



Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0605358-0

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0605358-0

(22) Data do Depósito: 20/12/2006

(43) Data da Publicação do Pedido: 05/08/2008

(51) Classificação Internacional: C12N 1/14; C12R 1/645

(54) Título: PROCESSO PARA CULTIVO DE PLASMOPARA VITICOLA, PROCESSO E KIT PARA AVALIAR A EFICÁCIA DE ANTAGÔNICOS SINTÉTICOS E/OU NATURAIS DE PLASMOPARA VITICOLA E PROCESSO DE DETECÇÃO DE ANTAGÔNICOS DE PLASMOPARA VITICOLA

(73) Titular: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL. CGC/CPF: 88648761000103. Endereço: Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130 - Cidade Universitária, Caxias do Sul, RS, BRASIL(BR), 95.020-972

(72) Inventor: JUAN CARRAU BONOMI; FRANCIELE FLORES VIT; THAIS ROVARIS

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 31/10/2017, observadas as condições legais

Expedida em: 31/10/2017

Assinado digitalmente por:
Júlio César Castelo Branco Reis Moreira
Diretor de Patente

15 de Novembro

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

de 1889

Relatório Descritivo de Patente de Invenção

PROCESSO PARA CULTIVO DE *PLASMOPARA VITICOLA*, PROCESSO E KIT PARA AVALIAR A EFICÁCIA DE ANTAGÔNICOS SINTÉTICOS E/OU NATURAIS DE *PLASMOPARA VITICOLA* E PROCESSO DE DETECÇÃO DE ANTAGÔNICOS DE *PLASMOPARA VITICOLA*

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção é relacionada ao controle biológico de pragas agrícolas. Mais especificamente, são providos processos para a multiplicação, seleção e isolamento de *Plasmopara viticola*, em qualquer época do ano, bem como de seus antagonistas naturais úteis no controle biológico de pragas. Os processos e produtos da presente invenção são úteis no controle do pseudofungo *Plasmopara viticola*, um fitopatógeno de enorme importância no cultivo agrícola de uvas, morangos, abóboras e hortaliças de diversos tipos, entre outras plantas agriculturáveis. Os processos e produtos da presente invenção contornam várias dificuldades técnicas e também evitam as grandes perdas anuais dessas safras.

Antecedentes da Invenção

[0002] O pseudo-fungo *Plasmopara viticola* é o que se chama nas Ciências Biológicas de um "biotrofo estrito", ou seja, é um ser vivo que só consegue crescer sobre células vivas. A condição de existência de células vivas é essencial ao crescimento deste patógeno. Confirmando tal fato, uma célula liquefeita morre e se desorganiza deixando de ser substrato útil ao *Plasmopara viticola*, mesmo que por alguns instantes, ao menos, tenha idêntica composição química que a célula organizada. Assim sendo, se quisermos estudá-lo na Natureza só é possível detectá-lo em abundância durante as "Primaveras chuvosas" sobre as espécies que ataca.

[0003] O pseudo-fungo *Plasmopara viticola* é um fitopatógeno de enorme importância visto que afeta uvas (*Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*),

morango (*Fragaria sp.*), abóbora (Família *Cucurbitaceae*) e hortaliças principalmente da Família *Cruciferae*, entre outras. As perdas provocadas anualmente podem ser estimadas em 10 a 20% de todas as safras acima mencionadas. Tratam-se de valores que no caso dos produtos vitivinícolas superam os 20 bilhões de dólares ao ano.

[0004] Por muitos anos se tem utilizado fungicidas químicos como CuSO_4 , Cu(OH)_2 e oxiclreto de cobre combatendo o patógeno, com resultados que são considerados ambíguos. Infelizmente o Cu^{++} , se acumula nos solos e passa de um cofator enzimático a baixas concentrações, a ser um fitotóxico acumulativo, que prejudica inclusive vinhedos e outros cultivos, seqüestrando inclusive íons do solo importantes a nutrição das plantas, ou seja, o Cu^{++} não se adapta a sistemas verdadeiramente sustentáveis. Isto, inclusive, já está especificado na Norma de Agricultura Orgânica da Comunidade Econômica Européia (2092/91), que prevê eliminação de derivados de Cu^{++} para Agricultura Orgânica Certificada. Isso conta com o respaldo da IFOAM (International Federation of Organic Agriculture Movements). Entretanto, na prática, não existe um substituto eficiente para o controle deste importante patógeno. É importante ressaltar, ainda, que a unanimidade em que os derivados de Cu^{++} , apesar dos seus problemas, são preferíveis aos organosintéticos.

