas, após 14 dias do tratamento das folhas subjacentes (C).

4.3 Alterações morfológicas por microscopia eletrônica de varredura de folhas infectadas e tratadas com água, fungicida e leite

No estudo de microscopia eletrônica de varredura, em todos os períodos amostrados, nas plantas tratadas com leite, sempre se observou um depósito sobre as folhas e estruturas fúngicas. Nas amostras coletadas aos 12 dias após a primeira pulverização, foram observadas alterações sobre as folhas, estrutura

fúngica e microbiota associada, a saber, detalhes morfológicos de danos à estrutura de oídio, conídios e conidióforos, desenvolvimento de microrganismos saprófitas e a formação de uma matriz sólida na superfície foliar.

Nas Figuras 3, 4 e 5 podem-se observar as alterações na estrutura do oídio pelo tratamento de plantas de abobrinha com fungicida, leite 10% (v/v) e 30% respectivamente, quando comparadas com o padrão de plantas tratadas com água (Figura 2), denotado pelas setas 1 e 2 para o conjunto conidióforos/conídios e hifa, respectivamente. As colônias de oídio em plantas tratadas com o fungicida fenarimol têm retração da parede celular de hifas e conídios (Figura 3 A) e esparso desenvolvimento micelial na superfície foliar tratada (Figura 3 B). Já para as plantas tratadas com leite, pode-se observar um desenvolvimento mais esparso do patógeno e este efeito é maior para a maior concentração (Figura 6 A e B). Em *close*, as alterações morfológicas da estrutura do oídio são menores, com ligeira retração da superfície de hifas ou conidióforos (Figuras 4A e 5A). Crisp et al. (2004) também constataram que os danos sobre as estruturas fúngicas causadas pela aplicação de fungicidas foram diferentes daquelas produzidas por leite.

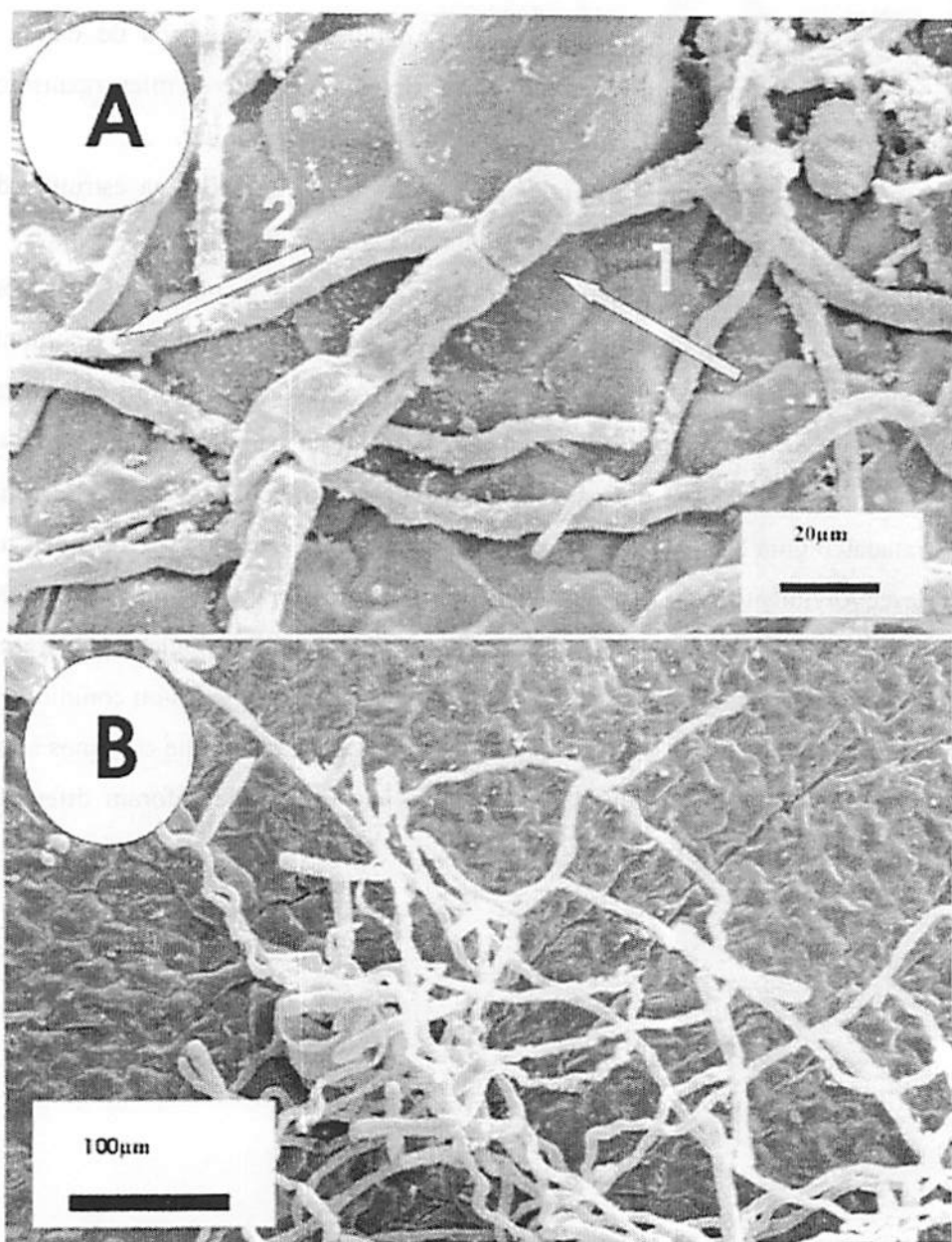


FIGURA 2: Eletromicrografia de varredura em close (A) e vista panorâmica (B) no estudo da superfície foliar de plantas de abobrinha tratadas com água, com setas mostrando detalhes de (1) conidióforo e conídio maduro e (2) hifa.

