

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**“CONTROLE DE MOFO-CINZENTO (*Amphobotrys ricini*) DA
MAMONEIRA (*Ricinus communis* L.) POR MÉTODOS QUÍMICO,
BIOLÓGICO E COM ÓLEOS ESSENCIAIS.”**

HAROLDO ANTUNES CHAGAS

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da Unesp - Câmpus
de Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia (Agricultura).

BOTUCATU - SP

Fevereiro – 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**“CONTROLE DE MOFO-CINZENTO (*Amphobotrys ricini*) DA
MAMONEIRA (*Ricinus communis* L.) POR MÉTODOS QUÍMICO,
BIOLÓGICO E COM ÓLEOS ESSENCIAIS.”**

HAROLDO ANTUNES CHAGAS

Orientador: Prof. Dr. Maurício Dutra Zanotto

Co-orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Furtado

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da Unesp - Câmpus
de Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia (Agricultura).

BOTUCATU - SP

Fevereiro – 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Chagas, Haroldo Antunes, 1976-
C434c Controle de mofo-cinzeno (*Amphobotys ricini*) da mamoneira (*Ricinus communis* L.) por métodos químico, biológico e com óleos essenciais / Haroldo Antunes Chagas.- Botucatu : [s.n.], 2009.
ix, 67 f. : il., color., gráfs., tabs.

Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2009
Orientador: Maurício Dutra Zanotto
Co-orientador: Edson Luis Furtado
Inclui bibliografia

1. Mamona - Doenças . 2. Fungicidas. 3. Óleos essenciais. 4. Antagonistas. I. Zanotto, Maurício Dutra. II. Furtado, Edson Luis. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu) Faculdade de Ciências Agronômicas. III. Título

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: CONTROLE DE MOFO-CINZENTO (*Amphobotrys ricini*) DA MAMONEIRA
(*Ricinus communis*) POR MÉTODOS QUÍMICO, BIOLÓGICO E COM
ÓLEOS ESSENCIAIS”

ALUNO: HAROLDO ANTUNES CHAGAS

ORIENTADOR: PROF. DR. MAURÍCIO DUTRA ZANOTTO
CO-ORIENTADOR: EDSON LUIZ FURTADO

Aprovado pela Comissão Examinadora



PROF. DR. MAURÍCIO DUTRA ZANOTTO



PROF. DR. FRANCISCO LUIZ ARAÚJO CÂMARA



DR. CEZAR JUNIOR BUENO

Data da Realização: 05 de fevereiro de 2009.

Ao meu pai

Veridiano Antunes Chagas, por sempre ter me ensinado que na vida, temos sempre que acreditar em nossos sonhos;

À minha mãe

Elvira Aparecida Chagas, por seu amor e carinho; sem eles nada disso seria possível;

Ao meu querido irmão

Rafael Antunes Chagas, meu melhor amigo, faltam palavras para expressar o quanto você é importante na minha vida;

Obrigado, por vocês existirem e estarem sempre ao meu lado, nos bons e maus momentos.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pela chance de poder realizar meus sonhos;

À Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, pelo aprendizado;

Aos Professores Mauricio Dutra Zanotto e Edson Luiz Furtado, por sua amizade, paciência, ensinamentos e por sua orientação durante o período de mestrado;

Ao meu irmão Rafael Antunes Chagas, pela elaboração do desenho que serviu de modelo para a criação da escala diagramática;

Aos meus grandes amigos Daniel Dias Rosa e Marco Antonio Basseto, pela grande ajuda na realização dos experimentos e orientação no trabalho dos dados;

Aos amigos Ferdinando, Leonildo, Fabiany, Renata Mie, Carlos Demant, Alexandre, Tatiana, Monica, Lívia, Kelly, Martha, Julio, Evandro, Juliana, Julio Cesar, Talita, Renata Ruiz, Tadeu, Djanira, Cris, Helenize, Ilka, Fernanda, Ana Carolina, Lucas, Juan pela amizade, convivência, pela força e estímulo que me deram durante esta fase da minha vida;

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação pela paciência e auxílio;

Ao senhor Milton Pereira Marques, pela ajuda na instalação do experimento no campo, amizade, e convivência;

Aos professores e funcionários do Departamento Produção Vegetal (Agricultura e Melhoramento Vegetal) e Defesa Fitossanitária) por todos esses anos de ensinamentos e colaboração;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos;

*Ao pesquisador Wagner Bettioli e Marcelo A. Boechat Morandi da Embrapa Meio Ambiente por cederem o isolado de *C. rosea*;*

*Ao pesquisador Nelson Dias Suassuna da Embrapa Algodão por ceder o isolado de *A. ricini*;*

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
1 RESUMO	1
2 SUMMARY	3
3 INTRODUÇÃO.....	5
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
4.1 Mamoneira (<i>Ricinus communis</i> L.)	8
4.2 Mofo-cinzento (<i>Amphobotrys ricini</i>).....	10
4.3 Controle biológico	11
4.3.1 <i>Clonostachys rosea</i>	12
4.3.2 <i>Trichoderma</i> spp.....	13
4.4 Óleos essenciais.....	14
4.4.1 <i>Cymbopogon martini</i> Staph.....	15
4.4.2 <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn	16
4.5 Fungicidas.....	16
4.5.1 Dicarboximidas.....	17
5 MATERIAL E MÉTODOS	18
5.1 Obtenção e manutenção de isolados.....	18
5.2 Avaliação de diferentes meios de cultura na esporulação de <i>Clonostachys rosea</i>	18
5.3 Avaliação de diferentes meios de cultura na esporulação de <i>Amphobotrys ricini</i>	19
5.4 Avaliação <i>in vitro</i> do crescimento micelial do isolado de <i>Amphobotrys ricini</i> , utilizando diferentes concentrações de óleos essenciais e fungicidas.....	21
5.5 Avaliação <i>in vitro</i> da germinação de esporos do isolado de <i>Amphobotrys ricini</i> , utilizando diferentes concentrações de óleos essenciais e fungicidas.....	23
5.6 Aplicação de <i>Clonostachys rosea</i> em frutos destacados de mamoneira	24
5.7 Controle de <i>Amphobotrys ricini</i> em mudas de mamoneira, em ambiente protegido, por meio de aplicação de fungicidas, agente de C. biológico e com óleos essenciais.....	25
5.8 Elaboração de escala diagramática para avaliação de mofo-cinzento.....	26
5.8.1 Validação da escala diagramática.....	26

5.9 Avaliação da severidade de <i>Amphobotrys ricini</i> a campo	27
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
6.1 Avaliação de diferentes meios de cultura na esporulação de <i>Clonostachys rosea</i>	29
6.2 Avaliação de diferentes meios de cultura na esporulação de <i>Amphobotrys ricini</i>	30
6.3 Avaliação <i>in vitro</i> do crescimento micelial do isolado de <i>Amphobotrys ricini</i> , utilizando diferentes concentrações de óleos essenciais e fungicidas	33
6.4 Avaliação <i>in vitro</i> da germinação de esporos do isolado de <i>Amphobotrys ricini</i> , utilizando diferentes concentrações de óleos essenciais e fungicidas.....	39
6.5 Aplicação de <i>Clonostachys rosea</i> em frutos destacados de mamoneira	43
6.6 Controle de <i>Amphobotrys ricini</i> em mudas de mamoneira, em ambiente protegido, por meio de aplicação de fungicidas, agente de C. biológico e com óleos essenciais.....	45
6.7 Elaboração de escala diagramática para avaliação de mofo-cinzento.....	46
6.8 Avaliação da severidade de <i>Amphobotrys ricini</i> a campo.....	51
7 CONCLUSÕES.....	55
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
9 APÊNDICE	65

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Fungicidas testados quanto à eficiência <i>in vitro</i> no controle de <i>Amphobotrys ricini</i> . Botucatu-SP, 2009.	21
2. Desenvolvimento de <i>Amphobotrys ricini</i> sob ação de diferentes óleos essenciais Botucatu-SP, 2009	35
3. Porcentagem de inibição de crescimento micelial (PICs) de <i>Amphobotrys ricini</i> em diferentes concentrações de fungicidas. Botucatu-SP, 2009.....	36
4. Dose efetiva mediana (ED ₅₀) de vários fungicidas relativos à inibição do crescimento micelial do isolado <i>Amphobotrys ricini</i> (L3), procedente da EMBRAPA ALGODÃO (CNPQ). Botucatu-SP, 2009.	36
5. Porcentagem de conídios germinados de <i>Amphobotrys ricini</i> em diferentes concentrações de fungicidas. Botucatu-SP, 2009.	39
6. Porcentagem de conídios germinados de <i>Amphobotrys ricini</i> em diferentes concentrações de óleos essenciais. Botucatu-SP, 2009.	41
7. Severidade da doença, causada por <i>Amphobotrys ricini</i> , em frutos de mamona com e sem ferimentos, submetidos a aplicação preventiva e curativa do antagonista <i>Clonostachys rosea</i> e os respectivos tratamentos controle. Botucatu-SP, 2009.	44
8. Incidência da doença em folhas de dois genótipos de mamoneira, causada por <i>Amphobotrys ricini</i> , em relação a tratamentos com fungicidas, agentes de C. biológico e óleos essenciais. Botucatu-SP, 2009.....	45
9. Estimativas de intercepto(<i>a</i>), do coeficiente angular da reta (<i>b</i>) e do coeficiente de determinação (<i>R</i> ²) de equações de regressão linear simples relacionando estimativas visuais de danos de racemos de mamoneira provocados por <i>Amphobotrys ricini</i> efetuadas por avaliadores, com e sem auxílio de escala diagramática. Botucatu-SP, 2009.	47
10. Avaliação da severidade de mofo-cinza em racemos de mamoneira durante 3 semanas em função da aplicação de diferentes tratamentos. Botucatu-SP, 2009.	51
11. Composição química dos óleos essenciais utilizados no experimento. Botucatu-SP, 2009.	65

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Esporulação média de <i>Clonostachys rosea</i> em diferentes meios de culturas, após 8 dias de incubação em câmara de crescimento, a 25° C, no escuro.	30
2. Esporulação média de <i>Amphobotrys ricini</i> em diferentes meios de culturas, após 8 dias de incubação em câmara de crescimento, a 26° C, no escuro. Produção de escleródio: ausente(-), mediantemente (+), abundante (++) . Barra de variação indicando o desvio padrão das leituras.	32
3. Da esquerda para a direita, meio de cultura BDA; meio de cultura aveia-ágar; meio de cultura arroz-ágar, formação de escleródios ocorrendo nos meios arroz-ágar e aveia-ágar, sendo mais intensamente produzido no meio a base de aveia.	32
4. Comportamento do crescimento micelial de <i>Amphobotrys ricini</i> sob diferentes concentrações de óleos essenciais.	35
5. Crescimento micelial de <i>Amphobotrys ricini</i> em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) contendo fungicidas com diferentes concentrações. carbendazin (A), tiofanato metílico (B), iprodione (C), tebuconazole (D), azoxystrobina (E), procimidone (F), carboxin-thiran (G), clorotalonil (H), mancozebe (I) e testemunha (J).	38
6. Comportamento da germinação de conídios de <i>Amphobotrys ricini</i> em diferentes concentrações de fungicidas.	40
7. Comportamento da germinação de conídios de <i>Amphobotrys ricini</i> em diferentes concentrações de óleos essenciais.	42
8. Severidade de <i>Amphobotrys ricini</i> em frutos destacados de mamoneira com e sem ferimentos, tratados com aplicação preventiva e curativa do antagonista <i>Clonostachys rosea</i>	44
9. Sintomas de necrose causado por <i>Amphobotrys ricini</i> em folhas de mamoneira.	46
10. Escala diagramática para avaliação dos danos provocados por <i>Amphobotrys ricini</i> em racemos de mamoneira indicando os níveis de 0, 8, 22, 43, 76 e 100% de danos.	49

11. Severidade estimada com o auxílio da escala digramática elaborada (pontos) e linhas de regressão obtidas entre a severidade real e estimada (linha cheia) para mofo-cinzento em racemos de mamoneira (*Ricinus communis* L.) A-B avaliador 1 sem e com escala; C-D avaliador 2 sem e com escala; E-F avaliador 3 com e sem escala; G-H avaliador 4 sem e com escala. 50
12. Sintomas de mofo-cinzento em racemos de mamoneira. A-primeira semana de avaliação; B-segunda semana; C-terceira semana. 52

1 RESUMO

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é uma espécie oleaginosa tropical, sendo o óleo extraído de suas sementes um dos mais versáteis da natureza e com inúmeras aplicações industriais. Embora ainda seja uma espécie rústica, ela está sujeita a diversas doenças, dentre elas o mofo-cinzento, causada pelo fungo *Amphobotrys ricini*. O melhoramento genético seria a melhor alternativa para o controle da doença, mas demanda tempo para se obter cultivares resistentes. Dessa Maneira, o uso de métodos de controle baseado em métodos químicos, alternativos ou biológicos mostra-se viável em curto prazo.

O objetivo do trabalho foi estudar a eficiência de controle do mofo-cinzento, na cultura da mamoneira, utilizando-se de métodos químico, alternativo e biológico. Para tanto, foram verificados, *in vitro*, a eficiência de diferentes meios de cultura na esporulação do patógeno e do antagonista *C. rosea*. Verificou-se, também, a produção de escleródios do patógeno nos meios. Quanto à eficiência dos métodos, verificou-se, *in vitro*, a eficiência deles na inibição do crescimento micelial e da germinação dos conídios do patógeno. Após desenvolver e validar uma escala diagramática de avaliação de severidade da doença em racemos de mamoneira, verificou-se a eficiência de aplicação do antagonista *C. rosea* em frutos destacados da mamona inoculados com o patógeno. Em plantas submetidas a condições de estufa e em campo, verificou-se a eficiência dos métodos no controle da doença causada por *A. ricini*

Quanto à esporulação, o melhor meio de cultura para o patógeno foi V8-20%, obtendo $5,7 \times 10^6$ conídios/mL. Para o antagonista *C. rosea*, o melhor meio foi o TJ-5% (Suco de Tomate), produzindo $4,41 \times 10^6$ conídios/mL. O único meio que propiciou abundante produção de escleródios de *A. ricini* foi o aveia-ágar.