[0005] A alternativa aos derivados de Cu^{++} , que vem sendo fartamente utilizada no presente momento, e que não é aceita de forma inflexível pela Norma 2092/91 de Orgânicos, é a utilização dos agrotóxicos conhecidos como organosintéticos, entre os quais se pode citar como exemplo: (i) Etilcarbamatos; (ii) Clorados; e (iii) Fosforados. Na realidade, este grupo de compostos reúne hoje entre centenas e milhares de moléculas orgânicas sintéticas com inúmeras aplicações agrícolas e industriais, nenhuma das quais é considerada aceitável em termos da Norma acima mencionada.

[0006] Para entender porque os organosintéticos foram tão bem acolhidos por técnicos e agricultores, é preciso saber que até a época em que

foram descobertos, nos anos 40, a agricultura utilizava derivados de arsênico. Quando comparados a estes, os organosintéticos parecem, em um primeiro momento, atóxicos. Prova disso é que Paul Müller ganhou o Prêmio Nobel de Medicina em 1948, por ter inventado o DDT, um organosintético conhecido e hoje proibido explicitamente em todo o mundo, pois sabemos hoje, que os organosintéticos como família de moléculas orgânicas, são em sua ampla maioria tóxicos acumulativos, carcinogênicos e não biodegradáveis e ainda não excretáveis pelos seres vivos. São, portanto, sujeitos à concentração acidental em pontos não previsíveis da Biosfera. Sabe-se, ainda, que muitos deles agem como se fossem hormônios femininos, provocando inclusive vários efeitos acumulativos lentos, até mais devastadores que os arsenicais, acima descritos (queda da espermogênese no homem e adiantamento da menarca na mulher, isto acontece por apresentarem efeitos semelhantes a hormônios).

[0007] Seguindo os tradicionais princípios de Koch, *Plasmopara viticola* tem sido isolada da mancha necrótica típica da fitopatologia de diversas variedades de *Vitis vinifera* e *Vitis labrusca* (variedades americanas) e, posteriormente, utilizada para induzir a doença em casa de vegetação umidificada artificialmente para simular as condições clássicas de infecção.

[0008] Conforme descrito no contexto desta invenção, vale também ressaltar que esta é a primeira técnica que permite cultivar *Plasmopara viticola* (patógeno) em laboratório, principalmente pela dificuldade de cultivar este pseudofungo que só cresce em uma margem estreita de umidade e temperatura e sobre tecido vivo. A presente invenção resolve de forma original este desafio, sendo essencial para identificar antagonistas (inimigos naturais) do mesmo. A técnica tem permitido caracterizar antagonistas que resolvem o desafio sem deixar resíduo algum. Para tal, a técnica em pauta é uma ferramenta imprescindível e fundamental, pois sabe-se que os antagonistas são capazes de crescer sobre o próprio fungo a ser controlado (*Plasmopara viticola*), ou será capaz de excluí-la da microbiota epifítica da planta a ser

protegida. Pela experiência acumulada em Controle Biológico, ambas alternativas têm chance de resolver o desafio.

[0009] Como acontece freqüentemente nesta especialidade, a invenção é pedra angular para conseguir isolar antagonistas, afim de poder desenvolver formulações de bom efeito residual.

[0010] A literatura patentária contempla várias patentes relacionadas ao combate ao *Plasmopara viticola*. Algumas delas são citadas aqui como referência:

[0011] A patente brasileira PI 8403258-8 apresenta uma composição fungicida sinérgica para infecções causadas por *Plasmopara viticola* contendo ingredientes ativos, que compreende carbamato de benzimidazol 2 ilmetila e os complexos de zinco e de manganês como ingredientes ativos, e opcionalmente veículo(s) sólido(s) e/ou líquido(s) e outro(s) excipiente(s).