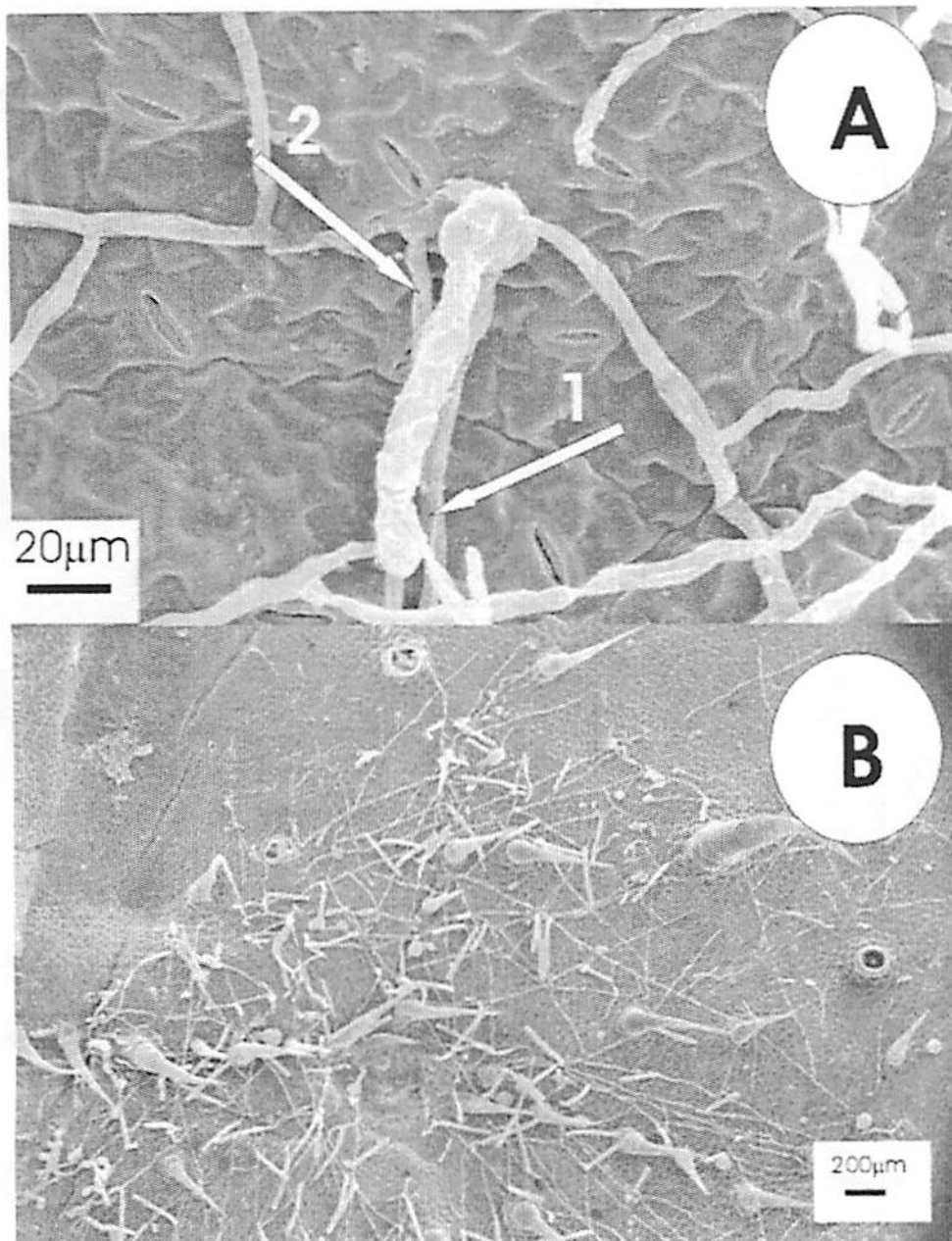


FIGURA 3: Eletromicrografia de varredura em close (A) e vista panorâmica (B) no estudo da superfície foliar de plantas de abobrinha tratadas com fungicida fenarimol (0,15mL/L), com setas mostrando detalhes de (1) conidióforo e conídio maduro e (2) hifa.

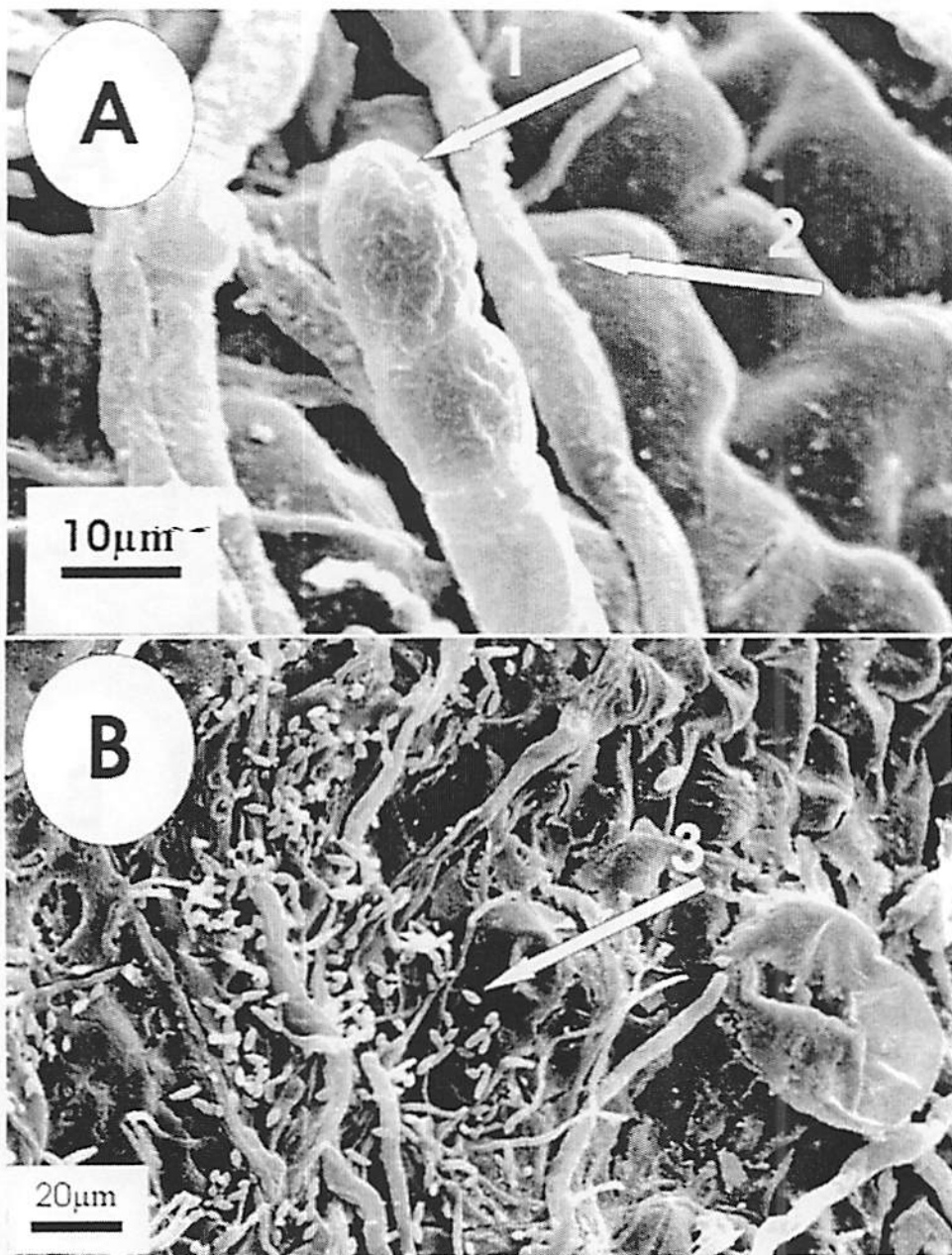


FIGURA 4: Eletromicrografia de varredura em close de hifa e conidióforo (A) e desenvolvimento de leveduras (B) no filopiano de plantas de abobrinha tratadas com leite 10%, com setas mostrando detalhes de (1) conidióforo e conídio maduro e (2) hifa; e (3) células leveduriformes.