Quanto a inibição do crescimento micelial do patógeno, os melhores tratamentos com os óleos essenciais foram os com a base de *C. martini* e *C. zeylanicum* nas cinco concentrações testadas. Em ambos os óleos, o diâmetro médio das colônias ficou em 0,7 cm contra a média de 4,79 cm da testemunha. Com os fungicidas, nas quatro concentrações testadas, os mais eficientes foram os ingredientes ativos tiofanato metílico, carbendazim, tebuconazole e iprodione. O ED₅₀ destes fungicidas ficou < 1uL/L, atestando 100% de inibição do crescimento micelial em todas as concentrações. Quanto à inibição da germinação

dos conídios de *A. ricini*, os fungicidas tebuconazole e clorotalonil foram os melhores em todas as concentrações testadas, sendo a média dos conídios germinados destes fungicidas de 0,0 e 0,15%, respectivamente, contra 100% da testemunha. Já os melhores óleos essenciais foram os a base de *C. martini* e *C. zeylanicum* em todas as concentrações testadas, sendo a média dos conídios germinados de ambos os óleos de 0,00% contra 100% da testemunha. A escala diagramática desenvolvida foi validada, pois as estimativas visuais de severidade (R^2) entre os avaliadores com auxílio da escala foram de 92 a 97%, com média de 94%, contra a média de 80% sem o uso da escala.

A melhor aplicação do antagonista *C. rosea* em frutos destacados de mamona, da cultivar AL-Guarany e do híbrido Lyra, independentemente de haver ou não ferimentos, foi de maneira preventiva.

Tanto nas aplicações em estufa quanto no campo, o tratamento com o fungicida iprodione foi o melhor quanto ao controle da doença quando comparados com os tratamentos biológico e alternativo. Em estufa, a porcentagem média de folhas doentes no tratamento com iprodione foi de 0,0% contra 50,47% na testemunha inoculada. Em condições de campo, a severidade média da doença com o tratamento com iprodione foi de 15,76% contra 95,81% na testemunha inoculada.

Palavras-chave: mamona, controle, antagonistas, doença, extratos vegetais e fungicidas.

CONTROL OF GRAY MOLD (*Amphobotrys ricini*) ON CASTOR BEAN (*Ricinus communis* L.) BY CHEMICAL, BIOLOGICAL AND ESSENTIAL OILS METHODS. Botucatu, 2009, 67 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: Haroldo Antunes Chagas

Adviser: Mauricio Dutra Zanotto

Co-adviser: Edson Luiz Furtado

SUMMARY

The castor bean (*Ricinus communis* L.) is a tropical oily species, and the oil extracted of its seeds is one of most versatile of the nature, with many industrial applications. Even being a rustic species, it still subjects to several diseases, between them the gray mold, caused by the fungus *Amphobotrys ricini*. The genetic breeding would be the best alternative for the disease control, but spend time to get a resistant cultivar. In this way, the use of methods of control based on chemical, alternative or biological methods shows viable in short time.

The aim of this work was to study the efficiency of the control of gray mold, on castor bean crop, using chemical, alternative and biological methods. Therefore, they had been verified, in vitro, the efficiency of different culture medium in the pathogen sporulation and the antagonist *C. rosea*. The sclerotia production in the culture medium can be also verified. About the efficiency of the methods, in vitro, the inhibition of the mycelial growth and germination of conidia was verified. After to develop and to validate a diagrammatic scale of evaluation of severity of the disease in racemes of castor bean, the efficiency of application of the antagonist *C. rosea* in inoculated fruits detached of castor bean with the pathogen was verified. In plants submitted to greenhouse and field conditions, the efficiency of the methods in the control of the disease caused by *A. ricini* was verified

About the sporulation, the optimum culture medium for the pathogen was V8-20%, getting $5,7 \times 10^6$ conidia/mL. For the antagonist *C. rosea*, the optimum culture

medium was TJ-5% (Tomato juice), producing 4.41×10^6 conidia/mL. The only one culture medium that propitiated abundant sclerotia production of *A. ricini* was oats-agar.

About the inhibition of the mycelial growth of the pathogen, the best treatments with essential oils were that based on *C. martini* e *C. zeylanicum* in the five tested concentrations. In both oils, the average diameter of the colonies was 0,7 cm against the average of 4,79 cm of check treatment. With the fungicides, in the four tested concentrations, most efficient active ingredients were methylic tiofanato , carbendazim, tebuconazole and iprodione. The ED₅₀ of these fungicides were < 1uL/L, certifying 100% of inhibition of the mycelial growth in all concentrations. About the inhibition of the conidia germination of *A. ricini*, the fungicides tebuconazole and clorotalonil were best in all the tested concentrations, being the average of the conidia germinated of these fungicides were 0,0 and 0,15%, respectively, against 100% of the check treatment. Already the best essential oils were that based on *C. martini* e *C. zeylanicum* in all the tested concentrations, being the average of the conidia germinated of both oils of 0,00% against 100% of the check treatment. The developed diagrammatic scale was validated, therefore the visual estimates of severity (R²) between the appraisers with aid of the scale were of 92 to 97%, with average of 94%, against the average of 80% without the use of the scale.

The best application of the antagonist *C. rosea* in fruits detached of castor bean, of AL-Guarany cultivar and the hybrid Lyra, independently having or not wounds, was in preventive way.

As much in the greenhouse applications as at field, the treatment with the fungicide iprodione was optimum on the disease control when compared with biological and alternative treatments. In greenhouse, the average percentage of the sick leaves in the treatment with iprodione was of 0,0% against 50,47% of the inoculated check treatment. In field conditions, the average severity of the disease in the treatment with iprodione was 15,76% against 95,81% of the inoculated check treatment.

Keywords: castor bean, control, antagonists, disease, vegetal extracts and fungicides.

3 INTRODUÇÃO

A mamoneira (*Ricinus communis* L.), também conhecida como carrapateira ou rícino, é uma espécie de origem tropical que vegeta naturalmente desde a longitude 40^o Norte até 40^o Sul. O óleo extraído de suas sementes é um dos mais versáteis da natureza, com inúmeras aplicações industriais (CHIERICE e CLARO NETO, 2001).

Embora seja uma planta com grande capacidade de adaptação às mais diferentes regiões do mundo, a mamoneira está sujeita a doenças causadas por diversos microorganismos, os quais causam grandes prejuízos econômicos, principalmente quando as condições climáticas lhes são favoráveis (FORNAZIERI JÚNIOR, 1986; SAVY FILHO, 1999).

Entre essas doenças, pode-se destacar o mofo cinzento, causado pelo fungo *Amphobotrys ricini* (Buchw.) Hennebert, como uma das mais importantes, pois causa grandes prejuízos à produção, destruindo inflorescências e racemos, e assim reduzindo a produção de óleo pela diminuição dos frutos colhidos (LIMA et al., 2001).

O melhoramento genético vegetal é um mecanismo que visa a obtenção de materiais que apresentem características agronômicas superiores as de seus genitores, sendo que dentro dessas características destacam-se aumento de produtividade, precocidade de desenvolvimento e resistência ao ataque de doenças, entre outras, sendo tudo isso possível através da seleção de genótipos superiores. Entretanto, apesar do melhoramento

mostrar-se como alternativa ideal, no controle do mofo cinzento, o mesmo esbarra em fatores primordiais para a cultura, como fonte de resistência para a doença e também em tempo hábil para os cruzamentos e testes de progênes. Dessa maneira torna-se interessante um direcionamento das pesquisas para o controle alternativo e químico dessa doença.

Segundo Cook e Baker, citados por Schwan-Estrada, Stangarlin e Cruz (2000), o controle biológico pode ser definido como o controle de um microrganismo através da ação direta de um outro microrganismo antagônico, o qual pode atuar por meio de antibiose, parasitismo, competição, predação ou hipovirulência.

Dentre os agentes de controle biológico, o fungo filamentosso *Clonostachys rosea* surgiu como um eficaz e versátil antagonista em estudos no final da década de 80, para controlar *Botrytis cinerea* (SUTTON et al., 1997; SURGEONER, 1998; (PENG; SUTTON; KEVAN, 1992). O antagonista *Clonostachys* tem gerado grande interesse entre produtores e pesquisadores nos diversos países onde ele ocorre, entre eles o Brasil (SURGEONER, 1998). Testes comerciais na América do Sul e pesquisa no Canadá e nos EUA sugerem que *C. rosea* é uma alternativa viável ao uso de fungicidas para o controle de *Botrytis* sp. (SURGEONER, 1998).

O controle químico tem sido empregado na agricultura ha cerca de 200 anos para proteger as plantas de doenças provocadas por ataques de fungos. Do início pequeno e primitivo, voltado principalmente para proteção de sementes de cereais e videiras, o número de culturas e das doenças tratadas, a variedade de compostos químicos disponíveis, a área e frequência de seu uso e a eficiência dos tratamentos aumentaram extraordinariamente, principalmente depois da segunda guerra mundial. Foi só na última década que a quantidade e a variedade de tratamentos com fungicidas, no mundo inteiro, atingiu algum grau de estabilidade e maturidade (BRENT, 1995).

Outro método de controle bastante interessante seria o uso de compostos secundários presentes no extrato bruto ou em óleo essencial de plantas medicinais, podendo constituir em mais uma potencial forma de controle alternativo de doenças em plantas (SCHWAN-ESTRADA, STANGARLIN E CRUZ, 2000).

Dessa maneira, esses tipos de controle apresentam-se como uma alternativa, principalmente no que diz respeito a cultura da mamoneira, que desempenha papel importante como fonte de renda para a agricultura familiar,destacadamente na região nordeste.

O objetivo do trabalho foi estudar métodos de controle ao fungo *A. ricini*, no cultivo da mamoneira. Para isso, várias fases e ensaios foram necessários, os quais seguem descritos abaixo:

- Avaliação da patogenicidade de *Amphobotrys ricini* em plantas de mamoneira e, também teste de produção e esporulação do patógeno em diferentes meios de cultura e, também da produção de seus escleródios nestes meios;
- Produção do fungo de controle biológico *Clonostachys rosea*.
- Efeito de óleos essenciais, fungicidas e dos agentes de controle biológico sobre *Amphobotrys ricini in vitro*.
- Efeito de óleos essenciais, fungicidas e agentes de C. biológico sobre o mofo-cinzento, em condições de campo e estufa.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Mamoneira (*Ricinus communis* L.)

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) pertence à família Euphorbiaceae e gênero monotípico, ou seja, é a única espécie do gênero *Ricinus*. É uma espécie preferencialmente autógama, mas pode apresentar alta taxa de cruzamentos, podendo chegar a 40% (BELTRÃO et al., 2001).

Segundo Nóbrega et al. (2001), a mamoneira apresenta variabilidade para diversas características como: cor do caule, da semente, da folha, altura de plantas e teor de óleo na semente. A produtividade de grãos é classificada como baixa quando atinge menos de 1.500 kg/ha, com produtividade média de 1.500 a 2.000 kg/ha, alta quando 2.001 a 3.000 kg/ha e muito alta quando acima de 3.000 kg/ha. Quanto à altura de plantas, a classificação varia desde anã, com altura menor de 0,90m, muito baixa quando entre 0,90 a 1,50m e baixa quando 1,51 a 2,00m, média quando 2,01 a 2,50m, alta quando 2,51 a 3,00m e muito alta, com altura de plantas acima de 3,00m. O ciclo da planta, ou seja, número de dias decorridos entre o plantio e a maturação dos últimos racemos apresenta classificação de muito precoce quando menos de 140 dias, precoce quando varia entre 141 a 180 dias, médio para 181 a 210 dias, tardio para 211 a 250 dias e muito tardio quando acima de 250 dias. Para massa de 1000 sementes, a classificação é baixa quando menos de 400g, média quando entre 400 e 500g e alta quando acima de 500g.

Outra característica importante agronomicamente é a deiscência dos frutos, classificada de acordo com o comportamento dos frutos, na época da maturação dos racemos, variando de deiscentes, quando os frutos sofrem abscisão, e as sementes são arremessadas ao solo antes mesmo da colheita e indeiscentes quando os frutos só se abrem por beneficiamento mecânico. Cultivares indeiscentes são de grande importância econômica devido à redução da utilização de mão de obra na colheita manual e possibilidade de colheita mecânica.

Dos produtos obtidos da mamona, o óleo é o mais importante produto explorado comercialmente. Embora impróprio para consumo humano, a importância do óleo de mamona é evidenciada pelo seu amplo uso industrial. A elevada viscosidade e estabilidade de tal produto são mantidas em larga faixa de condições de temperatura. Devido à alta capacidade de reações químicas dadas pelo ácido graxo ricinoléico, o óleo de mamona tem larga aplicação na fabricação de tintas, vernizes, detergentes, inseticidas, náilon, resinas de plástico, lubrificantes, tubos especiais para irrigação, chapas e engrenagens, aditivos pra combustível, bactericidas, fungicidas, produtos sintéticos, fluidos especiais para transmitir pressões hidráulicas, graxas para navio e aviões, espumas plásticas e pára-choques em automóveis, próteses humanas para coluna vertebral, crânio, mandíbula, dentes e mamas (CARVALHO, 1997; GIBELLI, 2001).

O biodiesel, combustível obtido a partir do óleo de mamona, é outro subproduto muito importante para economia de um país, pois além de ser de origem vegetal e renovável, pode contribuir para a diminuição da importação de petróleo.

A torta de mamona, subproduto da indústria, é utilizada como adubo orgânico em café, citrus, cana-de-açúcar, hortaliças, frutíferas e conhecida como produto que apresenta efeito nematocida (SAVY FILHO et al., 1999), existindo também a possibilidade de utilização para alimentação animal (SANTOS et al., 2001). O produtor pode ainda utilizar a casca do fruto, incorporando ao solo, aumentando o teor de matéria orgânica.

Necessita de precipitação em torno de 700 mm para se ter boa produção, sendo 100 mm por mês, distribuídos regularmente, necessários nos primeiros quatro meses (SAVY FILHO, 1999, citado por MYCZKOWKI, 2003).

Na safra normal, a mamona é plantada nos meses de outubro a dezembro. Em safrinha, a oleaginosa é plantada a partir do início de fevereiro até meados de

março, em sucessão à soja ou ao milho, sendo submetida a curto período de chuva. Por ser uma planta rústica e pouco exigente em água, adapta-se perfeitamente ao clima e ao solo do cerrado (OLIVEIRA, 2007)

A luz e a temperatura são os fatores climáticos que mais influenciam o comportamento da mamona. Poucas são as informações sobre épocas de semeadura da mamona, principalmente das cultivares de porte baixo, recém introduzidas no mercado. O que se sabe é que na região sul do Brasil, o período de semeadura é curto, em comparação com o das regiões com menores latitudes (OLIVEIRA, 2007).