[0012] A patente norte-americana US 4,153,730 descreve um processo de controle de *Plasmopara viticola* em plantações de uva através da utilização de 2,6-dinitroanilina (tóxico carcinogênico).

[0013] O documento WO 9403061A1 está relacionado aos ácidos carboxílicos cis-2-aminociclopentano-1 e cis-2-aminociclopentano-3, suas formas 1R e 2S e aos seus sais, ésteres e lactamas. Mais particularmente, esse documento descreve o uso desses compostos como fungicidas, agindo no combate ao *Plasmopara viticola*.

[0014] Não foram encontrados documentos relacionados ao cultivo do *Plasmopara viticola*, fazendo com que a presente invenção preencha essa lacuna nesse campo técnico.

Sumário da Invenção

[0015] O pseudofungo *Plasmopara viticola* é um biotrofo estrito, ou seja, é um ser vivo que só consegue se desenvolver associado a células vivas. A presente invenção está relacionada a um processo de cultivo vivo para a multiplicação, seleção e isolamento de *Plasmopara viticola*, em qualquer época

do ano. Dessa forma, é um dos objetos da presente invenção proporcionar um processo para cultivo do fitopatógeno *Plasmopara viticola*.

[0016] A presente invenção também permite a identificação de antagonísticos (inimigos naturais) do *Plasmopara viticola*. Sabe-se que o antagonístico obtido é capaz de crescer sobre o próprio fungo a ser controlado e/ou será capaz de excluí-lo da flora microbiana epifítica da planta a ser protegida. Sendo assim, é ainda um dos objetos da presente invenção proporcionar um processo para identificação de antagonísticos naturais ou sintéticos do *Plasmopara viticola*. É ainda um dos objetos da presente invenção proporcionar processos de obtenção de substâncias antagonísticas de *Plasmopara viticola*, constituídas por organismos inteiros, vivos ou não, e/ou substâncias ao menos parcialmente isoladas dos mesmos.

[0017] A presente invenção também permite a avaliação da qualidade e/ou da eficácia de antagonísticos naturais e/ou sintéticos de *Plasmopara viticola* já conhecidos. Partindo-se de uma cultura *in vitro* de *Plasmopara viticola* nas condições descritas na presente invenção, viabiliza-se a avaliação da qualidade e/ou da eficácia de antagonísticos naturais e/ou sintéticos através da aferição do nível de antagonismo/inibição de *Plasmopara viticola* quando contactado com os referidos antagonísticos naturais e/ou sintéticos cuja testagem é desejada. Sendo assim, é ainda um dos objetos da presente invenção proporcionar um processo e/ou um kit para avaliação *in vitro* da eficácia de antagonísticos naturais e/ou sintéticos do *Plasmopara viticola*.

[0018] O processo de detecção de antagonísticos consiste no cultivo de *Plasmopara viticola* em bloco de *Caricaceae* juntamente com um possível antagonístico ou qualquer outra substância, e após um período verifica-se sua eficiência no combate ao *Plasmopara*. Utilizando este processo, torna-se possível isolar antagonísticos úteis, desenvolvendo-se assim formulações combinando vários antagonísticos promissores e/ou substâncias controladoras. É, portanto, um dos objetos da presente invenção proporcionar o processo para elaboração de formulações compreendendo antagonísticos do *Plasmopara*

viticola. É também um dos objetos da presente invenção proporcionar composições de defensivos agrícolas compreendendo substâncias antagônicas de *Plasmopara viticola*, constituídas por organismos inteiros, vivos ou não, e/ou substâncias simples ou complexas isoladas dos mesmos.

[0019] Em um aspecto, sendo, portanto, um dos objetos da presente invenção, é descrito um processo de cultivo agrícola, que possui vantagens operacionais e de produtividade, não utilizando defensivos químicos tradicionais, não acarretando intoxicação do agricultor e não depositando substâncias tóxicas nos solos e aquíferos, como ocorre com o cobre e outros metais. Além disso, a planta que o produz sofre menos estresse químico e/ou de estabilidade gênica do que aquele decorrente do uso de defensivos químicos disponíveis atualmente.