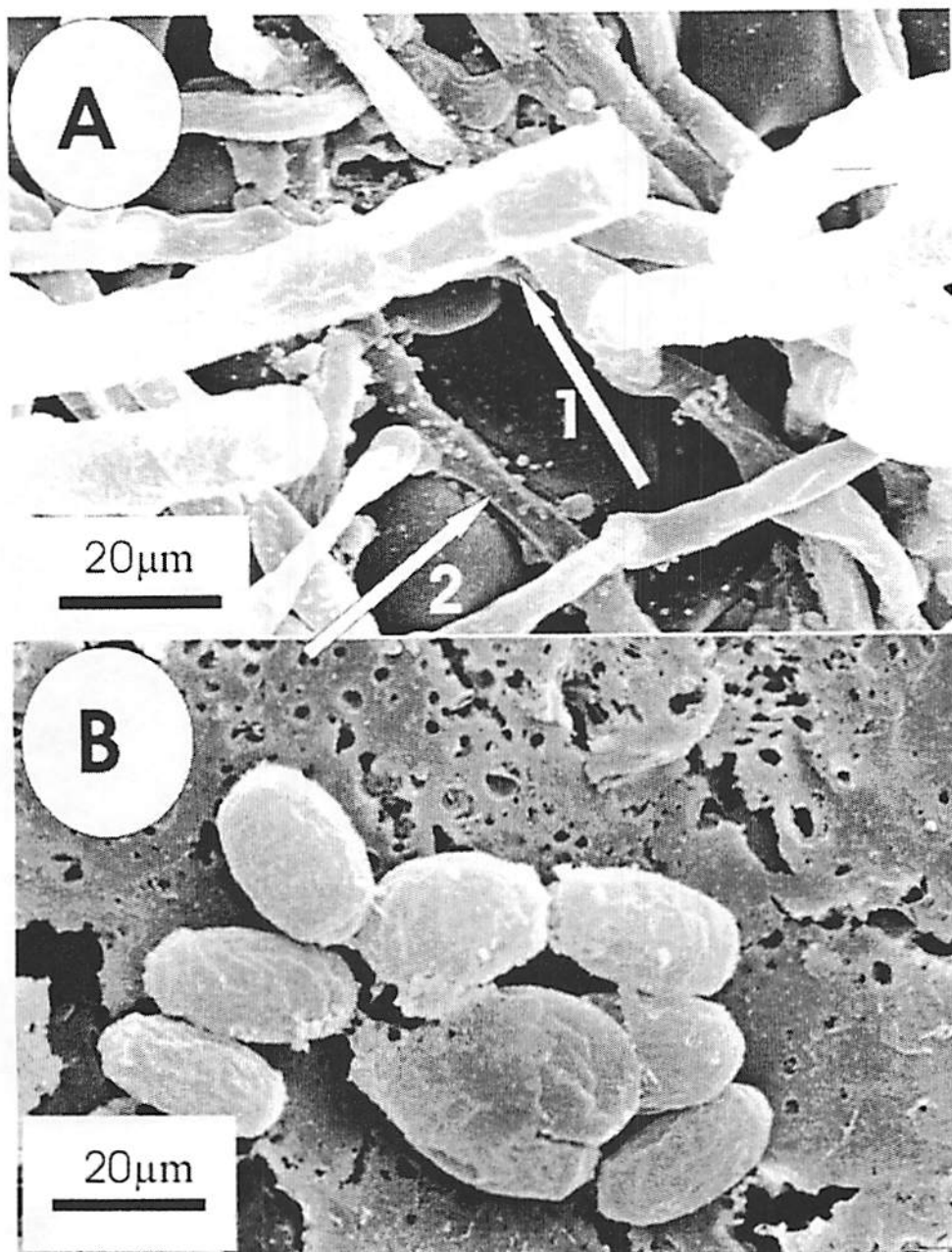


FIGURA 5: Eletromicrografia de varredura em close de hifa e conidióforo (A) e conídios não germinados (B) no filoplano de plantas de abobrinha tratadas com leite a 30%, com setas mostrando detalhes de (1) conidióforo e conídio maduro e (2) hifa.

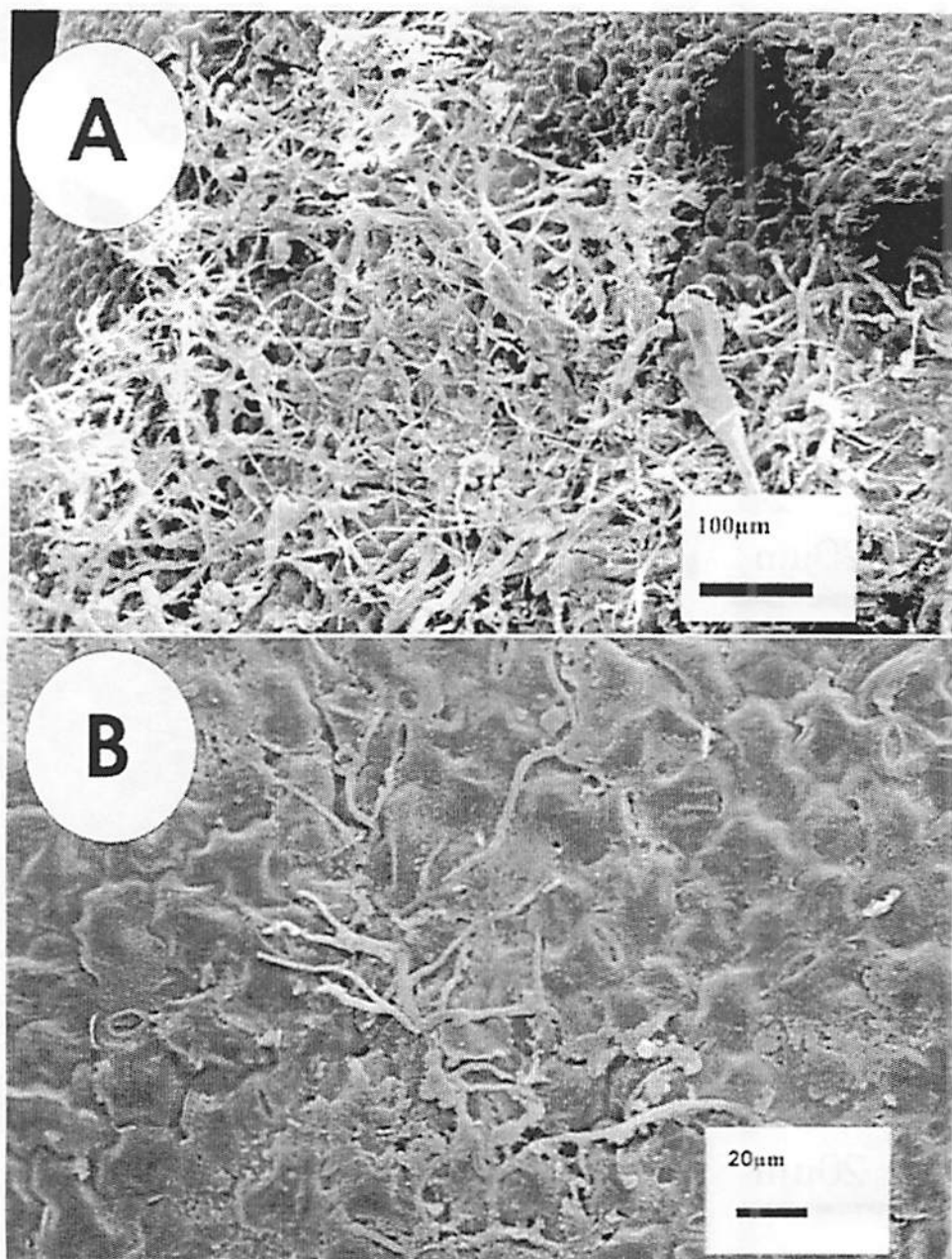


FIGURA 6: Eletromicrografia de varredura no estudo da superfície foliar de folhas de abobrinha cv. Caserta tratadas com leite a 10% (A) e 30% (B) e infectadas por oídio (*Podosphaera xanthii*).

Além de alteração em conidióforos e conídios ainda não liberados, em conídios depositados sobre a superfície foliar (Figura 5 B) foi observada uma redução na germinação (dados não quantificados neste ensaio) de conídios. Esta característica foi ainda maior em plantas tratadas com leite a 30% (v/v), com um depósito de uma matriz sólida ainda não identificada, sobre hifas e conidióforos (Figura 6 B) e conídios (Figura 5 B). O recobrimento de conídios por depósitos do leite impedindo sua germinação é um mecanismo semelhante ao de óleos derivados de petróleo e vegetais usados no controle de oídio com eficiência tão alta quanto fungicida (Northover & Schneider, 1996). Estes óleos agem não apenas em pré-lesão, reduzindo a germinação de conídios, como também como antiesporulante, em lesões já estabelecidas. Ainda não foi verificada a atividade antiesporulante do leite no controle de oídio. Os danos sobre conídios e conidióforos obtidos nos tratamentos com leite sugerem que maiores estudos devem se voltar para linha de pesquisa para suprir a deficiência de produtos com este modo de ação. Hoje, apenas o trifloxystrobin, o único fungicida mesostêmico conhecido e ainda em processo de registro no Brasil, tem atividade antiesporulante (Azevedo, 2001).

No tratamento de plantas com leite a 10% (v/v) (Figura 4 B) ficou evidente o desenvolvimento de células leveduriformes com 3 a 5 μ m em associação com as hifas de conídios, contudo, não foi encontrada nenhuma interação hiperparasítica. O desenvolvimento abundante de leveduras após o tratamento de plantas com leite pode ser resultante do acúmulo de nutrientes do leite ou saprófitas que se desenvolveriam sobre restos de micélio de oídio após a ação direta do leite. Podem ser saprófitas sem ou com atividade antagonística ao oídio pela produção de metabólitos ou agindo por competição por espaço ou nutrientes (Dik et al., 1993) e que interfiram no ciclo de vida do patógeno ou metabólitos que induzam resistência no hospedeiro.