No Brasil, a produção de mamona origina-se de lavouras de sequeiro, em que a água disponível para as plantas provém somente das chuvas. As plantas cultivadas neste sistema estão sujeitas a períodos de estiagem que podem variar de 2 a 4 semanas. A deficiência hídrica, a alta demanda evapotranspiratória durante esse período e a baixa tecnologia normalmente utilizada reduzem a produtividade, e podem até causar a perda total da lavoura. Entretanto, a maioria das cultivares atualmente recomendadas são do tipo tradicional, apresentando as seguintes características: tardia (ciclo longo, 180 dias após a emergência), floração com 42 dias após a emergência, rusticidade, altura média de 1,90 m, fruto semi-indeiscente, boa debulha, produção entre 1500 - 4000 kg/ha, adequado para colheita manual (OLIVEIRA, 2007)

4.2 Mofo-cinzento (*Amphobotrys ricini*)

A doença conhecida como mofo cinzento é causada pelo fungo mitospórico *Amphobotrys ricini* (Buchw.) Hennebert (sin. *Botrytis ricini* Godfrey), cuja fase perfeita corresponde a *Botryotinia ricini* (Godfrey) Wetzl, ainda não relatada no Brasil. O patógeno pertence à divisão Ascomycota, ordem Helotiales e família Sclerotiniaceae. (ALEXOPOULOS, 1995).

A principal forma de disseminação de *A. ricini* é por esporos carregados pelo vento e por sementes (NEERGAARD, 1979), porém alguns insetos, atraídos pela grande exsudação de néctar nas flores, também desempenham papel na disseminação do fungo (KIMATI, 1980; MASSOLA JR. E BEDENDO, 2005).

O progresso do mofo cinzento da mamoneira é dependente de condições favoráveis quando a umidade e temperatura. A doença é particularmente destrutiva em regiões onde o período de floração e frutificação da mamoneira coincide com períodos de alta umidade relativa e temperaturas em torno de 25°C, condições essas que estimulam a abundante esporulação do fungo na superfície dos tecidos afetados, o que confere a área lesionada um aspecto pulverulento de coloração cinza escuro (GODFREY, 1923; MASSOLA JR. & BEDENDO, 2005).

O fungo afeta principalmente inflorescências e racemos, entretanto pode-se desenvolver também sobre outras partes da planta, como caule e folhas, cujas lesões originam-se pela queda do material infectado da inflorescência (BATISTA et al., 1996). Os primeiros sintomas são pequenas manchas de tonalidade azulada nas inflorescências e frutos em desenvolvimento (GODFREY, 1923).

4.3 Controle biológico

O controle biológico de uma doença fúngica consiste no emprego de um organismo (predador, parasita ou patógeno) que ataque o fungo, agente causador da doenças. Existem diferentes estratégias de controle, dentre as quais se destacam: (1) redução do inóculo do fungo com o decréscimo de sua sobrevivência no cultivo, decréscimo da produção ou da liberação de propágulos viáveis, ou decréscimo da sua expansão pelo crescimento micelial; (2) redução da infecção no hospedeiro causada pelo fungo; e (3) redução da severidade da doença (JAMES et al., 1992; FOKKEMA, 1993; PUNJA & UTKHEDE, 2003).

Pode ser dividido em dois tipos, o do controle biológico sem a interferência (ou seja, na forma como é encontrado na natureza), ou o controle biológico que é feito mediante introdução, manipulação e aplicação de organismos capazes de agirem de forma contrária as pragas (SILVA, 2003), sendo esse chamado de controle biológico artificial. O tipo artificial ocorre quando o homem interfere de modo a proporcionar um aumento de seres predadores, parasitas ou patógenos, podendo esses serem: insetos (mais atuantes no controle biológico natural), fungos, vírus, bactérias, nematóides e ácaros. Os organismos mais utilizados no controle biológico artificial são fungos, bactérias e vírus, para os quais há

inclusive formulações comerciais à venda em lojas de produtos agrícolas (exemplo: Dipel, inseticida biológico feito a partir de *Bacillus thuringiensis*) (SILVA, 2003).

No entanto, a produção de microrganismos selecionados para uso agropecuário não é uma prática muito difundida no Brasil devido à falta de refino no processo de produção, dificuldade esta que eleva o custo de produção, o que inviabiliza empresas privadas a investir no processo e, por sua vez, o setor agropecuário se priva dos benefícios destes microrganismos.

Entre os pontos cruciais para viabilizar o uso de microrganismos na agropecuária, destacam-se a estabilidade do microrganismo, seu espectro de ação, o substrato destinado à produção, as condições de cultivo, a manutenção da atividade para a qual o microrganismo é destinado durante a fase produtiva, a estocagem do microrganismo e a ausência de riscos, tanto ambientais, quanto no manuseio do agente microbiano. Assim, um programa de pesquisa para desenvolver um agente de controle biológico envolve diferentes fases, como: obtenção de microrganismos; desenvolvimento da produção em meios de cultivo em base a subprodutos agroindustriais; otimização do processo de produção e escalonamento dos processos; recuperação e concentração do produto; formulação e aplicação em campo; registro e comercialização. Dentre estas etapas, uma das mais importantes é a de produção do microrganismo, incluindo a seleção do meio, o tipo de processo utilizado para a produção (estado sólido, semi-sólido e líquido) e as condições ótimas para o cultivo (temperatura, umidade, atividade de água, pH, aeração e agitação, entre outras).

4.3.1 *Clonostachys rosea*

O *Clonostachys rosea*, anamorfo de *Nectria ochroleuca* (Schwein.) Berk, é um ascomicota da ordem Hypocreales (SAMUELS citado por SUTTON et al., 1997, p. 316). Este é um hifomiceto que produz conídios unicelulares em duas formas distintas, penicilado e verticilado, suas colônias são geralmente esbranquiçadas, laranjadas ou salmão em meio de cultura. Domsch et al. propôs que ex-*Gliocladium roseum* se tornasse o gênero *Clonostachys* citado por Sutton et al. (1997). Hoje é reclassificado como *C. rosea* (Link: Fr.) Schroers, Samuels, Siefert, e W. Gams [*Gliocladium roseum* Bainier, teleomorfo de

Bionectria ochroleuca (Schw.) Schroers and Samuels] (SCHROERS et al., 1999). É um micoparasita destrutivo contra alguns fungos fitopatogênicos incluindo *Botrytis* spp. (LI et al., 2002).

C. rosea é encontrado em diversas regiões do mundo: tropicais, temperadas, subárticas e até desérticas. Foi relatado em culturas, campo, matas, florestas, água doce e solos litorâneos, particularmente em locais com pH variando entre neutro e alcalino. Intrigantemente, *C. rosea* é conhecido por colonizar raízes, hastes, vagens, e sementes de soja, raízes de trevo vermelho, folhas de morango e framboesa, sem produzir sintomas. Algumas pesquisas que investigam se *C. rosea* poderia ser patógeno de maçãs, tubérculos de batata, plântulas de coníferas, *Exacum affine*, e feijões de faba foram consideradas inconclusas, uma vez que não se efetuou a comprovação do postulado de Koch (AL-HAMDANY e SALIH; ARIE et al.; HANSO e KAROLES; HUBER e FINLEY; IBNU e SUPRIANA; THERON e HOLZ, citados por SUTTON et al., 1997). O estado teleomorfo (fase sexuada) de *C. rosea*, é encontrado na maioria das vezes nos galhos de árvores recém mortas, mas também sobre tecidos jovens de plantas herbáceas e fungos. Possui hoje uma reputação distinta de micoparasita de um amplo espectro de fungos, o que demonstra sua natureza cosmopolita e sua extraordinária versatilidade ecológica (SUTTON et al., 1997).

4.3.2 *Trichoderma* spp.

O gênero *Trichoderma*, pertencente à Ordem Hypocreales, é representado por fungos não patogênicos, que são habitantes do solo e que exercem antagonismo a vários fitopatógenos, por parasitismo e/ou antibiose (KRUGNER e BACCHI, 1995), bem como por hiperparasitismo (MELO, 1998).

O *Trichoderma* spp. é um micoparasita necrotrófico eficaz no controle de inúmeros fungos fitopatogênicos, principalmente aqueles com estruturas de resistência consideradas difíceis de serem atacadas por microrganismos, como esporos, escleródios, clamidósporos e microescleródios (MELO, 1996). Fatores como temperatura, umidade, aeração, pH e teor de matéria orgânica influenciam na sobrevivência do *Trichoderma* em solo natural ou infestado artificialmente.

Os mecanismos de ação pelos quais o *Trichoderma* pode atuar são: antibiose, hiperparasitismo, competição e também em alguns casos por promoção de crescimento. O conhecimento de mecanismos de ação é de fundamental importância no emprego de métodos de melhoramento genético, para aumentar a vantagem competitiva no ambiente. Estes mecanismos variam de espécie para espécie e, também, de linhagem para linhagem dentro da mesma espécie, de acordo com a interação hospedeiro-parasita (MELO, 1996).

4.4 Óleos essenciais

De acordo com Vitti e Brito (2003), os óleos essenciais, também conhecidos como óleos voláteis, óleos etéreos ou simplesmente essências, são definidos pela International Standard Organization (ISO) como produtos obtidos de partes das plantas, por destilação por arraste com vapor d'água, bem como produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos. São misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (SIMÕES e SPITZER, 1999). As denominações dadas a estes óleos são devidas às suas características físico-químicas. São considerados óleos por serem, geralmente líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente; por apresentarem volatilidade, recebem ainda o nome de óleos voláteis; e são chamados de essenciais, devido ao aroma agradável e intenso da maioria de seus representantes. A denominação óleos etéreos é referente ao fato dos mesmos serem solúveis em solventes orgânicos apolares, como o éter.

Outras características que podem ser identificadas nos óleos essenciais são:

- Sabor: geralmente acre (ácido) e picante;
- Cor: quando recentemente extraídos, os óleos são geralmente incolores ou ligeiramente amarelados: poucos são aqueles que apresentam cor, como o óleo volátil de camomila que tem coloração azulada;
- Estabilidade: normalmente os óleos essenciais são instáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais;

- A maioria dos óleos essenciais possui índice de refração e são opticamente ativos, propriedades estas usadas na sua identificação e controle da qualidade.

Segundo Janssen et al., citados por Silva et al. (2005), um composto é considerado biologicamente ativo quando exerce ação específica sobre determinado ser vivo, seja ele animal, vegetal ou microrganismo. Uma vasta gama de compostos orgânicos de origem vegetal é biologicamente ativa, isto é, tem ação tranqüilizante, analgésica, antiinflamatória, citotóxica, anticoncepcional, antimicrobiana, antiviral, fungicida, inseticida, etc. Dentre os fitocompostos, os óleos essenciais encontram maior aplicação biológica como agentes antimicrobianos, o que representa uma extensão do próprio papel que exercem nas plantas, defendendo-as de bactérias e fungos fitopatogênicos.

De acordo com Simões e Spitzer (1999), os óleos essenciais são geralmente produzidos por estruturas secretoras especializadas, tais como: pêlos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos ou em bolsas específicas. Tais estruturas podem estar localizadas em algumas partes específicas ou em toda a planta. Assim, pode-se encontrar os óleos essenciais nas flores, como é o caso da rosa e do jasmim; nas folhas, como ocorre nos eucaliptos, menta e no capim-limão; nos frutos, como na laranja e no limão; na madeira, como no sândalo e no pau-rosa; nas cascas do caule, como ocorre nas canelas; nas raízes, como se observa no vetiver; nos rizomas, como no gengibre; e nas sementes, como na noz moscada. E segundo Vitti e Brito (2003), os óleos essenciais obtidos de diferentes órgãos de uma mesma planta podem apresentar composição química, caracteres físico-químicos e odores distintos.

4.4.1 *Cymbopogon martini* Staph

Cymbopogon martini, vulgarmente chamado de palma-rosa, uma espécie da família Poaceae, tem como origem a Índia e é muito conhecida por seu emprego na medicina popular e pela importância do seu óleo essencial no comércio mundial por ter ação antifúngica, cujo princípio ativo responsável é o geraniol (BARD et al., 1988).

O geraniol como componente mais importante do *C. martini* var. *moita*, pode variar de 38 a 97% em sua concentração, dependendo das seleções varietais que ocorrem dentro da variedade, segundo o observado por Sahoo & Dutta (1982).

De acordo com Mishra et. al.(1998), em seu trabalho para determinar a ação do óleo essencial de palma-rosa contra três espécies de *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. fumigatus* e *A. parasiticus*), nas doses de 3.000, 2000 e 900 ppm, respectivamente, descobriram que o geraniol é o maior constituinte.

4.4.2 *Cinnamomum zeylanicum* Breyn

A canela, (*Cinnamomum zeylanicum*) espécie da família Lauraceae, é uma das mais antigas no oriente; misturada com outros produtos servia para embalsamento de cadáveres. Na medicina tradicional é estimulante, eupéptica, carminativa e antidiarréica (ABREU, 2006). A composição do seu óleo essencial é muito variável, de 60 a 90% de aldeído cinâmico e 10% de eugenol na casca e 10% de aldeído cinâmico e 60 a 95% de eugenol nas folhas. (ALBUQUERQUE, 1989).

Trabalhos que mostram atividade antimicrobiana do óleo da folha de *C. zeylanicum*, como de Hili et al. (1997), têm comprovado atividade antibacteriana contra três bactérias e quatro raças de levedura. Isso demonstra que o óleo da folha inibe completamente o crescimento da *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, na concentração de 500 ug/mL.

4.5 Fungicidas

Os fungicidas são importantes ferramentas para o controle das principais doenças das plantas em sistemas intensivos de produção de culturas (BRENT & HOLLON, 1998).

De 1940 a 1970, uma série de novas classes químicas foram introduzidas no controle de fitopatógenos. Os ditiocarbamatos e, posteriormente, as ftalamidas representaram uma melhoria significativa nos fungicidas. No período de 1960 à 1970 registro-se uma expansão rápida na investigação e desenvolvimento de novos fungicidas. Nesta década os fungicidas protetores mais utilizados foram mancozebe e clorotalonil. Já nesta época começaram a se classificar os fungicidas como protetores/contato e sistêmicos (HORSFALL, 1975).

Atualmente, não existem fungicidas registrados no Ministério da Agricultura para o controle de mofo cinzento, causado por *A. ricini* no cultivo da mamoneira (COMPÊNDIO, 1999).

4.5.1 Dicarboximidas

Os fungicidas desta classe têm sido empregados desde meados dos anos 1970, principalmente no controle de fungos do gênero *Botrytis*, *Sclerotinia* e *Monilinia*.