[0020] Em ainda um outro aspecto, a manipulação, o uso e a aplicação das formulações da presente invenção é mais prática e eficiente, aumentando o desempenho dos processos de controle de pragas agrícolas conhecidos. É, portanto, ainda outro objeto da presente invenção proporcionar um processo de controle de pragas agrícolas compreendendo a aplicação, sobre culturas agrícolas, de antagonistas de *Plasmopara viticola* compreendendo organismos inteiros, vivos ou não, e/ou substâncias e/ou composições contendo antagonistas.

[0021] Em um outro aspecto, sendo, portanto, um outro objeto da presente invenção, são descritos produtos alimentícios melhorados, que possuem vantagens funcionais e sensoriais (paladar, aroma), em virtude de os produtos agrícolas que lhe são insumo não utilizarem defensivos químicos tradicionais, que permanecem residualmente no produto, de modo a evitar a intoxicação do agricultor/transportador/consumidor/produto industrializado que o contém. Alimentos preparados com tais produtos agrícolas apresentam, entre outras vantagens, o menor potencial tóxico intrínseco e também o menor potencial de interações químicas com as substâncias utilizadas no processamento industrial do alimento, uma vez que os produtos agrícolas

obtidos com o processo da invenção apresentam eliminação de residuais de defensivos químicos tradicionais.

[0022] Estes e outros objetos da presente invenção serão melhor compreendidos e valorizados a partir da descrição detalhada da invenção e das reivindicações anexas.

Breve Descrição das Figuras

[0023] A Figura 1 apresenta uma ferramenta previamente esterilizada, construída em aço-inox 306, utilizada especificamente para cortar os blocos nas proporções adequadas às placas de Petri.

[0024] A Figura 2 apresenta o bloco disposto sobre algodão estéril 54 por 54mm com espessura de 4mm, enriquecido com água estéril a efeitos de manter a umidade ambiente interna da placa muito próxima de 100%.

[0025] A Figura 3 mostra que as células do bloco são claramente discerníveis ao microscópio e podem ser colonizadas por esporângios de *Plasmopara* ou não. A célula (A) está totalmente tomada por esporângios de *Plasmopara*. Observa-se a parede da célula (B), a mesma está levemente contaminada e permite observar poucos esporângios. Os seis pontos marcados com (C) são os carotenóides típicos do BC (bloco de Caricaceae).

[0026] A Figura 4 apresenta a *Plasmopara viticola* crescendo sobre BC (Bloco de Caricaceae) – aspecto microscópico. Observar: (A) célula repleta de esporângios em liberação por ruptura da parede; (B) carotenóides típicos de BC; e (C) célula repleta de esporângios com a parede inteira.

[0027] A Figura 5 permite observar em (A) o pseudo-micélio típico de *Plasmopara*.

[0028] A Figura 6 apresenta o antagonico PA 4 (*Penicillium sp*) matando a *Plasmopara* sobre bloco previamente inoculado com o patógeno.

[0029] A Figura 7 apresenta o antagonico PA 10 (*Aspergillus sp*) matando a *Plasmopara* sobre o bloco previamente inoculado com o patógeno.

[0030] A Figura 8 apresenta o antagonico PA 35 (*Penicillium sp*) também matando a *Plasmopara* sobre o bloco.

[0031] A Figura 9 apresenta um ensaio no qual se utiliza uma formulação que utiliza os antagonicos PA 4 (*Penicillium sp*), PA 10 (*Aspergillus sp*) e PA 35 (*Penicillium sp*).

[0032] A Figura 10 apresenta o pontencial antagonico PA 28, que rendeu teste de antagonismo negativo em relação a *Plasmopara viticola*.

Descrição Detalhada da Invenção

[0033] Conforme descrito em mais detalhes a seguir, esta é a primeira técnica que permite cultivar *Plasmopara viticola* (patógeno) em laboratório, uma vez que até então o cultivo deste pseudofungo só era possível na natureza. A presente invenção resolve de forma original este desafio proporcionando, neste conceito inventivo, seus vários objetos. O conjunto dos objetos da invenção proporciona, entre outros, a detecção e obtenção de antagonicos úteis no controle biológico de *Plasmopara viticola*. Para fins da presente invenção, a expressão "antagonicos" compreende as substâncias, células e/ou combinações dos mesmos que eliminam, modulam e/ou reduzem a *Plasmopara viticola* em cultivos agrícolas.