Além do mais, a população dos microrganismos epifíticos está sujeita à menor competição, diferentemente daquela encontrada no solo, mas está sujeita às mudanças bruscas de temperatura durante o dia (Dickinson, 1971). Como forma de superar estas adversidades, eles são comumente encontrados na superfície foliar em associação com uma matriz exopolimérica de dezenas de micrômetros, denominada de biofilme (Morris et al., 1998). Esta associação garante maior resistência ao ressecamento, trocas metabólicas e genéticas e plasticidade fenotípica (Costerton et al., 1995; Zottola & Sasahara, 1994). Não foi encontrada associação do tipo biofilme entre as leveduras e o leite, mas, sabe-se que bactérias associadas ao leite (*Listeria ivanovi*) podem formar biofilmes sobre ordenhadeiras ou tanques e, com isso, resistir até mesmo à ação de desinfetantes (Tiecco, 2003).

4.4 Efeito do leite na germinação e na esporulação de oídio

O tratamento preventivo com leite a 30% não reduziu significativamente a germinação de conídios de oídio ou esporulação (Tabela 7) medida pelo número de conidióforos por campo de 400x do microscópio de luz. Os dados de germinação corroboram com aqueles obtidos por Stadnik & Bettioli (2001), mas, divergem daqueles obtidos por Crisp et al. (2004) e Drury et al. (2003). Neste caso, a divergência de resultados pode ser resultado do período de aplicação do leite em relação à inoculação. Enquanto o presente resultado e o de Stadnik & Bettioli (2001) foram obtidos em plantas tratadas antes da inoculação, os demais foram obtidos após a aplicação, o que indicaria que os danos por leite ocorreriam por contato.

Em relação à baixa eficiência do fungicida usado em todos os ensaios, pode-se deduzir uma perda de eficiência do produto devido à seleção de populações resistentes. E, na germinação de conídios, o fenarimol, em geral, não

tem efeito (Azevedo, 2001), mas sim na penetração e desenvolvimento subsequente do patógeno.

TABELA 7: Efeito do leite na germinação de conídios e na esporulação de *Podosphaera xanthii* em discos de folha clareados.

| Tratamentos ¹ | Germinação (%) ¹ | | | Conidióforos ^{1,2} |
|--------------------------|-----------------------------|---------|----------|-----------------------------|
| | 24h | 48h | 72h | |
| Água | 51,00 a | 42,7 a | 39,90 ab | 5,53 a |
| Leite 10% | 37,50 a | 52,43 a | 26,10 a | 3,33 a |
| Leite 30% | 31,00 a | 42,66 a | 23,70 a | 2,02 a |
| Fenarimol 0,15 ml/l | 62,33 a | 47,0 a | 51,33 b | 5,38 a |
| CV (%) | | 28,69 | 22,18 | 24,98 |

¹médias transformadas segundo $\sqrt{(x+0,5)}$, medidos 120 horas após aplicação dos tratamentos; médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si. pelo teste de Tukey (p=0.05); ²número médio de conidióforos por campo no aumento de 400x de microscópio de luz

4.5 Atividade de frações e níveis de esterilização do leite no controle do oídio

No estudo da atividade de frações e níveis de esterilização do leite foram obtidos três grupos de eficiência de controle (Tabela 8): leite cru e pasteurizado, em seguida o leite pasteurizado, o UHT, integral e desnatado, e lactose. Todos os cátions, o fósforo e a caseína foram significativamente semelhantes à testemunha. A uréia foi utilizada para isolar o efeito do amônio no cloreto de amônio. A severidade do oídio em plantas tratadas com leite cru foi semelhante àqueles tratados com leite pasteurizado, o que demonstra que a maior parte dos microrganismos ou metabólitos endógenos do leite e envolvidos no controle é estável até temperaturas de 72°C por 15 segundos. Além desta temperatura

(tratamento UHT, exposição a 138°C por, pelo menos, 2 segundos) a eficiência de controle cai em 34,84%. Como as fontes de leite pouco variam em composição (Tabela 4), apenas em relação ao processamento (cru, pasteurizado ou UHT), sugere-se mais de um mecanismo de ação do leite no controle do oídio. O ensaio inicial com leite para controle de oídio foi realizado com leite cru, contudo, ainda não se tinha um relato sobre a eficiência de outras fontes de leite. Mas, isto pode explicar o baixo desempenho do leite no controle do oídio do trigo *Erysiphe graminis* var. *tritici*. Drury et al. (2003) utilizaram o leite pasteurizado para controle da referida doença e apenas obtiveram resultado significativo de redução do progresso da doença a partir de doses de 50% (v/v).

No que se refere à eficiência das frações, a única, dentre as testadas, que mostrou resultado significativo de controle foi a lactose, que reduziu a AACPD em 54,07%, resultado este significativamente semelhante ao do leite UHT. Anteriormente, Crisp et al. (2002) mostraram a eficiência desta fração no controle do oídio da videira, com até 75% de redução na severidade da doença. Além da lactose, provavelmente, também está envolvida no controle a ação da lactoferrina, relatada por Crisp et al (2004) como tão eficiente quanto o leite nos danos causados a conídios e parte da composição das proteínas do soro do leite.

Somando-se ao efeito direto sobre a população de microrganismos, o aquecimento interfere na estabilidade de moléculas ativas: a fase de soro, lactose e caseína são afetadas pelo aquecimento. Estas são dissociadas (micelas de caseínas), hidrolizadas (lactose) ou defosforiladas (caseínas) e o efeito da temperatura também é função do tempo de exposição. Para a dissociação da caseína são necessários, pelo menos, seis minutos de exposição à 120°C. A degradação ainda é potencializada pela autooxidação de moléculas quando, ao tratamento térmico, se sucede uma exposição à luz (Bassette et al., 1983). Esta atua como agente catalizador, aumentando a autooxidação no leite. A intensidade do efeito é função do tempo de exposição, intensidade e

comprimento de onda da luz (DeMan, 1999). Tendo em vista que, uma vez pulverizado sobre a planta, mesmo protegido em casa de vegetação, o leite depositado na superfície foliar está sob ação da luz, as moléculas passíveis de sofrerem autoxidação terão menor persistência que as mesmas moléculas oriundas de leite não tratado. A luz foi relatada como mediadora da atividade do leite sobre o oídio em videira. Crisp et al. (2004) observaram que folhas infectadas com oídio, tratadas com leite e mantidas no escuro apresentam menor alteração sobre hifas que aquelas mantidas no claro, mas que os danos sobre conídios foram semelhantes, mais uma vez indicando múltiplas moléculas com propriedades diferentes envolvidas no controle.

Em relação à gordura, foi relatado anteriormente seu papel regulador da eficiência do leite, ou seja, a eficiência de controle foi tanto maior quanto maior seu teor. Neste caso, o baixo desempenho da gordura, diferente numericamente do leite UHT integral, mas não significativamente ($P=0,05$), pode ser atribuído aos efeitos danosos da esterilização seguida de resfriamento usado no leite testado. Mudanças bruscas de temperatura do leite, por resfriamento ou tratamento térmico, reduzem a atividade de bloqueadores da atividade da lipoproteína lípase (LPL), aumentando a atividade desta última (LPL), atividade esta relacionada à degradação de triglicerídeos de lipoproteínas de baixo peso molecular (Chilliard et al. 2003).

Nenhum dos sais testados demonstrou eficiência de controle significativamente superior à testemunha, apesar do relato de sais de potássio e fósforo terem comprovada atividade antifúngica e eliciadora da resistência sistêmica em plantas. A possível explicação para este baixo desempenho é a de que a concentração de 6,69mM de fósforo inorgânico e 10,59mM de potássio, principais cátions do *pool* usado, referente à concentração de sais correspondentes à 30% da concentração de leite foi menor do mínimo testado

para controle do oídio, que é de 25 a 50mM para o potássio ou fósforo (Murcharromah & Kuc, 1991; Mosa, 1997), respectivamente.