A atividade de fungicidas dicarboximidas foi primeiro relatado no início de 1970 (FUJINAMI et al., 1971) com três principais produtos comerciais ; iprodione (LACROIX et al., 1974), vinclozolin (POMMER & MANGOLD, 1975) e procimidone (HISADA et al., 1977). Dicarboximidas foram originalmente introduzidos para o controle de *Botrytis cinerea*, primeiramente em vinhas (POMMER & LORENZ, 1987), sendo que são tipicamente fungicidas de proteção e algum pode ter efeito sistêmico (HISADA et. al., 1977), sendo melhor empregados como materiais protetores. Comparada a muitas outras classes de fungicidas o seu espectro de atividade é relativamente reduzido, mas inclui espécies dos seguintes gêneros: *Botrytis*, *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Monilia*, *Alternaria*, *Phoma*, *Didymella* e *Rhizoctonia*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Obtenção e manutenção de isolados

O isolado de *Amphobotrys ricini* (L3) utilizado no trabalho foi cedido pela EMBRAPA ALGODÃO (CNPQ), localizada em Campina Grande - Paraíba e o isolado de *Clonostachys rosea* (CCR64), foi cedido pela EMBRAPA MEIO AMBIENTE (CNPMA), localizada em Jaguariúna - São Paulo.

5.2 Avaliação de diferentes meios de cultura na esporulação de *Clonostachys rosea*

O trabalho foi realizado no Setor de Defesa Fitossanitária, do Departamento de Produção Vegetal, da Faculdade de Ciências Agronômicas - FCA, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu.

Utilizou-se o isolado CCR64 (EMBRAPA-CNPMA), o qual vem sendo usado como agente de biocontrole, sendo esse mantido em meio de cultura BDA, (Batata – Dextrose – Agar) a 25°C, no escuro.

Os meios de culturas testados foram: BDA (39 g/L (Acumedia Co.)); Aveia-Ágar (20 g/L de aveia em flocos (Quaker®), 18 g/L de ágar); Mazeina-Ágar (20 g/L de amido de milho (Maizena®), 18 g/L de Agar); Arroz-Ágar (20 g/L de arroz cozido moído, 18

g/L de Agar); V8-5%(5%(v/v) de suco V-8(Campbell Co.), 3,2 g/L de CaCO₃, 18 g/L de ágar); V8-10%(10%(v/v) de suco V-8(Campbell Co.), 3,2 g/L de CaCO₃, 18 g/L de ágar), V8-20%(20%(v/v) de suco V-8(Campbell Co.), 3,2 g/L de CaCO₃, 18 g/L de ágar); TJ-5%(5%(v/v) de suco de tomate natural (Superbom), 3,2 g/L de CaCO₃, 18 g/L de ágar) ; TJ-10%(10%(v/v) de suco de tomate natural (Superbom), 3,2 g/L de CaCO₃, 18 g/L de ágar) ; TJ-20%(20%(v/v) de suco de tomate natural (Superbom), 3,2 g/L de CaCO₃, 18 g/L de ágar). Os meios foram então esterilizados em autoclave por 20 minutos à 120°C, vertendo-os em placas de Petri para a utilização.

Para a inoculação dos meios utilizou-se um disco, de 5 mm de diâmetro colonizado, obtido da cultura do agente de controle biológico crescido em BDA, a 25°C no escuro, por 5 dias, por placa de Petri. O experimento foi inteiramente casualizado, com 12 repetições, considerando como unidade amostral uma placa de Petri contendo o meio a ser avaliado. Os diferentes meios foram mantidos em câmara de crescimento tipo BOD, a 25°C, por 8 dias, no escuro.

A esporulação do fungo, nos diferentes meios de culturas, foi avaliada no 8° dia de incubação. Cada placa de Petri foi lavada individualmente com um volume de 10 mL de água destilada autoclavada, precedendo-se a coleta da suspensão, a qual foi utilizada para determinar a concentração dos conídios/mL, através de quatro leituras em câmara de Neubauer.

Os dados foram analisados utilizando método de comparação entre médias, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, sendo os dados transformados para $(X+1)^{1/2}$.

5.3 Avaliação de diferentes meios de cultura na esporulação de *Amphobotrys ricini*

O trabalho foi realizado no Setor de Defesa Fitossanitária, do Departamento de Produção Vegetal, da Faculdade de Ciências Agronômicas - FCA, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, campus Botucatu.

Utilizou-se o isolado L3 (EMBRAPA-CNPA), o qual vem sendo usado como fitopatógeno selecionador dos genótipos resistentes de mamoneira do programa de melhoramento FCA/UNESP, sendo esse mantido em meio de cultura BDA, a 25°C, no escuro.

Os meios de culturas testados foram: BDA (39 g/L (Acumedia Co.)); Aveia-Ágar (20 g/L de aveia em flocos (Quaker®), 18 g/L de ágar); Mazeina-Ágar (20 g/L de amido de milho (Maizena®), 18 g/L de Agar); Arroz-Ágar (20 g/L de arroz cozido moído, 18 g/L de Agar); FM (80 g/L de folhas de mamona trituradas, 18 g/L de ágar); FM-CaCO₃ (80 g/L de folhas de mamona trituradas em 200 mL de água destilada, 18 g/L de Agar, 3,2 g/L de CaCO₃); V8-5%(5%(v/v) de suco V-8(Campbell Co.), 3,2 g/L de CaCO₃, 18 g/L de ágar); V8-10%(10%(v/v) de suco V-8(Campbell Co.), 3,2 g/L de CaCO₃, 18 g/L de ágar), V8-20%(20%(v/v) de suco V-8(Campbell Co.), 3,2 g/L de CaCO₃, 18 g/L de ágar); TJ-5% (5%(v/v) de suco de tomate natural (Superbom), 3,2 g/L de CaCO₃, 18 g/L de ágar) ; TJ-10% (10%(v/v) de suco de tomate natural (Superbom), 3,2 g/L de CaCO₃, 18 g/L de ágar) ; TJ-20% (20%(v/v) de suco de tomate natural (Superbom), 3,2 g/L de CaCO₃, 18 g/L de ágar). Os meios foram então esterilizados em autoclave por 20 minutos à 120°C, vertendo-os em placas de Petri para a utilização.

Para a inoculação dos meios, utilizou-se um disco, de 5 mm de diâmetro colonizado, obtido da cultura do patógeno crescido em BDA, a 25°C no escuro, por 5 dias, por placa de Petri. O experimento foi inteiramente casualizado, com três repetições, considerando como unidade amostral uma placa de Petri contendo o meio a ser avaliado. Os diferentes meios foram incubados em câmara de crescimento tipo BOD, a 25°C, por 8 dias, no escuro.

A esporulação do fungo, nos diferentes meios de culturas, foi avaliada no 8° dia de incubação. Cada placa de Petri, individualmente, foi lavada com um volume de 10 mL de água destilada autoclavada, precedendo-se a coleta da suspensão, a qual foi utilizada para determinar a concentração dos conídios/mL, através de quatro leituras em câmara de Neubauer.

Os dados foram analisados utilizando método de comparação entre médias, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, sendo os dados transformados para $(X+1)^{1/2}$.

5.4 Avaliação *in vitro* do crescimento micelial do isolado de *Amphobotrys ricini*, utilizando diferentes concentrações de óleos essenciais e fungicidas

O experimento foi realizado no Laboratório de Patologia Florestal do Setor de Defesa Fitossanitária do Departamento de Produção Vegetal. Foram utilizados 7 óleos essenciais das seguintes espécies (Tabela 11, Apêndice): *Eucaliptus citriodora* (eucalipto), *Cymbopogon martini* (palma-rosa), *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Mentha piperita* (menta), *Citrus limom* (limão), *Melaleuca alternifolia* (tea tree), *Azadirachta indica* (nim) e testemunha. Foram preparadas 200 placas de Petri contendo meio BDA com 5 diferentes concentrações dos óleos, a saber: 1000; 2000; 3000; 4000 e 5000)µL/L. Repicou-se para o meio BDA, contendo os tratamentos, discos de 0,7 cm de diâmetro do isolado do fungo das bordas da colônias com 11 dias de idade e transferidos para o centro das placas e mantidas em câmara do tipo BOD, à 25 °C, com fotoperíodo de 12h, até o 6º dia.

A avaliação foi realizada por meio da medição diária dos diâmetros (cm) das colônias em dois sentidos perpendiculares entre si, tomando-se como valor de crescimento a média das duas medidas. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 8 x 5. Os resultados foram submetidos ao teste de média de Tukey, a 5% de probabilidade.

Foram comparados nove fungicidas comerciais (Tabela 1) de diferentes grupos químicos, tanto usados para tratamento de sementes quanto para parte aérea, para controle de *Botrytis cinerea*.

Tabela 1. Fungicidas testados quanto à eficiência *in vitro* no controle de *Amphobotrys ricini* Botucatu-SP, 2009.

Ingrediente ativo (i.a)	Grupo químico	Classe	Formulação	Concentração i.a.
azoxystrobina	estrobiluriana	sistêmico	WG	500 g/Kg
clorotalonil	isoflalonitrila	contato	PM	750 g/Kg
tiofanato metílico	Benzamidazois	sistêmico	PM	700 g/Kg
carbendazim	Benzamidozóis	sistêmico	SC	500 g/L
tebuconazole	Triazóis	sistêmico	CE	200 g/L
mancozeb	Ditiocarbamatos	contato	PM	800 g/Kg
ipridione	Dicarboximida	contato	SC	500 g/L
procimidone	Dicarboximida	sistêmico	PM	500 g/Kg
Carboxin + thiram	Carboxanilida + dimetilditiocarbamato	sistêmico + contato	SC	200 + 200 g/L

SC- suspensão concentrada; PM- pó molhável; CE- concentração emulsionável; WG- granulado

Para produção do inóculo, discos de micélio do isolado (L3), de 0,7 cm de diâmetro, foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo meio BDA e, posteriormente, incubados sob condições controladas (temperatura de 25° C e fotoperíodo de 12 horas), até a colonização do fungo atingir o diâmetro total da placa.

Para o preparo do meio de cultura com fungicida, cada produto foi adicionado ao meio de cultura BDA. Cada produto utilizado foi diluído em água destilada autoclavada, sob fluxo laminar. Primeiro foi feita uma suspensão estoque I para cada fungicida, ou seja 1 g de i.a. de cada produto comercial, que podia variar de acordo com a porcentagem para cada produto em 100 mL de água, obtendo-se a concentração de 10.000 ppm. A partir desta solução estoque, foram feitas diluições em série, transferindo-se 10 mL da solução estoque para 90 mL de água, obtendo-se a solução estoque II (1.000 ppm), e transferindo-se 10 mL da solução II para 90 mL de água, obtendo-se a solução estoque III (100 ppm) e a última diluição de 10 mL da solução III para 90 mL de água, obtendo-se assim a solução estoque IV (10 ppm). De cada uma dessas soluções estoques, foram retirados 10 mL e transferindo para 90 mL de meio BDA fundente (45-47° C), obtendo-se assim os meios nas diluições de 1000, 100, 10 e 1 ppm, respectivamente.

Discos do meio BDA, de 0,7 cm de diâmetro, contendo micélio do fungo foram transferidos para o centro das placas de Petri com meio BDA com os fungicidas. As testemunhas consistiram de discos de micélio colocados em meio BDA sem fungicidas. A incubação ocorreu sob condições controladas, temperatura de 25° C e fotoperíodo de 12 horas.

Cada tratamento foi representado por cinco placas de Petri com 4 concentrações de cada um dos fungicidas, mais a testemunha. O delineamento foi inteiramente casualizado, esquema fatorial 10 X 4, ou seja, 10 tratamentos, 4 concentrações (1, 10, 100 e 1000 ppm) e 5 repetições, sendo cada repetição uma placa de Petri.

A avaliação foi realizada diariamente e terminou quando a colonização das placas testemunhas atingiu próximo ao diâmetro total das placas (8,5 cm), o que levou por volta de 11 dias. Com o auxílio de uma régua, mediram-se, em dois sentidos perpendiculares, os diâmetros da colônia de cada placa de Petri, com os respectivos produtos e concentrações, comparando-os ao crescimento médio das testemunhas. Assim, calculou-se o valor da porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) (MENTEN et al., 1976).

$$\text{PIC} = \frac{\text{Crescimento da testemunha} - \text{Crescimento tratamento}}{\text{Crescimento da testemunha}} \times 100$$

Para a análise estatística, as médias dos dados foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Correlacionando a porcentagem de inibição com o logaritmo da concentração do fungicida, foi obtido, graficamente, o valor aproximado da dose efetiva mediana (ED₅₀) ou seja, a concentração do produto químico necessária pra inibir em 50% o crescimento micelial do fungo (Edgington et al., 1971).

Após o cálculo da ED₅₀, os fungicidas foram classificados em quatro categorias de eficiência, segundo escala de Bollen & Fucks (1970), Edgington et al. (1971) e Kataria & Grover (1978), onde:

- a) ED₅₀ < 1 µL/L: Altamente eficiente (A.E);
- b) ED₅₀ entre 1-10 µL/L: moderadamente eficiente (M.E);
- c) ED₅₀ entre 10-50 µL/L: pouco eficiente (P.E);
- d) ED₅₀ > 50 µL/L: ineficiente (I).

5.5 Avaliação *in vitro* da germinação de esporos do isolado de *Amphobotrys ricini*, utilizando diferentes concentrações de óleos essenciais e fungicidas

O experimento foi realizado no Laboratório de Micologia e Patologia Florestal do Setor de Defesa Vegetal do Departamento de Produção Vegetal.

Os testes *in vitro* da ação dos óleos essenciais de plantas sobre a germinação de conídios de isolados de *Amphobotrys ricini* ocorreram em meio ágar a 2% em água, nas concentrações de 1000; 2000; 3000; 4000 e 5000 µL/L dos óleos essenciais de *Cymbopogon martini* (palma-rosa), *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *E. citriodora* (eucalipto), *Melaleuca alternifolia* (tea tree), *Azadirachta indica* (nim) *Mentha piperita* (menta) e *Citrus limon* (limão). Os óleos foram incorporados após autoclavagem antes de vertê-los sobre a placas de Petri. Após a gelatinização dos meios, as placas receberam a

deposição de 10 μL de uma suspensão contendo 1×10^6 conídios/mL de *Amphobotrys ricini*. Cada placa continha 5 repetições. As placas foram mantidas em câmara tipo B.O.D por 24 horas, a 25° C, na ausência de luz, e avaliadas em microscópio ótico, quanto à inibição da germinação dos conídios. Para paralisar o crescimento do tubo germinativo adicionou-se lactofenol. Foram considerados conídios germinados aqueles que apresentaram tubos germinativos com comprimento igual ou superior do conídio analisado. O delineamento foi o inteiramente casualizado em fatorial 7 x 5. Os dados foram transformados em porcentagem de inibição da germinação de conídios, submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey a 5% de probabilidade, visando comparar as médias dos dados.