Exemplo 1 – Processo de cultivo *in vitro* de *Plasmopara viticola*

[0034] O processo de cultivo *in vitro* de *Plasmopara viticola* consiste na organização em um suporte, como uma placa de Petri, de um bloco de tecido vivo que pode ser retirado em condições de esterilidade laboratorial dos seguintes tecidos: melão, abóbora, melancia e pepino (Família Cucurbitaceae), mamão (Família Caricaceae), manga (Família Anacardiaceae) e feijão (Família Fabaceae). Os inventores testaram espécies de todas as famílias vegetais acima mencionadas. O processo preferencial e utilizado com mais frequência inclui Caricaceae (mamão), em função do fato deste material vegetal possuir tecidos muito ricos em papaína (complexo enzimático proteolítico),

apresentando-se menos sujeito a contaminações. O tecido vivo é cortado com ferramentas estéreis desenvolvidas para tal propósito. Todas as operações se realizam em capela de fluxo laminar vertical com idêntico objetivo. O bloco é disposto sobre algodão estéril 54 por 54mm com espessura de 4mm, enriquecido com água estéril a efeitos de manter a umidade ambiente interna da placa o mais próximo possível de 100%. A umidade é essencial ao bom crescimento de *Plasmopara*, permitindo e facilitando inclusive a sobrevivência por períodos prolongados das células vivas que constituem o bloco e, portanto, sustentam o crescimento da *Plasmopara* – aspecto macroscópico. Nas condições descritas, o bloco, quando mantido a 24°C, é capaz de permanecer vivo e consegue sustentar o crescimento do patógeno *Plasmopara viticola* por mais de duas semanas. Como pode ser observado na figura 3, as células do bloco são claramente discerníveis ao microscópio e podem ser colonizadas por esporângios de *Plasmopara* ou não.

Exemplo 2 – Processo de detecção de antagonicos

[0035] O processo de detecção de antagonicos consiste no cultivo de *Plasmopara* tal como descrito no exemplo 1, seguido de ensaio dos possíveis antagonicos isolados dos substratos considerados promissores sobre o bloco já com o patógeno em crescimento. Esta informação pode ser complementada analisando inclusive o tempo necessário para que um dado antagonico em análise seja capaz de eliminar ao patógeno em avaliação. Este tempo é calculado analisando o número de horas que se passam até ser impossível reisolar o patógeno *Plasmopara viticola* do bloco de ensaio. A Figuras 6, 7 e 8, demonstram exemplos dos antagonicos *Penicillium sp*, *Aspergillus sp*, antagonizando *Plasmopara viticola* sobre bloco previamente inoculado com o patógeno.

Exemplo 3 – Formulações contendo antagonicos

[0036] Utilizando-se o procedimento descrito nos exemplos 1 e/ou 2, foram isolados diversos antagonistas muito promissores quanto ao potencial de antagonizar *Plasmopara*. Os antagonistas de maior atividade foram codificados como PA's 3, 4, 6, 10, 11, 12, 13, 24 25, 33 e 35. A realização deste processo permitiu testar diversas formulações, através de diferentes combinações de ingredientes de formulação e/ou combinações de antagonistas. Desta forma, foram desenvolvidos antagonistas de elevadíssima atividade para o controle biológico, sendo eles identificados por PA's 4, 10 e 35, que têm se mostrado os mais eficientes no combate ao *Plasmopara*.

Exemplo 4 – Processo para a preparação de defensivo agrícola utilizando esporos de fungos

[0037] Para o desenvolvimento das culturas, esporos dos antagonistas preferenciais 4, 10 e 35 foram inoculados em meios líquidos suplementados com 1% de fonte de carbono e crescidos a 24°C em condições estacionárias, por aproximadamente cinco dias. Em seguida, as culturas foram filtradas. As fontes de carbono que apresentaram melhor resultado foram as fontes lignocelulósicas (sabugo de milho, bagaço de cana e germe de trigo).