TABELA 8: Atividade de frações e níveis de esterilização do leite no controle do oídio (*Podospahera xanthii*)

| Tratamento | AACPD ^{2,3} | Redução na AACPD (%) |
|----------------------|----------------------|----------------------|
| Leite cru | 1,81 a | 87,83 |
| Leite pasteurizado | 3,76 ab | 74,71 |
| Leite UHT | 6,36 b | 57,23 |
| Lactose | 6,83 b | 54,07 |
| Leite desnatado | 6,84 b | 54,00 |
| Cátions ¹ | 12,33 c | 17,08 |
| Fósforo | 13,03 c | 12,37 |
| Uréia | 13,11 c | - |
| Caseína | 13,39 c | 9,95 |
| Água - testemunha | 14,87 c | - |
| Cloreto de amônio | 15,72 c | -5,7 |
| CV (%) | 25,03 | |

¹principais cátions encontrados no leite: cálcio, magnésio, potássio e sódio; ²área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) calculado de acordo com Fry (1978); ³para comparação de médias, os dados foram transformados segundo $\sqrt{(x + 0,5)}$ e médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p=0,05$).

5 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, nas condições dos ensaios realizados, constatou-se que:

- ✓ a pulverização de plantas de abobrinha com leite estimulou o desenvolvimento de microrganismos epifíticos envolvidos no controle do oídio, que atuaram concomitantemente ou após a germinação e penetração do patógeno;
- ✓ em plantas tratadas com leite foram observadas alterações sobre conídios e conidióforos e redução da germinação dos conídios depositados na superfície foliar;
- ✓ aplicações de leite estimularam o desenvolvimento de leveduras sem atividade hiperparasítica detectável;
- ✓ as alterações sobre as estruturas do oídio produzidas pelo leite diferiram daquelas produzidas pelo tratamento com fungicida;
- ✓ a exposição de conídios de oídio ao leite reduziu a sua germinação e a atividade foi maior à medida que se elevou a concentração de leite;
- ✓ a aplicação preventiva de leite não interferiu significativamente na germinação ou esporulação de *Podosphaera xanthii*;
- ✓ o leite, cru ou pasteurizado, é eficiente no controle do oídio da abobrinha;
- ✓ a lactose é uma das frações envolvidas no controle do oídio;
- ✓ os sais, na concentração equivalente a 30% daquela encontrada no leite, não foram os responsáveis pelo controle do oídio da abobrinha;
- ✓ os mecanismos de ação do leite podem ser explicados pela ação combinada de moléculas e microrganismos epifíticos;

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 4.ed. San Diego: Academic, 1997. 635p.

ALVES, E. ***Xylella fastidiosa* – adesão e colonização em vasos do xilema de laranja doce, cafeeiro, amexeira, fumo e espécies de cigarrinhas vetoras e formação de biofilme sobre película de poliestireno**. 2003. 122f. Tese (Doutorado em Fitopatologia)-Departamento de Fitopatologia. Escola Superior de Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

AMRANE, A.; PRIGENT, Y. A novel concept of bioreactor: specialized function two-stage continuous reactor, and its application to lactose conversion into lactic acid. **Journal of Biotechnology**, v.45, n.3, p.195-203, 1996.

AZEVEDO, L. A.S. **Proteção integrada de plantas com fungicidas: teoria, prática e manejo**. São Paulo: Emopi, 2001. 230p.

AZEVEDO, L.A.S.; OLIVEIRA, S.H.F. **Utilização de fungicidas protetores no manejo da resistência de fungos**. Campinas: Emopi Gráfica, 2003. 24p. (FRAC Boletim Técnico, 1).

BALLANTYNE, B. Powdery mildew on cucurbitaceae: identity, distribution, host range and sources of resistance. **Proceedings of the Linnean Society of New South Wales**, v.99, n.2, p.100-120, 1975.

BASSETTE, R.; FUNG, D.Y.C.; ROBERTS, H. Effect of pasteurization temperature on susceptibility of milk to light-induced flavor. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.46, p.416-419, 1983.

BETTIOL, W. Productos alternativos para el control del oídio (*Sphaerotheca fuliginea*) de la calabaza. In: CONGRESSO NACIONAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FITOPATOLOGIA, 8., 1996, Córdoba. **Anais...** Córdoba, 1996. p.232.

BETTIOL, W. Controle de doenças de plantas com agentes de controle biológico e outras tecnologias. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. (Ed.). **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2003. Cap.6, p.191-215, 2003.

BETTIOL, W.; ASTIARRAGA, B.D. Controle de *Sphaerotheca fuliginea* em abobrinha com resíduo da fermentação glutâmica do melaço e produto lácteo fermentado. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, n.4, p.431-435, 1998.

BETTIOL, W.; ASTIARRAGA, B.D.; LUIZ, A.J.B. Effectiveness of cow's milk against zucchini squash powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) in greenhouse conditions. **Crop Protection**, Guildford, v.18, p.489-492, 1999.

BETTIOL, W.; GARIBALDI, A.; MIGHELI, Q. *Bacillus subtilis* for the control of powdery mildew on cucumber and zucchini squash. **Bragantia**, Campinas, v.56, n.2, p.281-287, 1997.

BLANCARD D.; LECOQ, H.; PITRAT, M. **Enfermedades de las Cucurbitáceas: observar, identificar, luchar**. Limoges: Mundi, 1996. 301p.

BORIANI, L. **Relazione tecnica sulle possibilita' di impiego del polisolfuro di calcio nella lotta biologica e integrata**. Bologna: G. Grandi Università di Bologna Instituto di Entomologia, 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n. 451 de 19 set. 1997. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 set.1997. p.21005-21012.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **AGROFIT**. Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/criacabecalho_agrofit_cons>. Acesso em: 05 dez. 2003.

BROWN, A.W.A. **Ecology of pesticides**. New York: J. Wiley & Sons, 1978. 525p.

CARDOSO, E.J.B.N.; JAHNEL, M.C.; DIAS, C.T.S. Determinação do número mais provável de microrganismos do solo pelo método de

plaqueamento por gotas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.23, p.553-559, 1999.

CELIO, G.L.; HAUSBECK, M.K. Conidial germination, infection structure formation and early colony development of powdery mildew on *Poinsettia*. **Phytopathology**, St. Paul, v.88, n.2, p.105-113, 1997.

CHEAH, L.H.; PAGE, B.B.C.; COX, J.K. Epidemiology of powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) of squash. In: CONFERENCE OF THE NEW ZELAND PLANT PROTECTION SOCIETY INCORPORATED, 44., 1996, Lincoln, **Proceedings...** New Zeland, 1996. p.147-150.

CHILLIARD Y. et al. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. **Journal of DairyScience**, Savoy, v.86, p.1751-1770, 2003.

COHEN, R. et al. Occurrence of *Sphaerotheca fuliginea* race 3 on cucurbits in Israel. **Plant Disease**, St. Paul, v.80, n.3, p.344, 1996.

COSTERTON, J.W.Z et al. Microbial biofilms. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v.49, p.711-745, 1995.

CRISP, P. et al. Sustainable control of grapevine powdery mildew (*Uncinula necator*). In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM FOR ORGANIC WINE GROWING, 1., 2004, Stuttgart, Germany. **Proceedings...** Stuttgart, Germany, 2004. p. 47-52.

CRISP, P.; SCOTT, E.S.; WICKS, T. Novel control of grapevine powdery mildew. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON GRAPEVINE POWDERY MILDEW AND DOWNY MILDEW, 4., 2002, Davis. **Proceedings...** Davis: University of California, 2002. p.78-79.

DAL SOGLIO, F.K. Manejo de doenças na perspectiva da transição agroecológica. In: STADNIK, M.J.; TALAMINI, V. **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis: Alternativa, 2003. Cap.1, p.1-16.