5.6 Aplicação de *Clonostachys rosea* em frutos destacados de mamoneira

O experimento foi realizado no Departamento de Produção Vegetal do Setor de Defesa Fitossanitária. Frutos de mamoneira da cultivar AL –Guarany e do híbrido Lyra, foram destacados dos racemos, desinfestados em solução de álcool 70% por 1 minuto, solução de hipoclorito de sódio 2% por 1 minuto, e água destilada por 30 segundos. Os tratamentos foram compostos de: 1- aplicação de *Clonostachys rosea* preventivamente (CLP); 2- aplicação de *Clonostachys rosea* curativamente (CLC); 3- aplicação de *Clonostachys rosea* preventivamente no fruto com fermento (CLPFF); 4- aplicação de *Clonostachys rosea* curativamente no fruto com fermento (CLCFF); 5- aplicação de *Amphobotrys ricini* na testemunha (TI); 6- aplicação de apenas água destilada na testemunha (TSI). Foram preparadas suspensão de esporos de *Clonostachys rosea* e de *Amphobotrys ricini*, na concentração de 1×10^5 conídios/mL. Os frutos que consistiam nos tratamentos preventivos foram imersos na suspensão de conídios e permaneceram por 5 minutos, enquanto que os tratamentos curativos foram imersos na suspensão de *Amphobotrys ricini* também por 5 minutos. Decorrido 24 horas, os frutos que foram imersos na suspensão de *Clonostachys rosea* foram imersos na suspensão de *Amphobotrys ricini*, ocorrendo o inverso nos tratamentos curativos. Em seguida, os frutos foram colocados em bandejas plásticas com espuma umedecida, totalizando 15 frutos por material. As bandejas permaneceram em câmara climática, a 25° C. A avaliação da severidade da doença foi realizada com auxílio da escala notas que variava de 1- ausência de sintomas no fruto; 2- menos de 50% de sintomas no fruto;

3- frutos com 50% de sintomas; 4- mais de 50% de sintomas nos frutos; 5- fruto totalmente necrosado. Os dados da severidade da doença dos frutos foram submetidos à análise não-paramétrica. A análise constituiu-se do teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. O programa utilizado foi o GraphPad InStat®, versão 3.06.

5.7 Controle de *Amphobotrys ricini* em mudas de mamoneira, em ambiente protegido, por meio de aplicação de fungicidas, agente de C. biológico e com óleos essenciais

O experimento foi realizado em estufa localizada no Departamento de Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária. Sementes da cultivar AL-Guarany e do Híbrido Lyra foram utilizadas, sendo colocadas três sementes de cada material em sacos plásticos de 2L. A germinação ocorreu 14 dias após o plantio, onde foi feito o desbaste de uma plântula, permanecendo apenas duas por recipiente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, num fatorial 8 X 2, compostos por 8 tratamentos e 2 materiais, e utilizadas 5 repetições. Os tratamentos consistiam em aplicação de iprodione (2000 µl/L); procimidone (2 g/L), óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* (1000 µl/L), óleo essencial de *Cymbopogon martini* 1000 (µl/L), produto comercial Trichodermil contendo cepas de *Trichoderma harzianum* na concentração de 2×10^9 conídios/mL (4000 µl/L); *Clonostachys rosea* suspensão de 1×10^6 conídios/mL. Os tratamentos foram aplicados três vezes, com dois dias de intervalo entre as aplicações. Três dias após a última aplicação dos tratamentos foi inoculada uma suspensão de esporos de *Amphobotrys ricini* nas plântulas. A avaliação de incidência da doença ocorreu quatorze dias depois, onde foi determinada a porcentagem de plântulas doentes, ou seja, aquelas que apresentavam necrose em suas folhas. Para a confirmação da doença foi realizado o Postulado de Koch, onde fragmentos do tecido com sintomas foram repicados, passando por solução de álcool 70% por 1 minuto, solução de hipoclorito de sódio a 2 % por 1 minuto e água destilada esterelizada por 30 segundos. Logo depois, os materiais foram colocados em placas de Petri com meio de cultura tipo BDA, onde ocorreu o crescimento micelial e a esporulação do fungo, confirmando ser *Amphobotrys ricini*. Os dados foram comparados estatisticamente por meio da aplicação do teste de tukey a 5% de probabilidade.

5.8 Elaboração de escala diagramática para avaliação de mofo-cinzento

Considerando-se a inexistência de métodos padronizados para quantificação do mofo-cinzento da mamoneira, este trabalho teve como objetivo desenvolver uma escala diagramática para avaliar a severidade da doença e analisar os níveis de acurácia e precisão das estimativas geradas com sua utilização.

Utilizou-se de 59 racemos de mamoneira (cv. Al-Guarany), os quais foram desinfestados com uma solução de álcool 70% por 30 segundos, solução de hipoclorito de sódio a 2% por 30 segundos e água destilada esterilizada. Em seguida, os mesmos foram distribuídos em bandejas plásticas, sendo acondicionados quatro racemos por bandeja com espuma umedecida.

Para a inoculação utilizou-se discos de 5 mm, obtidos de um cultura pura do micélio de *Amphobotrys ricini*, cultivado em meio BDA, a 25° C, por 8 dias, os quais foram alocados na superfície dos racemos, e, em seguida, a bandeja foi acondicionada em uma câmara climática com temperatura de 25 °C e umidade relativa do ar maior que 80%. Observou-se a evolução da doença, através de fotos diárias dos racemos. Para a determinação da porcentagem de severidade dos racemos, os frutos infectados e sadios foram contados, estimando-se dessa forma a porcentagem da área lesionada, e confeccionando uma escala diagramática com 6 níveis de severidade.

5.8.1 Validação da escala diagramática

No teste de validação da escala diagramática foram utilizadas 93 fotos dos racemos com sintomas de mofo-cinzento em diferentes níveis de intensidade. Com o auxílio da escala diagramática, a severidade foi quantificada por 4 avaliadores, a maioria sem experiência em avaliar a doença.

Tanto a acurácia quanto a precisão de cada avaliador foi determinada por meio de regressão linear simples, com a severidade real (S_r) obtida por da medição eletrônica da lesão, como variável independente e a severidade estimada (S_e) pelo avaliador como variável dependente. A acurácia das estimativas foi determinada pelo teste T aplicada ao intercepto da regressão linear (a), para verificar se foi significativamente diferente de 0, e ao

coeficiente angular da reta (b), para testar se foi significativamente diferente de 1, ao nível 1% de probabilidade. Valores de intercepto significativamente diferentes de 0 indicam a presença de desvios sistemáticos. A precisão das estimativas foi obtida pelo coeficiente de determinação da regressão (R^2), pela variância dos erros absolutos (Severidade estimada menos a severidade real). As análises de regressão foram efetuadas com o auxílio do programa Microsoft Excel 2000[®] (Microsoft Corporation, 2000).

5.9 Avaliação da severidade de *Amphobotrys ricini* a campo

O experimento foi conduzido na área pertencente ao Departamento de Recursos Naturais do Setor de Ciências Ambientais, da Fazenda Experimental Lageado, no município de Botucatu – SP. O delineamento experimental utilizado consistiu em blocos inteiramente casualizados num fatorial 6 X 2, correspondendo a 6 tratamentos e 2 genótipos + testemunhas, sendo 4 blocos compostos por 4 plantas representando uma parcela de 2m². A área apresentava dimensão de 24 m de comprimento e 8 m de largura, o espaçamento utilizado foi de 0,5 m entre plantas e 1 m entre linhas.

O material utilizado foi a cultivar AL-Guarany, e o Híbrido Lyra utilizados nos programas de melhoramento de mamona da Faculdade de Ciências Agrárias – UNESP, Campus de Botucatu – SP.

Os tratos culturais, adubação de plantio, cobertura, controle de plantas daninhas e pragas foram realizados nas épocas propícias. Os tratamentos adotados foram:

- 1- Suspensão de *Clonostachys rosea* na concentração de 1×10^6 conídios.mL⁻¹;
- 2- Suspensão de *Trichoderma harzianum* na forma do produto comercial Trichodermil, produzido pela empresa Itaforte S/A, utilizando-se a dosagem de 2 L.ha⁻¹;
- 3- Óleo de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) na dosagem de 1000 uL/L de água;
- 4- Óleo de palma-rosa (*Cymbopogon Martini*) na dosagem de 1000 uL/L de água;
- 5- Fungicida procimidone, na dosagem de 100g de i.a ou 200 mL de p.c./ 100 L de água;
- 6- Fungicida iprodione, na dosagem de 100g de i.a ou 200 mL de p.c./100 L de água;
- 7- Testemunha inoculada;

8- Testemunha não inoculada.

Foram realizadas duas aplicações de cada um dos produtos dos tratamentos com intervalo de 1 semana entre as aplicações, sendo elas no início da formação dos frutos, com pulverizadores manuais. Uma semana após a segunda aplicação dos tratamentos, foi realizada uma inoculação de uma suspensão de esporos de 1×10^6 conídios/mL do isolado de *Amphobotrys ricini*, utilizando-se um pulverizador manual. Os racemos foram envolvidos por sacos plásticos com algodão umedecidos e sacos de papel, durante 3 dias, agindo como uma câmara úmida, para favorecer o desenvolvimento do fungo. A avaliação da severidade da doença do experimento foi realizada com a escala diagramática desenvolvida para este trabalho durante 3 semanas. Os dados coletados foram submetidos a análise estatística e as médias dos dados comparados entre si por meio do teste de Tukey a 5%.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Avaliação de diferentes meios de cultura na esporulação de *Clonostachys rosea*

Todos os meios de culturas testados se mostraram aptos para a produção de conídios, do agente de controle biológico sendo que a produção média variou de $0,53 \times 10^6$ conídios/mL, para o meio Maisena-Ágar, até $4,41 \times 10^6$ conídios/mL, no meio TJ-5% (Figura 1). Verificou-se que o melhor meio para produção de conídios de *Clonostachys rosea* é o TJ-5%, seguido pelo TJ-20%, com uma esporulação média de $4,04 \times 10^6$ conídios/mL.

Quando analisado pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, o meio de cultura maizena-ágar foi significativamente o que apresentou menor produção de conídios, já os meios V8-10%, Aveia-ágar não diferiram estatisticamente entre eles, assim como os meios TJ-10% e TJ-20% que ficaram na mesma classe estatística. Já os meios Arroz-ágar, BDA, V8-20% e V8-10% diferiram estatisticamente entre si, apresentando uma produção de conídios significativa, sendo eles separados em classes distintas, do menor para a maior produção, respectivamente (Figura 1).

Ao contrário do observado na literatura para outros fungos, como *Diplodia* (BIZETTO et al., 2000), o meio arroz-ágar não estimulou a esporulação, demonstrando que esse meio deve apresentar algum fator nutricional que não estimula a esporulação de *Clonostachys rosea*.

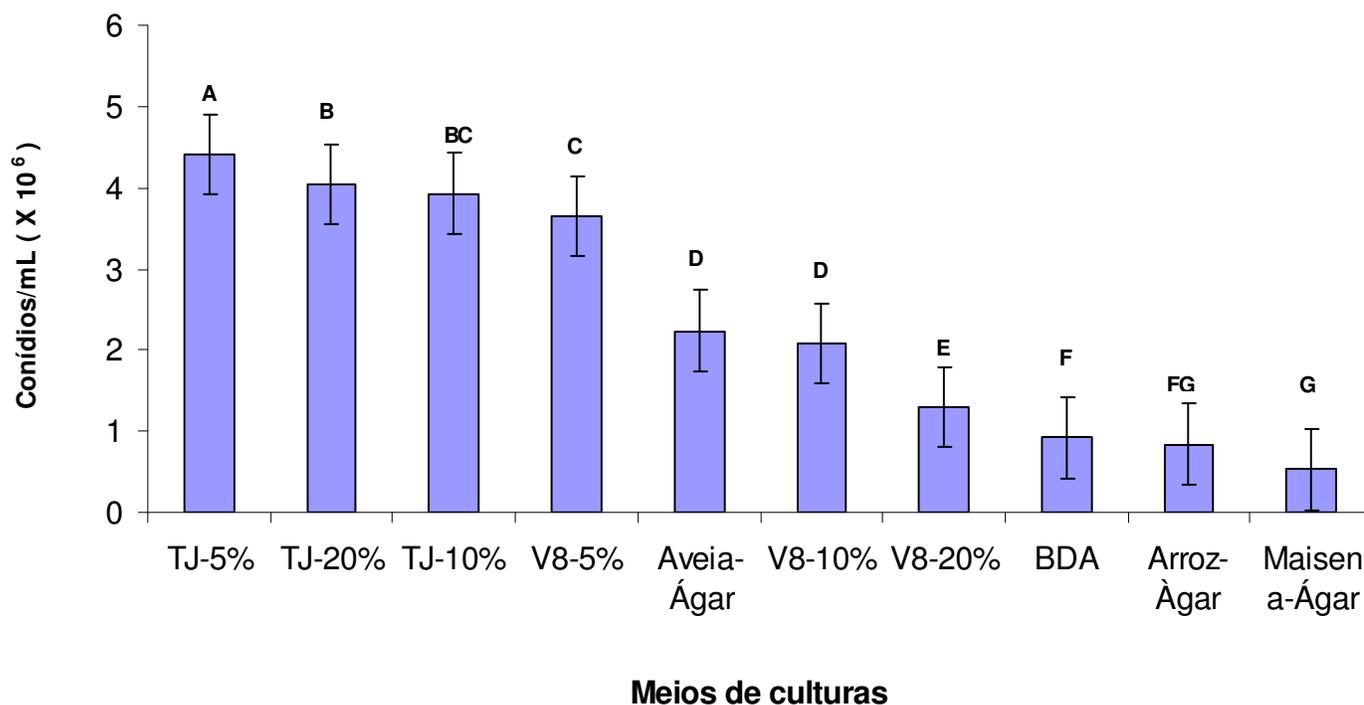


Figura 1 – Esporulação média de *Clonostachys rosea* em diferentes meios de culturas, após 8 dias de incubação em câmara de crescimento, a 25°C, no escuro. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

6.2 Avaliação de diferentes meios de cultura na esporulação de *Amphobotrys ricini*

Todos os meios de culturas testados se mostraram aptos para a produção de conídios do patógeno, sendo que a produção média variou de $2,5 \times 10^6$ conídios/mL, para o meio Maizena-Ágar, e até $5,7 \times 10^6$ conídios/mL no meio V8-20% (Figura 2). Verificou-se que o melhor meio para produção de conídios de *Amphobotrys ricini* é o V8-20%, ficando em segundo lugar o meio BDA, com uma esporulação média de $3,5 \times 10^6$ conídios/mL.