[0038] Os versados na arte imediatamente valorizarão os conhecimentos aqui descritos e identificarão as inúmeras vantagens técnicas econômicas, ambientais, e de saúde da tecnologia aqui descrita. Os produtos alimentícios obtidos a partir do processamento industrial dos produtos agrícolas obtidos com uso dos objetos da presente invenção.

[0039] Os produtos alimentícios melhorados da presente invenção possuem vantagens funcionais e sensoriais (paladar, aroma), em virtude de os produtos agrícolas que lhe são insumo não utilizarem defensivos químicos tradicionais, que permanecem residualmente no produto, de modo a evitar a intoxicação do agricultor/transportador/consumidor/produto industrializado que os contêm. Alimentos preparados com tais produtos agrícolas apresentam entre outras vantagens, o menor potencial tóxico intrínseco e também o menor

potencial de interações químicas com as substâncias utilizadas no processamento industrial do alimento, uma vez que os produtos agrícolas obtidos com o processo da invenção apresentam acentuada redução de residuais de defensivos químicos tradicionais. Os produtos alimentícios melhorados da presente invenção também possuem vantagens quanto à sua melhor processabilidade industrial. Isso ocorre especialmente nos casos em que o referido processamento industrial envolve etapas de fermentação, uma vez que o microrganismo utilizado não sofrerá perdas de desempenho no processo fermentativo devido à ausência de toxicidade residual de defensivos agrícolas, fato que ocorre com o uso das tecnologias atualmente disponíveis para o controle de *Plasmopara viticola*.

[0040] Pequenas variações na forma de conduzir a invenção aqui descrita devem ser compreendidas como dentro do espírito da invenção e do escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

1. Processo para cultivo de *Plasmopara viticola*, **caracterizado** pelo fato de compreender sua incubação *in vitro* sobre um substrato que compreende tecido vegetal vivo selecionado do grupo que compreende as famílias Cucurbitaceae, Caricaceae, Anacardiaceae e Fabaceae, em que o referido substrato é submetido a pelo menos um tratamento para prevenir contaminações e/ou desidratações e em que o referido substrato é mantido em temperatura na faixa entre 10°C e 65°C.

2. Processo para avaliar a eficácia de antagonísticos sintéticos e/ou naturais de *Plasmopara viticola*, **caracterizado por** compreender as etapas de:

- incubação *in vitro* de *Plasmopara viticola* sobre um substrato que compreende tecido vegetal vivo selecionado do grupo que compreende as famílias Cucurbitaceae, Caricaceae, Anacardiaceae e Fabaceae, em que o referido substrato é submetido a pelo menos um tratamento para prevenir contaminações e/ou desidratações e em que o referido substrato é mantido em temperatura na faixa entre 10°C e 65°C;

- contactação da cultura de *Plasmopara viticola* obtida na etapa anterior com o antagonístico sintético e/ou natural cuja eficácia se pretende avaliar; e

- verificação/medição da inibição do crescimento e/ou atividade de *Plasmopara viticola* sobre o referido substrato.

3. Kit para avaliar a eficácia de antagonísticos sintéticos e/ou naturais de *Plasmopara viticola*, **caracterizado por** compreender:

- meios para a incubação *in vitro* de *Plasmopara viticola* sobre um substrato que compreende tecido vegetal vivo selecionado do grupo que compreende as famílias Cucurbitaceae, Caricaceae, Anacardiaceae e Fabaceae, em que o referido substrato é submetido a pelo menos um tratamento para prevenir contaminações e/ou desidratações e em que o referido substrato é mantido em temperatura na faixa entre 10°C e 65°C;

- meios para a contactação da cultura de *Plasmopara viticola* da etapa anterior com o antagonico sintético e/ou natural cuja eficácia se pretende avaliar; e

- meios para verificar/medir a inibição do crescimento e/ou atividade de *Plasmopara viticola* sobre o referido substrato.