DAVIDSE, L.C. Benzimidazole fungicides: mechanism of action and resistance. In: DELP, C.J. **Fungicide resistance in North America**. St Paul: American Phytopathological Society, 1988. p.25-30.

DEKKER, J. Resistance. In: MARSH, R.W. **Systemic fungicides**. 2.ed. London: Butler & Tanner, 1977. Cap.9, p.176-197.

DEKKER, J. Development of resistance to modern fungicides and strategies for its avoidance. In: LYR, H. **Modern selective fungicides: properties, applications, mechanisms of action**. 2.ed. New York: Gustav Fisher, 1995. p.23-38.

DEMAN, J. **Principles of food chemistry**. 3.ed. Gaithersburg: Aspen, 1999. 520p.

DICKINSON, C.H. The micro-climate at the leaf surface. In: PREECE, T.F.; DICKINSON, C.H. **Ecology of leaf surface microorganisms**. New York: Academic, 1971. p.91-103.

DIK, A.J.; VERHAAR, M.A.; BELANGER, R.R. Comparison of three biological control agents against cucumber powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) in semi-commercial-scale glasshouse. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.104, n.4, p.413-423, 1998.

DRURY, G.E.; KETTLEWELL, P.S.; JENKINSON, P. The potential of milk and whey as fungicides against powdery mildew in wheat. **Tests of agrochemicals and cultivars**, London, v.24, p.26-27, 2003.

ECKERT, J.W. Historical development of fungicide resistance in plant pathogens. In: DELP, C.J. **Fungicide resistance in North America**. Saint Paul: APS, 1994. p.1-3.

EVERTS, K. L. Reduced fungicide applications and host resistance for managing three diseases in pumpkin grown on a no-till cover crop. **Plant Disease**, Saint Paul, v.86, n.10, p.1134-1141, 2002.

MICROSOFT OFFICE PROFESSIONAL . EXCEL 97. USA: Microsoft, 1997. Software

FAVIER, C.F. et al. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.1, p.219-226, 2002.

FAZZA, A.C. et al. Ocorrência de raça 2 de *Podosphaera xanthii* em melão em Mossoró (RN). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30. p.S136, 2005. (Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 38, 2005).

FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D. et al. El oídio de las cucurbitáceas. Disponível em: <<http://www.terraia.com/revista42/pagina70.asp>> Acesso em: 20 jul. 2004.

FERREIRA, C.R.R.P.T.et al. Preços médios de defensivos agrícolas pagos pela agricultura das principais regiões. IEA/AENDA/FUNDEPAG. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/precos/aenda0405.htm>>. Acesso em: 23 nov. 2005.

FERREIRA, D.F. **SISVAR**: Software para análises estatísticas. Lavras: UFLA/DEX, 2000. Software.

FERRI, C. et al. Isolation of *Salmonella* spp. from food in the area of Pesaro.

Igiene-Moderna, v.86, n.6, p. 813-820, 1992.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: UFV, 2000. 402p.

FRY, W.E. Quantification of general resistance of potato cultivars and fungicide effects for integrated control of potato late blight. *Phytopathology*, Saint. Paul, v.68, p.1650-1655, 1978.

GARGAS, A.; TAYLOR, J.W. Phylogeny of Discomycetes and early radiations of the Apothecial Ascomycotina inferred from SSU rDNA Sequence Data. *Experimental Mycology*, v.19, p.7-15, 1995.

GARIBALDI, A.; ALOI, A.; MINUTO, A. Osservazioni sull'attività di prodotti fosfatici nei riguardi di *Erysiphe* sp su pomodoro in coltura protetta. *ATTI Gionaté Fitopatologiche*, v.3, n.3, p.245-250, 1994.

GEORGIEVA, O Biological control of powdery mildew and mildew cucumber with *Enterobacter cloacae* Jordan. *Ecology and FutureBulgarian. Journal of Ecological Science*. v.2, n.2, p.32-34, 2003.

GRAAN, T.; ORT, D.R. Quantification of the rapid electron donors to P700, the functional plastoquinone pool, and the ratio of the photosystems in spinach chloroplasts. *The Journal of Biological Chemistry*, v.259, p.14003-14010, 1984.

HAINES, D. Dairy's healthy fat: a fatty acid naturally present in cows milk is associated with many healthful benefits. Product innovation, dairy management Inc., The domestic and international planning and management organization that builds demand for US, 2004, disponível: www.looksmartcoffee.com/p/articles/mi_m3301/is_12_105/ai_n8585731.

HAMMERSCHMIDT, R.; YANG-CASHMAN, P. Induced resistance in cucurbits. In: HAMMERSCHMIDT, R.; KUC, J. **Induced resistance to disease in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. Cap.3, v.4, p.63-85.

HARRIS, R.H.; SCHMIDT, B.J. **Managing a dairy cow on ranchette**. The Animal Science Department/Florida Cooperative Extension Service/Institute of Food and Agricultural Sciences/University of Florida, 2003. Disponível em: < <http://edis.ifas.ufl.edu>>. Acesso em: 19 set. 2005

HEIKKILÄ, M.P.; SARIS, P.E.J. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.471-478, 2003.

HERGER, G. et al. Die Wirkung von Auszügen aus dem Sachalin-Staudenknöterich, *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai, gegen Pilzkrankheiten, insbesondere Echte Mehltau-Pilze. **Nachrichtenblöcke Deutsch Pfalntzenschulzd**, Braunschweig, v.40, p. 56-60, 1988

HESS, F.D.; FALK, R.H. Herbicide deposition on leaf surface. **Weed Science**, v.38, p.280-288, 1990.

HIJWEGEN, T. Biological control of cucumber powdery mildew with *Tilletiopsis minor* under greenhouse conditions. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.98, p.221-225, 1992.

HOLT C. An equilibrium thermodynamic model of the sequestration of calcium phosphate by casein micelles and its application to the calculation of the partition of salts in milk. **European Biophysics Journal**, v.33, n.5, p.421-434, 2004.

HOMMA, Y.; ARIMOTO, Y.; MISATO, T. Effect of sodium bicarbonaté on each growth stage cucumber powdery mildew fungus (*Sphaerotheca fuliginea*) in its life cycle. **Journal of Pesticide Science**, v.6, p.201-209, 1981.

HORTEC. Folheto informativo de variedades. Indaiatuba, 2005. 4p.

HOTO, F.; PASCHOLATI, S.F. Oídio (*Sphaerotheca fuliginea*) em folhas de abobrinha de moita (*Cucurbita pepo*) exibindo pratéamento: germinação de conídios, formação de apressórios e aspectos bioquímicos da fitoxemia. **Summa Phytopathologica**, v.26, n.1, p.84-88, 2000.

HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Thichoderma* species in the biological control of plant diseases. **Plant Disease**, Saint Paul, v.87, p.4-10, 2003.

ISHIDA, A.K.N.; BETTIOL, W.; SOUZA, R.M. Controle de oídio (*Sphaerotheca fuliginea* (Shlecht. Et Fr.) Poll.) da abobrinha com extratos aquosos de matéria orgânica. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.5, p.1229-1234, 2001.

ISHII, H. et al. Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. **Phytopathology**, Saint Paul, v.91, n.2, p.1166-1171, 2001.

JENNES, R. Biochemical and nutritional aspects of milk and colostrums. In: LARSONBOUCE, B.L.; ANDERSON, R.R.(Ed.) **Lactation**. Aiwa: The Aiwa Staté University, 1995. p.164-195.

KADO, C.J.; HESKETT, M.G. Selective média for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 60, p.969-976, 1970.

KAILASAPATHY, K.; CHIN, J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. **Immunology and Cell Biology**. v.78, n.1, p.80-88, 2000.

KANYSHKOVA, T.G.; BUNEVA, V.N.; NEVINSKY, G.A. Lactoferrin and its biological functions. **Biochemistry**, Moscow, v.66, p.1-7, 2001.