Os meios à base de folhas de mamona não se mostraram eficientes para a produção de conídios do fungo, produzindo $1,8$ e $1,3 \times 10^6$ conídios/mL nos meios FM e FM-CaCO₃, respectivamente.

Quando analisado estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, o meio de cultura maisena-ágar diferenciou estatisticamente dos demais, sendo o meio com menor produção de conídios. Já os meios V8-5%, TJ-5%, Arroz-ágar e FM-CaCO₃ não diferiram estatisticamente entre eles, assim como os meios TJ-10%, TJ-20% e FM que ficaram na mesma classe estatística. Já os meios aveia-ágar, V8-10%, BDA e V8-20% diferiram estatisticamente entre eles, apresentando uma produção de conídios significativa, sendo eles separados em classes distintas, do menor para a maior produção, respectivamente (Figura 2).

O mesmo foi observado na literatura para o fungo *Alternaria brasiliensis* (QUEIROZ et al., 2004), onde o meio de aveia-ágar não estimulou a esporulação e os meios V8-5% e STA-5% foram os que apresentaram as maiores esporulações, demonstrando que meios de cultura contendo na sua composição decoctos, extratos e sucos oriundos de folhas ou de partes vegetais normalmente estimulam o crescimento micelial e a esporulação de vários fungos (DHINGRA e SINCLAR, 1985).

Observou-se a formação de escleródios em alguns meios (Figura 3), ocorrendo nos meios arroz-ágar e aveia-ágar, sendo mais intensamente produzido no meio a base de aveia.

Além das evidentes diferenças na quantidade de conídios produzidos nos diferentes meios estudados, observa-se que há uma interação fisiológica entre o fungo e o meio de cultura, sendo evidenciado pela produção de escleródios em alguns meio e não nos outros.

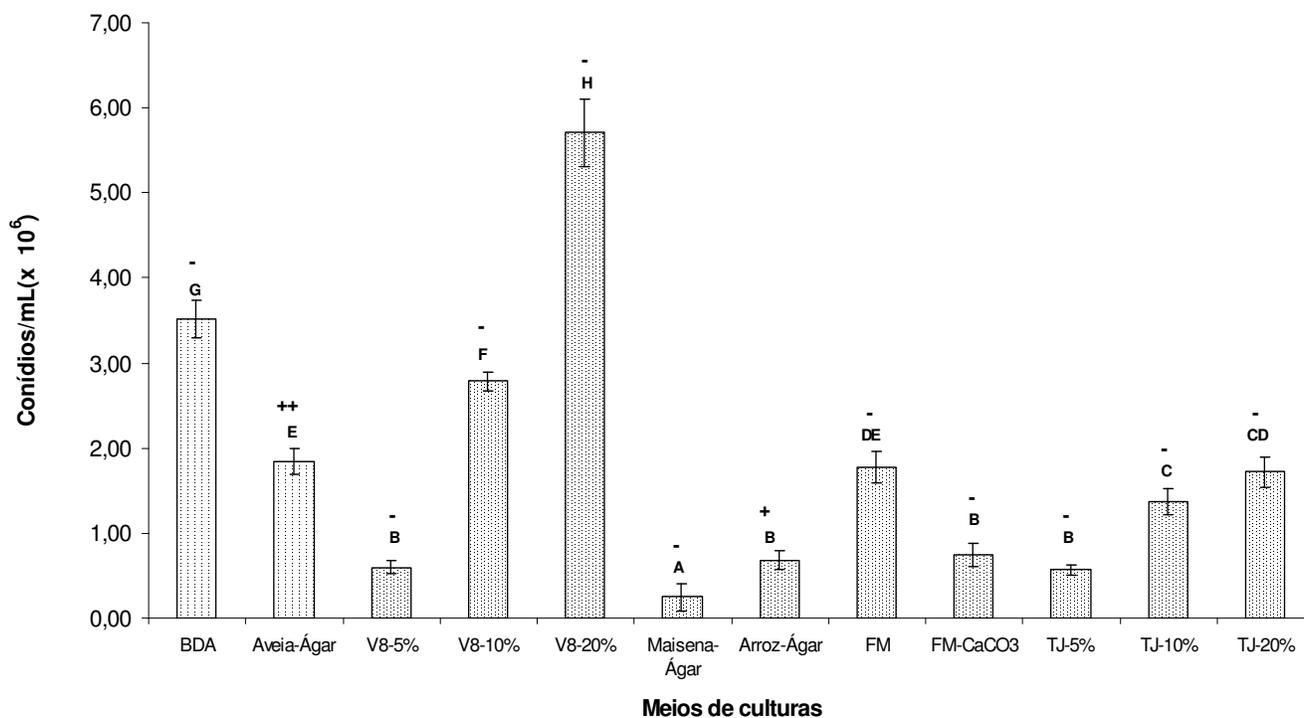


Figura 2 – Esporulação média do *Amphobotrys ricini* em diferentes meios de culturas, após 8 dias de incubação em câmara de crescimento, a 26°C, no escuro. Produção de escleródio: ausente (-), mediana (+), abundante (++) . Barra de variação indicando o desvio padrão das leituras. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.



Figura 3 - Da esquerda para a direita, meio de cultura BDA; meio de cultura aveia-ágar; meio de cultura arroz-ágar, formação de escleródios ocorrendo nos meios arroz-ágar e aveia-ágar, sendo mais intensamente produzido no meio a base de aveia.

6.3 Avaliação *in vitro* do crescimento micelial do isolado de *Amphobotrys ricini*, utilizando diferentes concentrações óleos essenciais e fungicidas

Os óleos essenciais mostraram de maneira diferenciada influência no crescimento de *Amphobotrys ricini*, nas concentrações as quais foram .

Na concentração de 1000 $\mu\text{L/L}$, os óleos das espécies *Citrus limon* (6,72 cm), *Mentha piperita* (4,43 cm) e *Melaleuca alternifolia* (4,40 cm) foram os que menos inibiram o crescimento do fungo, quando comparados com *Eucalyptus citriodora* (2,01 cm), *Azadirachta indica* (2,5 cm), *Cinnamomum zeylanicum* (0,7 cm) e *Cymbopogon martini* (0,7 cm).

Quando comparados na concentração de 2000 $\mu\text{L/L}$, os óleos de *C. martini* e *C. zeylanicum* mantiveram o efeito inibitório no crescimento micelial do fungo, apresentando para ambos valores de 0,7 cm. *Eucalyptus citriodora* e *Mentha piperita* apresentaram uma redução no crescimento micelial de 0,92 cm e 3,66 cm respectivamente.

Aos 3000 $\mu\text{L/L}$, os óleos de *Melaleuca alternifolia*, *Cymbopogon martini* e *Cinnamomum zeylanicum* inibiram totalmente o crescimento micelial do fungo. Foram seguidos por *Mentha piperita* (0,76 cm) e *Eucalyptus citriodora* (0,80 cm).

Na concentração de 4000 $\mu\text{L/L}$, verificou-se que o crescimento micelial foi de 1,99 cm para o óleo de *Melaleuca alternifolia*. Já o óleo de *Citrus limon* não apresentou inibição do fungo (5,77 cm) e os outros óleos apresentaram valores próximos. Na concentração de 5000 $\mu\text{L/L}$, o comportamento foi semelhante ao da concentração de 4000 $\mu\text{L/L}$.

Esses resultados estão em conformidade com o trabalho de Souza et al. (2004) que verificaram que *S. aromaticum* e *C. zeylanicum* foram eficientes na inibição micelial dos fungos *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp, *Eurotium repens* e *Aspergillus niger*, nas concentrações de 200 e 800 $\mu\text{g/mL}$, e que o segundo óleo inibiu totalmente os fungos na primeira concentração. Outros trabalhos com óleo essencial de *C. zeylanicum* mostraram a eficiência em inibir outros fungos. Singh et al. (1995) e MontesBelmont & Carvajal (1998) verificam inibição de *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. nidulans* e *A. flavus*. Wilson et al. (1997) obtiveram efeito inibitório do óleo em *Botrytis cinerea*. Resultados similares da ação inibitória de *C. zeylanicum* no crescimento micelial de *Alternaria solani* foram observados no trabalho

de Abreu (2004) em todas as concentrações utilizadas 250, 500, 750 e 1000 $\mu\text{L/L}$, bem como o efeito inferior do óleo essencial de limão (*Citrus limon*).

Quanto ao *Cymbopogon martini*, os resultados encontrados neste trabalho também condizem com os encontrados por Abreu (2006) e Singh et al. (1980) quando constataram que esse óleo na concentração de 1% foi eficiente contra *Helminthosporium oryzae*, do que fungicidas sintéticos. Neste trabalho verificou-se que *Eucalyptus citriodora* também apresentou bom resultado, confirmando os resultados obtidos por Salgado et al. (2003), os quais trabalharam com óleos essenciais de diferentes espécies de *Eucalyptus* e que apresentaram efeito fungistático na concentração de 500mg/Kg, *in vitro*, no controle de *Fusarium oxysporum* Schelecht., *Bipolaris sorokiniana* Shoemaker e *Botrytis cinerea* Pers.

A respeito de *Melaleuca alternifolia*, a mesma não apresentou um efeito inibitório satisfatório em concentrações baixas, Abreu (2004) constatou efetividade na inibição do crescimento micelial de *A. solani*, nas concentrações de 2000, 3000, 4000 e 5000, $\mu\text{L/L}$, pois este óleo essencial tem sido utilizado com muita propriedade na medicina humana para o controle de fungos e bactérias. Isto pode ser constatado no trabalho de Moreira et al. (2005) que obtiveram inibição de estirpes de *E. coli* pelo óleo na concentração de 0,5 a 0,6 mL/100mL. Possivelmente, este efeito foi devido a sensibilidade do fungo em relação aos compostos do óleo essencial.

Alguns estudos afirmam que *Mentha piperita* apresenta poder antimicrobiano, o que foi constatado por Singh et al. (2003) nas concentrações a partir de 200 mg/mL, sendo letal aos fungos *Alternaria* sp., *Curvalaria lunata* e *Fusarium moniliforme*. Resultados parecidos foram descritos por Abreu (2006), que constatou controle de *Alternaria solani*, *in vitro*, a partir da concentração de 3000 $\mu\text{L/L}$.

O que pode ser observado no presente trabalho, é que em todas as concentrações os óleos de *C. zeylanicum* e *C. martini* não permitiram o crescimento do fungo (Tabela 2 e Figura 4). O óleo de *C. limon* não inibiu o crescimento do fungo, apresentando efeito contrário e favorecendo o crescimento quando comparado com a testemunha, crescendo em toda a área da placa no sexto dia de avaliação. Isto deve ter ocorrido, possivelmente devido a algum constituinte do óleo que possa ter favorecido esse rápido desenvolvimento. Em relação ao óleo de *C. limon*, este resultado está de acordo com o observado por Norman et al.

(1967) e McCalley & Torres-Grifol (1992), que relataram a pouca eficiência na inibição de microorganismos, ou uma possível especificidade por algum fungo ou bactéria.

Tabela 2. Desenvolvimento de *Amphobotrys ricini* sob ação de diferentes óleos essenciais. Botucatu-SP, 2009.

Tratamentos	Concentrações ($\mu\text{L/L}$)				
	1000	2000	3000	4000	5000
	Diâmetro (cm)				
Testemunha	4,75Ba	4,72ABa	4,92Aa	4,91Aa	4,64Aa
<i>Cymbopogon martini</i>	0,7Da	0,7Ea	0,7Ca	0,7Ba	0,7Ba
<i>Melaleuca alternifolia</i>	4,4Ba	3,66BCa	0,7Cc	1,99Bb	1,03Bc
<i>Citrus limon</i>	6,72Aa	6,06Aa	5,9Aa	5,77Aa	6,05Aa
<i>Mentha piperita</i>	4,43Ba	2,44Db	0,76Cc	0,74Bc	0,76Bc
<i>Azadirachta indica</i>	2,5Cab	2,65CDa	2,06Bab	1,7Bbc	1,1Bc
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	0,7Da	0,7Ea	0,7Ca	0,7Ba	0,7Ba
<i>Eucalyptus citriodora</i>	2,01Ca	0,92Eb	0,8Cb	0,7Bb	0,7Bb

Média seguida de letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de tukey à 5% de probabilidade.

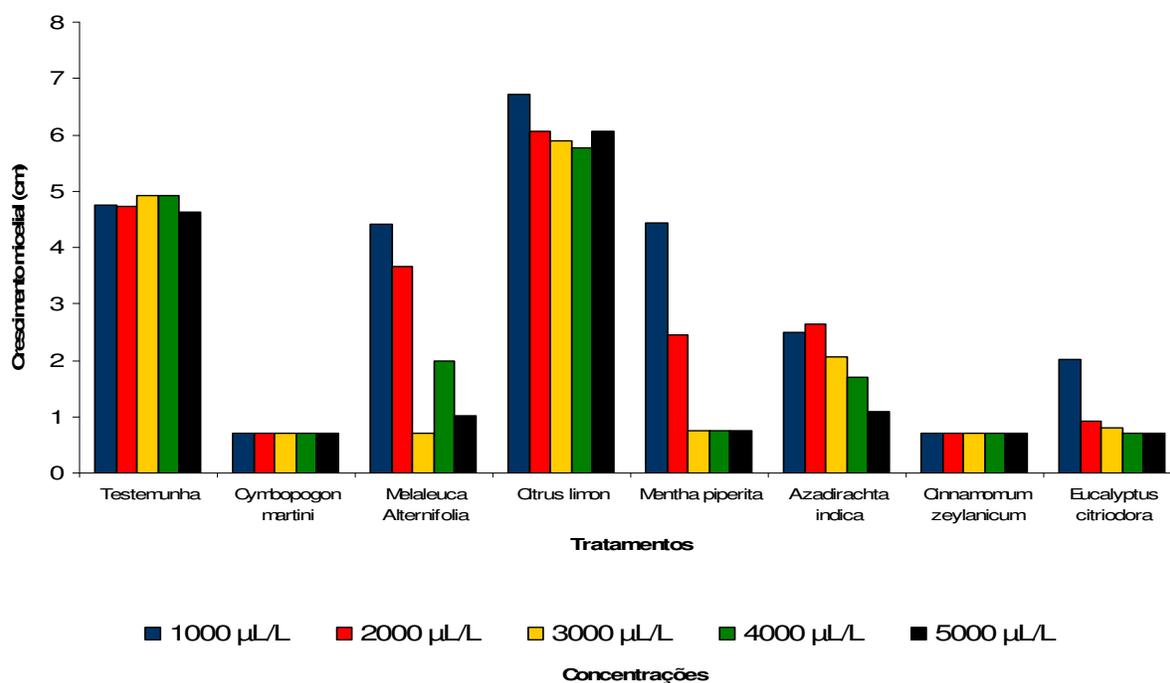


Figura 4. Comportamento do crescimento micelial de *Amphobotrys ricini* sob diferentes concentrações de óleos essenciais.