4. Processo de detecção de antagonicos de *Plasmopara viticola*, **caracterizado por** compreender as etapas de:

- incubação *in vitro* de *Plasmopara viticola* sobre um substrato que compreende tecido vegetal vivo selecionado do grupo que compreende as famílias Cucurbitaceae, Caricaceae, Anacardiaceae e Fabaceae, em que o referido substrato é submetido a pelo menos um tratamento para prevenir contaminações e/ou desidratações e em que o referido substrato é mantido em temperatura na faixa entre 10°C e 65°C;

- co-incubação de pelo menos um outro microrganismo no referido substrato; e

- verificação da presença de inibição do crescimento e/ou atividade de *Plasmopara viticola* sobre o referido substrato.

5. Processo, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pelo fato de que** o referido outro organismo co-incubado é selecionado do grupo que compreende *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, e/ou combinações das mesmas.

Figuras

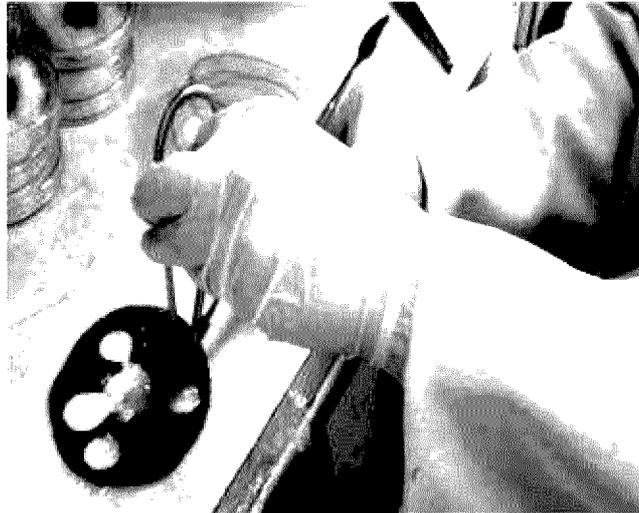


Figura 1



Figura 2

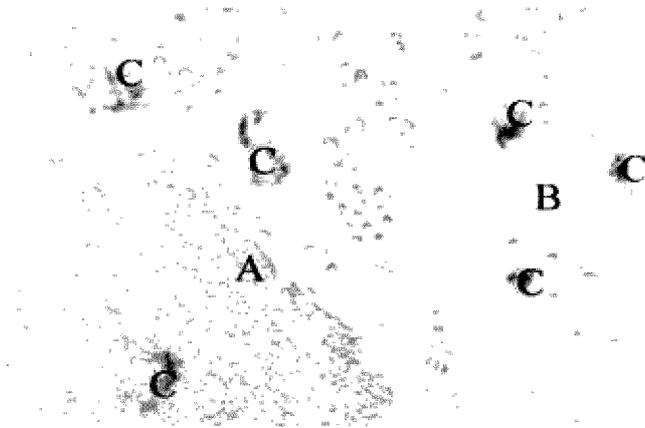


Figura 3

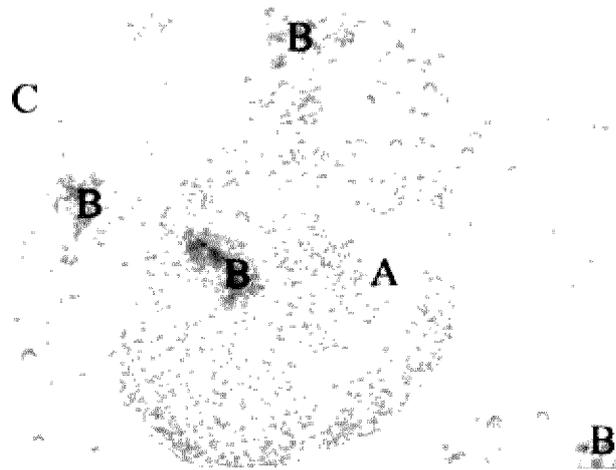


Figura 4

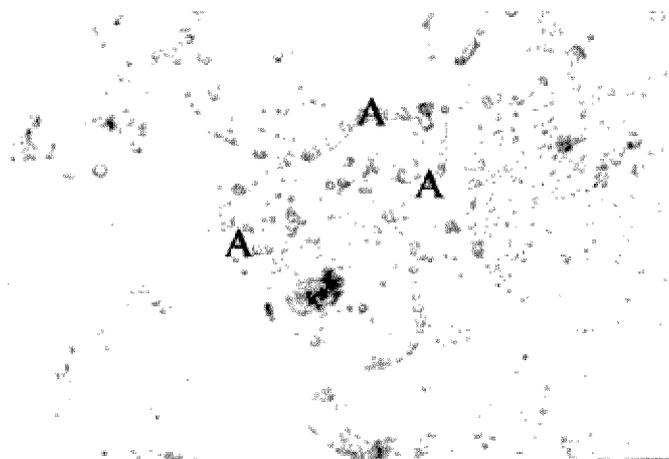


Figura 5



Figura 6

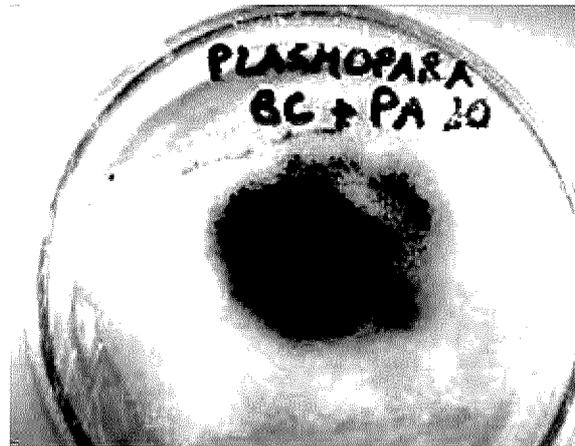


Figura 7

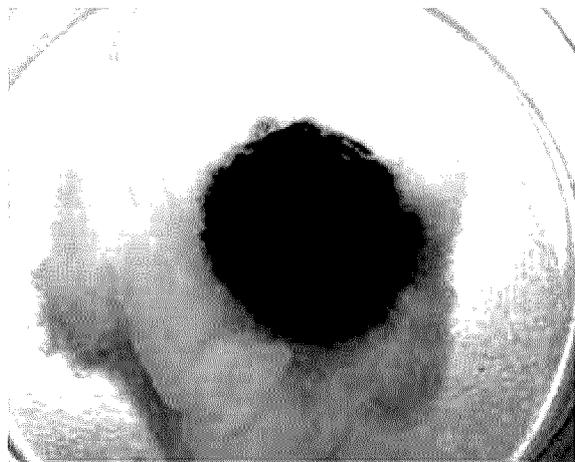


Figura 8

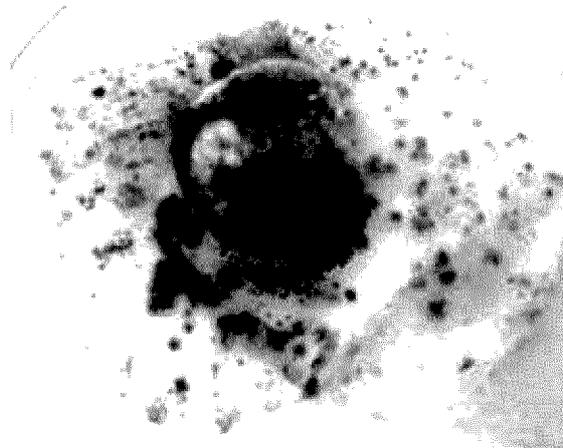


Figura 9

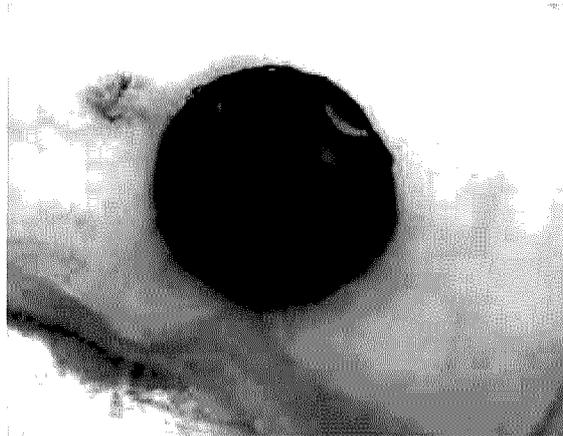


Figura 10