KAVKOVA, M.; URN, V.P. *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a potential mycoparasite on *Sphaerotheca fuliginea* (Ascomycotina: Erysiphales). **Mycopathologia**, v.159, n.1, p.53-63, 2005.

KETTLEWELL, P.S.; COOK, J.W.; PARRY, D.W. Evidence for an osmotic mechanism in the control of powdery mildew disease of wheat by foliar-applied potassium chloride. **European Journal of Plant Pathology**, v.106, p.297-300, 2000.

KHAN, M.W.; SHARMA, G.K. Races of *Sphaerotheca fuliginea* infecting cucurbits in India and host differentials for their identification. **Indian Phytopathology**, v.46, n.3, p.236-242, 1993.

KHARCHENKO, G.L.; RYABCHINSKAYA, T.A. Planriz to control American powdery mildew on black currant. Zashchita-i-Karantin-Rastenii, Moscou, v.9, p.38-39, 2000.

KNUDSEN, I.M.B.; SKOU, J.P. The effectivity of *Tilletiopsis albescens* in the biocontrol of powdery mildew. **Annals of Applied Biology**, v.123, p.173-185, 1993.

KOBORI, R.F.; SUZUKI, O.; WIERZBICK, R.; DELLA VECCHIA, P.T.; CAMARGO, L.E.A. Ocorrência da raça 2 de *Sphaerotheca fuliginea* em melão no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, p.123, 2002. Suplemento.

KUMAR, V.; GUPTA, V.P. Scanning electron microscopy on the perithecial development of *Phyllactinia corylea* on mulberry-II sexual stage. **Journal of Phytopathology**, v.152, p.169-173, 2004.

KURTZ, F.E. Lipids of milk: composition and properties. In: WEBB, B.H.; JOHNSON, A.H. **Fundamentals of dairy chemistry**. Westport, Conn: The Avi, 1965. 484p.

LARGE, E.C., DOLING, D.A. The measurement of cereal mildew and its effect on yield. **Plant Pathology**, v. 11, p. 47-57, 1962.

LEE, F.A. Milk and milk products. In: LEE, F.A. **Basic food chemistry**. 2.ed. WestPort: The Avi, 1980. p.249-281.

LIMA, G.; CURTIS, F.; SPINA, A.M.; CICCIO, V. Survival and activity of biocontrol yeasts against powdery mildew of cucurbits in the field. **Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens**, IOBC Bulletin, Zurich, v .25, n.10, p.187-190, 2002.

LIN, C.Y.; TSAY, T.T. Effects of carbon and nitrogen sources on the trapping ability of nematode-trapping fungi. Plant-Pathology Bulletin, Taiwan, v.13, n.4, p. 309-316, 2004.

LOURENÇO, E.J. Proteínas do leite bovino. In: LOURENÇO, E.J. **Tópicos de proteínas de alimentos**. Jaboticabal: Funep 2000. Cap.5, p.179-231.

MARCO, S.; ZIU, O.; COHEN, R. Suppression of powdery mildew in squash by applications of whitewash, clay and antitranspirant materials. **Phytoparasitica**, v.22, n.1, p.19-29, 1994.

MARTIN, J.E. et al. Primary isolation of *N. gonorrhoeae* with a new commercial medium. **Public Health Report**, v.82, p. 361-363, 1967.

MARTÍN, R. et al. Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk. **Journal of Human Lactation**, v.21, n.1, p.8-17, 2005

MASUD, T.; ALI, A.M.; SULTANA, K. Antibiograms of staphylococcus aureus isolated from milk and milk products. Indian Journal of Nutrition and Dietetics, v.28, n.10, p.283-286, 1991.

MAY, J.T. Antimicrobial factors and microbial contaminants in human milk: recent studies. **Journal of Paediatrics and Child Health**, v.30, p.470-475, 1994.

McCREIGHT, J.D. et al. Powdery mildew resistance genes in muskmelon. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.112, p.156-160, 1987.

McGRATH, M.T.; SHISHKOFF, N. Evaluation of AQ10 (*Ampelomyces quisqualis*) for cucurbit powdery mildew under field conditions. **Phytopathology**, Saint Paul, v.86, n.8, p.S53, 1996.

McGRATH, M.T.; SHISHKOFF, N. Control of cucurbit powdery mildew with JMS Stylet-Oil. **Plant Disease**, Saint Paul, v.84, n.9, p.989-993, 2000.

McGRATH, M.T.; SHISHKOFF, N. Resistance to triadimefon and benomyl: dynamics and impact on managing cucurbit powdery mildew. **Plant Disease**, Saint Paul, v.85, n.2, 2001.

MCNALLY, D. J. et al. Synthesis of C-glycosyl flavonoid phytoalexins as a site-specific response to fungal penetration in cucumber. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Saint Paul, v. 63, p.293–303, 2003.

MINUTO, G.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M.L. Antagonistic activity of some microorganisms against powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) of zucchini: preliminary results. **Bulletin-SROP, Torino**, v.14, n.5, p.181-186, 1991.

MORRIS, C.E.; MONIER, J.M.; JACQUES, M.A. A technique to quantify the population size and composition of the biofilm component in communities of bacteria in the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.2, p.4789–4795, 1998

MOSA, A.A. Effect of foliar application of phosphatés on cucumber powdery mildew. **Annais Agricola Science**, Cairo, v.42, n.1, p.241-255, 1997.

MUCHARROMAH, E.; KUC, J. Oxalate and phosphates induce systemic resistance agianst diseases caused by fungi, bacteria and virases in cucumber. **Crop Protection**, Guildford, v.10, p.265-270, 1991.

NAVES, R.L. et al. Efic'hacia do leite de vaca no contorle do o'idio da videira (*Uncinula necator*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, p.S112, 2005. (Congresso Brasileiro de Fitopatololgia, 38).

NG, K.K.; MCDONALD, L. Biological control of rose powdery mildew with the antagonistic yeast *Tilletiopsis pallescens*. **HortScience**, v.32, n.2, p.262-266, 1997

NORTHOVER, J.; SCHNEIDER, K. E. Physical modes of action of petroleum and plant oils on powdery and downy mildews of grapevines. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 80, p.544-550, 1996.

OLALLA, I. **Etiología, biología y epidemiología del oídio de las cucurbitáceas en cultivos bajo plásticos**. 2001. Tese (Doutorado)-Universidad de Málaga.

OLIVEIRA, S.J. **Microbiologia veterinária: guia bacteriológico práctico**. Canoas: Ulbra, 2000. 240 p.

PARRY, M.A.A.; ZHANG, X.C.; BODE, W. Molecular mechanisms of plasminogen activation: bacterial cofactors provide clues. **Trends in Biochemical Sciences**, v.25, p.53–59, 2000.

PASINI, C. et al. Effectiveness of antifungal compounds against rose powdery mildew (*Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*) in glasshouses. **Crop Protection**, Guildford, v.16, n.3, p.251-256, 1997.

PAULITZ, T.; BELANGER, R. Biological control in greenhouse systems. **Annual Review of Phytopathology**, Saint Paul, v. 39, p. 103-133, 2001.

POWEL, J. **The sensory and analytical analysis of nonfat milk formulations: stability to light oxidation and pasteurization**. Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University, MSc, 2000, 56p. Disponível em: <<http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-09202001-143947/unrestricted/Jodi.pdf>>. Acesso em: 03 out. 2005.

PROCOPIO, S.O. et al. **Anatomia foliar de plantas daninhas do Brasil**. Viçosa: UFV, 2003. v.1, 118p.

QIU, J. et al. Human milk lactoferrin inactivated two putative colonization factors expressed by *Haemophilus influenzae*. **Proceedings of the Neonatal Academy of Science**, v.95, p.12641-12646, 1998.

RAIJ, B. et al. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2.ed. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas/Fundag, 1997. (Boletim, 100).

RAMASWAMY, V.; LATHA, N.; VENUGOPALAN, T. Aetiology and antibiogram of aerobic bacteria isolated from clinical mastitis in bovines. **Singapore Veterinary Journal**, v.18/19, p.37-38, 1994/95.