As porcentagens de inibição (PICs) dos 9 fungicidas testados *in vitro*, a 1, 10 100 e 1000 $\mu\text{L/L}$, para o isolado de *A. ricini*, procedente da EMPRABA ALGODÃO (CNPA), podem ser visualizadas na Tabela 3. Também foram obtidos através dos PICs, a diferentes concentrações, os respectivos ED_{50} dos respectivos fungicidas (Tabela 4).

Tabela 3. Porcentagem de inibição de crescimento micelial (PICs) de *Amphobotrys ricini* em diferentes concentrações de fungicidas. Botucatu-SP, 2009.

Tratamentos	Concentração ($\mu\text{L/L}$)							
	1		10		100		1000	
(PIC %)								
Azoxystrobina	43,20	B b	42,50	B b	53,40	B c	75,40	A b
Clorotalonil	5,00	B c	20,40	B c	100,00	A a	100,00	A a
Tiofanato metílico	100,00	A a	100,00	A a	100,00	A a	100,00	A a
Carbendazim	100,00	A a	100,00	A a	100,00	A a	100,00	A a
Tebuconazole	100,00	A a	100,00	A a	100,00	A a	100,00	A a
Mancozeb	24,00	C bc	9,20	C c	79,40	B ab	100,00	A a
Iprodione	100,00	A a	100,00	A a	100,00	A a	100,00	A a
Procimidone	89,50	A a	87,00	A a	100,00	A a	100,00	A a
Carboxin + Thiram	14,50	C c	15,20	C c	60,20	B bc	99,60	A a
CV(%)	13,44							

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 4. Dose efetiva mediana (ED_{50}) de vários fungicidas relativos à inibição do crescimento micelial do isolado *Amphobotrys ricini* (L3), procedente da EMBRAPA ALGODÃO (CNPA). Botucatu-SP, 2009.

Tratamentos	ED_{50} dos fungicidas ($\mu\text{L/L}$)
Azoxystrobina	> 50
Clorotalonil	10 - 50
Tiofanato metílico *	< 1
Carbendazim *	< 1
Tebuconazole *	< 1
Mancozeb	> 50
Iprodione *	< 1
Procimidone	< 1
Carboxin +thiram	> 50

*tratamentos onde não foi possível elaborar a equação linear da reta ($y=100$), devido ao fato de que em todas as concentrações testadas houve 100% de inibição do crescimento micelial, sendo apenas estimado o valor do ED_{50} .

Para os fungicidas tebuconazole, carbendazim, tiofanato metílico e iprodione não foi possível estabelecer o ED₅₀, devido ao fato de que em todas as concentrações utilizadas houve inibição de 100% do crescimento micelial do fungo. Apenas pode-se afirmar que o ED₅₀ é menor que 1µL/L.

Os fungicidas azoxystrobina, mancozeb e carboxim + thiran foram considerados ineficientes (ED₅₀ > 50µL/L), diferente do que foi observado por Fischer (2003), que trabalhou com o fungo *N. haematococca*. Já os fungicidas tiofanato metílico, carbendazim, tebuconazole, iprodione e procimidione foram altamente eficientes (ED₅₀ < 1µL/L).

Segundo Kimura (1999), em seu trabalho ocorreu a insensibilidade do isolado de *Botrytis cinerea* ao fungicida tiofanato metílico, que confirma a ocorrência de resistência cruzada para esse grupo de fungicidas, com abundante desenvolvimento micelial na concentração de 1000 µL/L do fungicida no meio BDA, demonstrando alto nível de resistência. Porém, neste trabalho ocorreu o inverso, não houve crescimento micelial do isolado de *Amphobotrys ricini* nas das concentrações estudadas com o i.a. tiofanato metílico.

Para o fungicida azoxystrobin, do grupo das estrobilulinas, Caldari Júnior (1998) encontrou grande variação no crescimento micelial de isolados provavelmente ainda não expostos a esse fungicida, no qual o ED₅₀ situou-se abaixo de 0,1 µL/L e para outros em 1000 µL/L, indicando que esse composto não tem nenhuma ou pouca influência no crescimento micelial *in vitro*, discordando também do conceito de resistência de fungos a fungicidas. Sendo o mesmo comportamento observado neste trabalho, onde o ED₅₀ foi maior que 50 µL/L. Vários trabalhos relatam a eficiência de fungicidas benzimidazóis (SMITH, 1994) e dicarboximidas (LORENZ, 1994) contra *Botrytis cinerea*, o que foi confirmado também neste trabalho.

Na figura 5 pode ser visualizado o comportamento de crescimento micelial de *Amphobotrys ricini* sob a influência de diferentes concentrações de fungicidas.

Concentrações

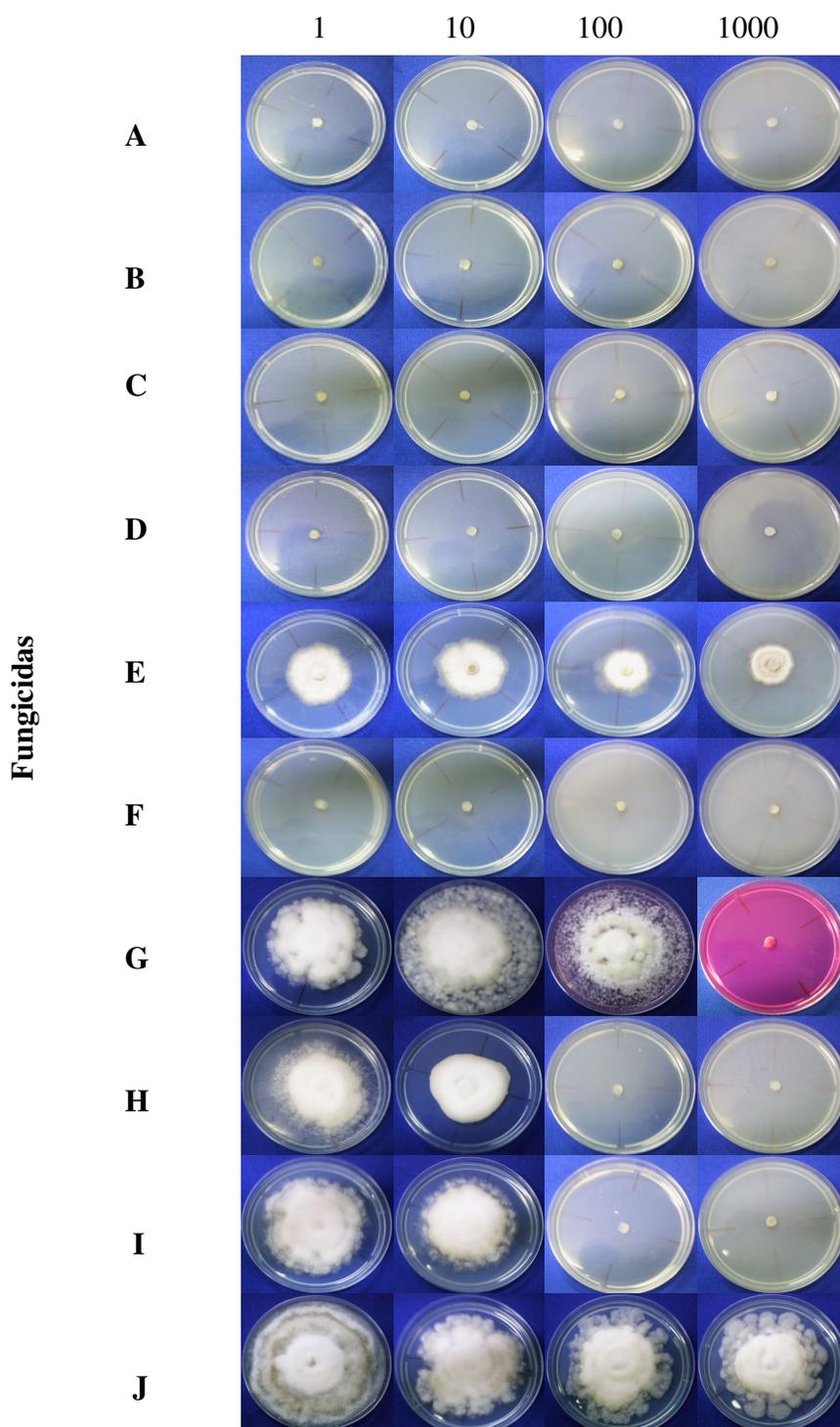


Figura 5. Crescimento micelial de *A. ricini* em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) contendo fungicidas com diferentes concentrações: carbendazim (A), tiofanato metílico (B), iprodione (C), tebuconazole (D), azoxystrobina (E), procimidone (F), carboxin-thiran (G), clorotalonil (H), mancozebe e testemunha (J).

6.4 Avaliação *in vitro* da germinação de esporos do isolado de *Amphobotrys ricini*, utilizando diferentes concentrações de óleos essenciais e fungicidas

Na concentração de 1 $\mu\text{L/L}$, os fungicidas carboxim + thiram e tiofanato metílico permitiram igual capacidade de germinação dos esporos do fungo em relação a testemunha. Neste trabalho, os fungicidas tiofanato metílico e azoxystrobina não apresentaram a mesma capacidade de inibir a germinação de esporos do fungo, diferindo do trabalho realizado por Kimura (1999). Os melhores resultados foram obtidos pelos fungicidas clorotalonil e tebuconazole, que inibiram totalmente a germinação dos conídios (tabela 5).

Tabela 5. Porcentagem de conídios germinados de *Amphobotrys ricini* em diferentes concentrações de fungicidas. Botucatu-SP, 2009.

Tratamentos	Concentrações ($\mu\text{L/L}$)							
	1		10		100		1000	
Conídios germinados (%)								
iprodone	51,20A	a	26,00B	b	24,40B	b	0,00C	c
procimidone	92,80A	a	38,00B	b	40,80B	b	14,80C	c
Carboxim + thiran	100,00A	a	100,00A	a	28,80B	b	0,00C	c
Mancozeb	39,60A	bc	0,00B	c	0,00B	c	0,00B	c
azoxystrobina	19,20AB	cd	21,20A	bc	0,40B	c	0,00B	c
tebuconazole	0,00A	d	0,00A	c	0,00A	c	0,00A	c
tiofanato metílico	100,00A	a	28,80BC	b	48,00B	b	10,00C	c
clorotalonil	0,80A	d	0,00A	c	0,00A	c	0,00A	c
carbendazim	82,40A	ba	92,80A	a	88,00A	ba	69,20B	b
Testemunha	100,00A	a	100,00A	a	100,00A	a	100,00A	a
CV(%)	31,01							

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

Na concentração de 10 $\mu\text{L/L}$, verificou-se que a germinação dos conídios foi inferior a testemunha em todos os tratamentos, exceto no fungicida carbendazim. Os fungicidas azoxystrobina e tiofanato metílico propiciaram um nível de germinação bem inferior a testemunha. Esses fungicidas apresentaram um nível superior quanto a germinação observada no tratamento com procimidone, mas com um nível inferior de inibição de germinação quando comparado com o fungicida tebuconazole. Haddad et al. (2003) também relataram resultados inferiores para a germinação de esporos de *Colletotrichum gloesporioides* quando utilizaram as misturas tiofanato metílico + mancozeb e tiofanato metílico +

clorotalonil, independente da concentração e do isolado utilizado para o controle de antracnose das folhas em cebola (*Allium cepae*). Esses dados divergem dos apresentados por Kimura (1999) em seu trabalho.

Na concentração de 100 $\mu\text{L/L}$, os fungicidas que apresentaram melhor inibição na germinação de esporos foram azoxystrobina, tebuconazole e clorotalonil. Quando se utilizou a concentração de 1000 $\mu\text{L/L}$, todos os tratamentos diferiram significativamente da testemunha. O fungicida iprodione também apresentou inibição total da germinação dos conídios.

O que pode ser observado no presente trabalho é que os dados diferiram dos obtidos para crescimento micelial, onde iprodione, procimidone e tebuconazole foram os que apresentaram os melhores resultados. Na inibição do crescimento do micélio do fungo, apenas tebuconazole apresentou comportamento inibitório também para germinação de conídios em todas as concentrações estudadas (figura 6).

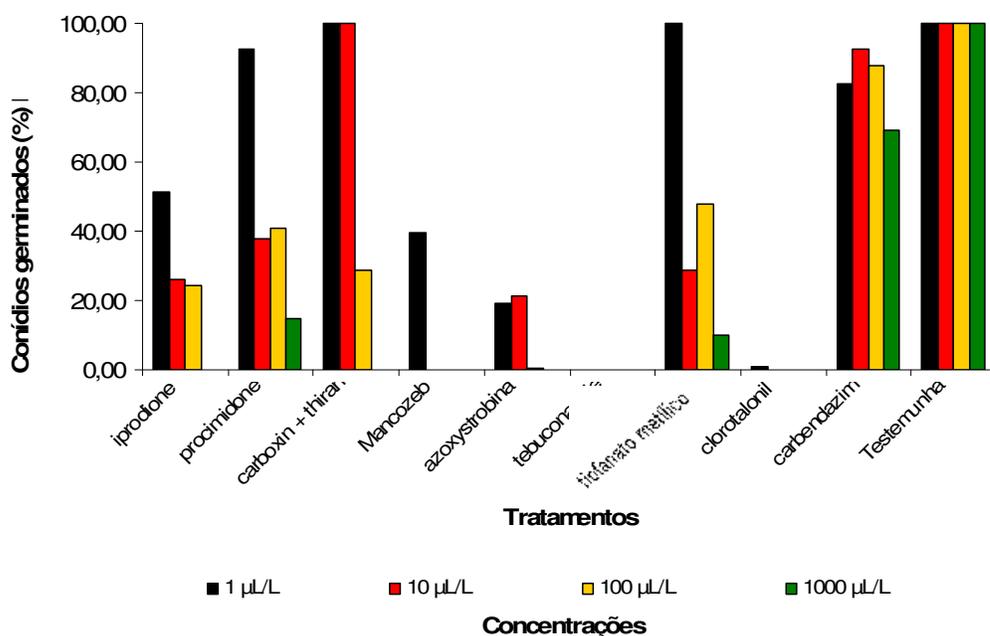


Figura 6. Comportamento da germinação de conídios de *Amphobotrys ricini* em diferentes concentrações de fungicidas.