REIS, A.; BUSO, J.A. Levantamento preliminar de raças de *Sphaerotheca fuliginea* no Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.3, p.628-631, jul./set. 2004.

REUVENI, M.; AGAPOV, V.; REUVENI, R. Suppression of cucumber powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) by foliar sprays of phosphate and potassium salts. **Plant Pathology**, v.44, p.31-39, 1995.

REUVENI, M.; AGAPOV, V.; REUVENI, R. A foliar spray of micronutrient solutions induces local and systemic protection against powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) in cucumber plants. **European Journal of Plant Pathology**, v.103, p.581-588, 1997.

RIBEIRO, M.T.; CARVALHO, A.C. Higiene de los equipos de ordeno y tanques de refrigeración, visando la calidad de la leche. In: MARTINS, C.E. et al. **Tecnologias para la producción de le leche en los trópicos**. 2002. Cap.15, p.201-206.

RICHARDSON, J.M. et al. Quinoxifen performance on powdery mildew in low desert melons, 1999-2003. **Phytopathology**, Saint Paul, v.94, n.8, p.S88, 2004.

ROMERO, D. et al. Isolation and evaluation of antagonistic bacteria towards the cucurbit powdery mildew fungus *Podosphaera xanthii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Munster, v.64, n.2, p.263-269, 2003.

ROMERO, D. et al. Effect of mycoparasitic fungi on the development of *Sphaerotheca xanthii* in melon leaves. **Mycological Research**, v.107, n.1, p.64-71, 2002.

SAHOO, P.K.; ANSARI, M.I.A.; DATTA, A.K.; BAG, S.K. Effect of storage period at ambient condition on organoleptic and microbiological quality of in-bottle sterilized milk. **Journal of Interacademia**, v.9, n.1, p. 76-80, 2005.

SANTOS, C.A.G.; FURTADO, E.L.; SILVA, S.A. Controle de *Oidium* sp. Em mini-jardim clonal de eucalipto através de leite de vaca *in natura*. **Summa Phytopathologica**, v.29, n.1, p.51, 2003.

SCHNEIDER, S.; ULLRICH, W.R. Differential induction of resistance and induced enzyme activities in cucumber and tobacco caused by treatment with various abiotic and biotic inducers. **Physiological and molecular plant pathology**, Cambridge, v.45, p.291-304, 1994.

SCHROEDER, W.T.; PROWIDENTI, R. Resistance to benomyl in powdery mildew of cucurbits. **Plant disease Reporter**, Saint Paul, v. 52, p.271-275, 1968.

SHASTRY S.; PRASAD, M. S. Extracellular protease from *Pseudomonas* sp (CL 1457) active against *Xanthomonas campestris*. **Process Biochemistry**, London, v.37, p.611–621, 2002.

SHISHKOFF, N. The name of the cucurbit powdery mildew: *Podosphaera* (sect *Sphaerotheca*) *xanthii* (Castag.) U. Braun & N. Shish. **Comb. Nov. Phytopathology**, Saint Paul, v.90, n.6, p.S133, 2000.

SHISHKOFF, N.; McGRATH, M.T. AQ10 Biofungicide combined with chemical fungicides or AddQ spray adjuvant for the control of cucurbit powdery mildew in detached leaf culture. **Plant Disease**, Saint Paul, v.86, n.8, p.915-918, 2002.

SINGH, H. Heat stability of milk. **International Journal of Dairy Technology**, v.57, n.2/3, p.111-119, May/Aug. 2004.

SITTERLY, W.R. The powdery mildews of cucurbits. In: SPENCER, D. (Ed.) **The powdery mildews**. London: Academic, 1978. p.359-379.

SOGLIO, F.D.D. Manejo de doenças na perspectiva da transição agroecológica. In: STADNIK, M.J.; TALAMINI, V. **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis: CCA/UFSC, 2003. p.1-16.

SOMMER, H.H.; HART, E.B. The heat coagulation of milk. **Journal of Biological Chemistry**, v.40, p. 137-151, 1919.

SOUTHERN, S.G.; DEVERALL, B.J. Histochemical and chemical evidence for ligninin accumulation during the expression of resistance to leaf rust fungi in wheat. **Physiological and molecular plant pathology**, Cambridge, v.36, p.483-494, 1990.

SRINIVASTAVA, S.L.; BISHT, S. Inhibitory effect of some phyloplane fungi on the powdery mildew disease development. **Indian Phytopathology**, Nova Delhi, v.39, n.1, p.83-86, 1986.

STADNIK, M. J., AND BUCHENAUER, H. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Cambridge, v.57, p.25-34, 2000.

STADNIK, M.J.; BETTIOL, W. Pulverização com leite estimula a microflora do filoplano e reduz a severidade do oídio do pepino. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.27, n.1, p.109, 2001.

STADNIK, M.J.; BETTIOL, W.; SAITO, M.L. Bioprospecting for plant and fungus extracts with systemic effect to control the cucumber powdery mildew. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.110, n.4, p.383-393, 2003.

STADNIK, M.J.; RIVERA, M.C. **Oídios**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2001. 484p.

SULIVAN WHITE, R.F.; WHITE JR J.F. *Phoma glomerata* as a mycoparasite of powdery mildew. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.1, p.425-427, 2000.

SZTEJNBERG, A. et al. A new fungus with dual biocontrol capabilities: reducing the numbers of phytophagous mites and powdery mildew disease damage. **Crop-Protection**, Guildford, v.23, n.11, p.1125-1129, 2004.

THOMAS, L.H.; HAIDER, W.; FINCH, J.M. Cows with chronic infections of the mammary gland with *Streptococcus uberis* mount little inflammatory response and have an intact humoral immune response. In: SARAN, A.; SOBACK, S. **Proceedings of the third DF International Mastitis Seminar**, Tel Aviv, Livro 1, p.75-76, 1995.

TIECCO, G. *Listeria monocytogenes*. **Eurocarni**, Modena, v.5, p.165-175, 2003

URQUHART, E.J.; PUNJA, Z.K. Epiphytic growth and survival of *Tilletiopsis pallescens*, a potential biological control agent of *Sphaerotheca fuliginea*, on cucumber leaves. **Canadian Journal of Botany**, Guelph, v.75, p.892-901, 1997.

VINEET, K.; GUPTA, V.P. Scanning electron microscopy on the perithecial development of *Phyllactinia corylea* on mulberry-II sexual stage. **Journal of Phytopathology**, Saint Paul, v.152, p.169-173, 2004.

VOZENILKOVA, B.; ZVARA, J.; SKOREPA, J. The use of *Trichoderma* spp. for biological protection of greenhouse cucumbers. Ceske Budejovice Fytotechnicka Rada, v.1, p.93-105, 1992.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Dairy chemistry and physics.** New York: J. Wiley and Sons, 1984.

WALZEM R L, DILLARD C J AND GERMAN J B. Why components:millennia of evolution créate functionalities for mammalian nutrition. What we know and what we may be overlooking. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.42, p.353–375, 2002.

WEBB, B.H.; JOHNSON, A.H.; ALFORD, J.A. **Fundamentals of food chemistry.** 2.ed. Westport: Avi, 1974.

ZAVAREH; A.H.; TEHRANI, A.S.; MOHAMMADI, M. Effects of Acibenzolar-S-methyl on the specific activities of peroxidase, chitinase and phenylalanine ammonia-lyase and phenolic content of host leaves in cucumber-powdery mildew interaction. **Communication Agriculture and Applied Biological Science**, v.69, n.4, p.555-563, 2004.

ZITTER, T.A.; HOPKINS, D.L.; THOMAS, C.E. **Compendium of cucurbit diseases.** Saint Paul: APS, 1996. 87p.

ZIV, O.; ZITTER, T.A. Effects of biocarbonatés and film-forming polymers on cucurbit foliar diseases. **Plant Disease**, Saint Paul, v.76, n.5, p.513-517, 1992.

ZOTTOLA, E. A.; SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry, shouldthey be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.125–148, 1994.