Kimura (1999) e Davidse (1994) em trabalhos isolados observaram que mesmo com o aumento da concentração do fungicida azoxystrobina, a germinação conidial de *Botrytis cinerea* se manteve constante, levando a crer que este é insensível a este fungicida. Ferreira et al. (2006) em seu trabalho para o controle de doenças causadas por *Cylindrocladium candelabrum*, em eucalipto, também observaram que a germinação de conídios do fungo foi pouco sensível à azoxystrobina. O mesmo não foi observado neste trabalho, onde o aumento da concentração do azoxystrobina levou à redução significativa da germinação conidial do *A. ricini*. Mas quando foram avaliados os fungicidas tiofanato metílico e procimidone, à medida que ocorreu aumento nas concentrações estudadas, ocorreram decréscimos na germinação conidial, confirmando o relatado por Kimura (1999), levando à hipótese de que o fungo apresenta alta sensibilidade a esses fungicidas.

Analisando o comportamento da germinação dos conídios de *Amphobotrys ricini*, verificou-se que os óleos essenciais apresentaram resultados com tendência de inibição, comportamento esse semelhante aos dados do crescimento micelial. Variações foram verificadas entre os óleos essenciais e entre as concentrações (Tabela 6 e Figura 7).

Tabela 6. Porcentagem de conídios germinados de *Amphobotrys ricini* em diferentes concentrações de óleos essenciais. Botucatu-SP, 2009.

Tratamentos	Concentrações ($\mu\text{L/L}$)				
	1000	2000	3000	4000	5000
	Conídios germinados (%)				
<i>Cymbopogon maritini</i>	0,00A c	0,00A c	0,00A c	0,00A c	0,00A c
<i>Eucalyptus citriodora</i>	8,40A b	0,00B c	0,00B c	0,00B c	0,00B c
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	0,00A c	0,00A c	0,00A c	0,00A c	0,00A c
<i>Melaleuca alternifolia</i>	99,60A a	87,60B b	0,80C c	1,60C c	0,80C c
<i>Mentha piperita</i>	98,00AB a	100,00A a	95,60BC bc	93,20C b	98,80AB a
<i>Azadirachta indica</i>	99,60A a	97,60AB a	94,40BC b	96,00AB ab	90,80C b
<i>Citrus limon</i>	100,00A a	100,00A a	99,60A ab	98,80A a	98,80A a
Testemunha	100,00A a	100,00A a	100,00A a	100,00A a	100,00A a
CV(%)	4,12				

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

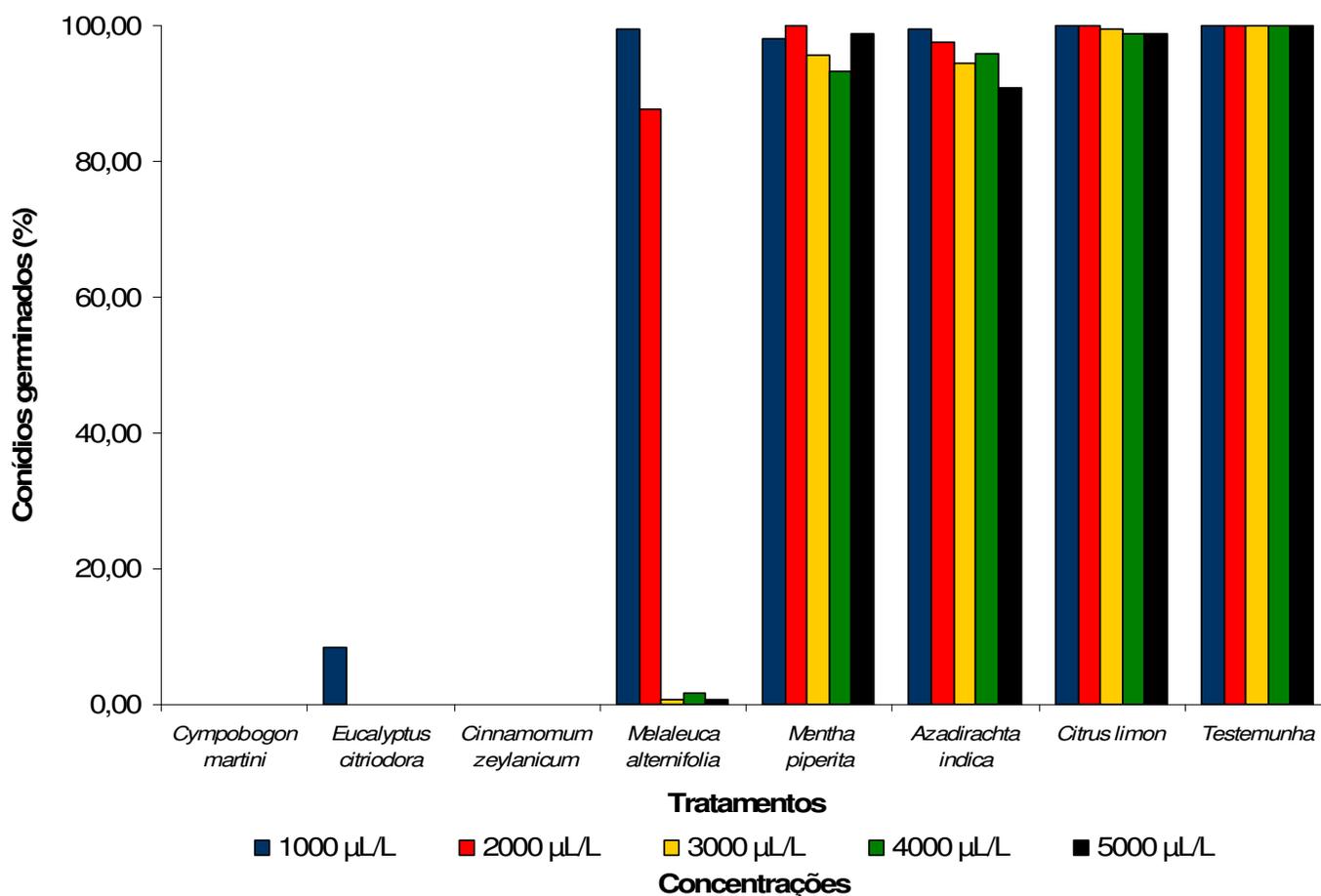


Figura 7. Comportamento da germinação de conídios de *Amphobotrys ricini* em diferentes concentrações de óleos essenciais.

Verificou-se que na concentração de 1000 µL/L, para o óleo de *Citrus limon*, ocorreu germinação de 100% dos conídios, seguida por *Azadirachta indica*, *Mentha piperita* e *Melaleuca alternifolia*, que apresentaram germinação de 99,60, 98,00 e 99,60%, respectivamente, não apresentando diferenças estatísticas entre si, pois os mesmos não promoveram inibição na germinação. Na concentração de 2000 µL/L, os óleos citados anteriormente apresentaram diferenças significativas entre si quando comparados com a concentração de 1000 µL/L, mas dentro da concentração não diferiram entre si, exceto *Melaleuca alternifolia* que apresentou 87,60% de conídios germinados. Nas concentrações de 3000, 4000 e 5000 µL/L, os óleos apresentaram pequenas diferenças, porém significativas tanto entre si, quanto entre concentrações. O óleo de *Citrus limon*, não apresentou inibição na germinação dos conídios do fungo.

Da mesma maneira como ocorrido para o crescimento micelial, os óleos de *C. martini* e *C. zeylanicum* acarretaram inibição de 100% da germinação dos conídios em todas as concentrações estudadas. O óleo de *Eucalyptus citriodora* também apresentou resultados parecidos, sendo que a total inibição da germinação dos esporos ocorreu a partir de 2000 µL/L.

A inibição da germinação conidial é fundamental no controle das doenças, pois este tipo de propágulo geralmente é o ponto inicial da infecção propriamente dita. Para o uso efetivo dos óleos essenciais e seu sucesso é preciso que eles não apenas inibam o crescimento micelial do patógeno, mas também inibam a germinação de seus esporos (ABREU, 2004). Alguns trabalhos realizados por Caccioni e Guizzardi (1994) mostraram que as mesmas concentrações dos óleos de *C. zeylanicum* e *Cymbopogon* sp. inibiram o crescimento micelial, e, também, a germinação dos esporos de *Monilina laxa*, *Mucor piriformes* e *Rhizopus stolonifer*.

6.5 Aplicação de *Clonostachys rosea* em frutos destacados de mamoneira

Para o fruto de mamona da cultivar AL Guarany, sem ferimentos, verificou-se que o melhor tratamento foi o preventivo, sendo inclusive o melhor tratamento dentre todos os outros nesta cultivar. Neste mesmo fruto, com ferimentos, a melhor forma de aplicar o antagonista também foi a preventiva. Já no fruto de mamona do material híbrido Lyra, sem ferimentos, não houve diferenças significativas entre as formas de aplicação. Para os frutos do híbrido Lyra, com ferimento, não houve diferença significativa entre a aplicação preventiva, com nota média de 3,1 e a curativa, com nota de 3,5 .

Em ambos os frutos, os demais tratamentos não apresentaram diferenças entre si, mas todos diferiram do tratamento controle geral. Nenhum tratamento no fruto apresentou diferença quanto ao material genético (Tabela 7 e Figura 8)..

Tabela 7. Severidade da doença, causada por *Amphobotrys ricini*, em frutos de mamona com e sem ferimentos, submetidos a aplicação preventiva e curativa do antagonista *Clonostachys rosea* e os respectivos tratamentos controle. Botucatu-SP, 2009.

Tratamentos	Frutos de mamona por genótipo							
	Cultivar AL Guarany				Híbrido Lyra			
CLP ⁶	1,8 ^{1*}	ab ²	A ³	(2,0 ⁴ ± 0,5 ⁵)	3,2 ^{1*}	c ²	A ³	(3,0 ⁴ ± 1,7 ⁵)
CLPFF	2,7	bc	A	(2,7 ± 0,8)	3,1	c	A	(3,0 ± 0,9)
CLC	3,7	c	A	(4,0 ± 1,2)	3,9	bc	A	(4,0 ± 1,5)
CLCFF	3,2	c	A	(3,7 ± 1,4)	3,5	c	A	(3,3 ± 1,0)
TI	4	c	A	(4,0 ± 0,5)	3,8	c	A	(4,0 ± 1,0)
TSI	1	a	A	(1,0 ± 0,0)	1	a	A	(1,0 ± 0,0)

¹Nota média da severidade da doença oriunda de avaliação de 15 frutos (repetições);

*Escala de notas: 1= ausência de sintomas no fruto; 2= menos de 50% de sintomas no fruto; 3= 50% de sintomas no fruto; 4= mais de 50% de sintomas no fruto e 5= fruto totalmente necrosado;

^{2,3}Porcentagens seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si ($p > 0,05$), segundo teste de comparações múltiplas de Dunn, da análise não-paramétrica do teste de Kruskal-Wallis;

⁴Mediana;

⁵Semi-amplitude interquartílica com os valores mínimo e máximo.

⁶Aplicação de *Clonostachys rosea* preventivamente (CLP); aplicação de *Clonostachys rosea* preventivamente no fruto com ferimento (CLPFF); aplicação de *Clonostachys rosea* curativamente (CLC); aplicação de *Clonostachys rosea* curativamente no fruto com ferimento (CLCFF); aplicação de *Amphobotrys ricini* na testemunha (TI); aplicação de apenas água destilada na testemunha (TSI).

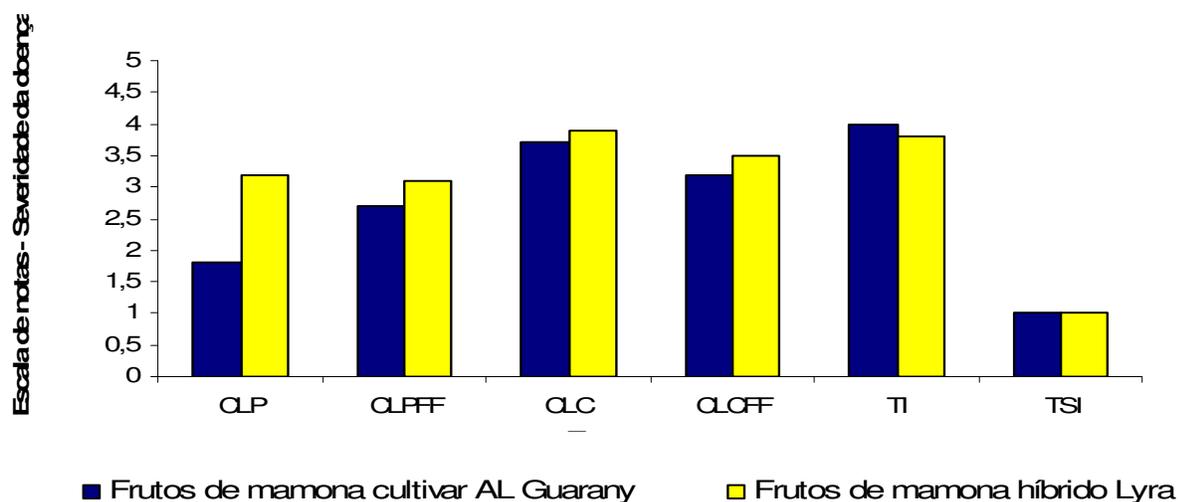


Figura 8. Severidade de *Amphobotrys ricini* em frutos destacados de mamoneira, com e sem ferimentos, e tratados com aplicação preventiva e curativa do antagonista *Clonostachys rosea*.

6.6 Controle de *Amphobotrys ricini* em mudas de mamoneira em ambiente protegido, por meio de aplicação de fungicidas, agente de C. biológico e com óleos essenciais.

Os genótipos de AL- Guarany e Lyra que receberam os fungicidas iprodione e procimidone não apresentaram folhas doentes, não diferindo da testemunha não inoculada (Tabela 8). Em relação aos óleos essenciais utilizados houve diferença no tratamento com o óleo de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) que apresentou na cultivar AL-Guarany valor médio de severidade de folhas doentes de 26,07% e no híbrido Lyra com 43,82%. Para o óleo de *Cymbopogon martini* (palmarosa), os resultados apresentados foram de 40,85% para a cultivar AL-Guarani e de 46,69% para o híbrido Lyra. Em relação aos tratamentos com fungos antagonistas, a aplicação de *C. rosea* e de *Trichoderma* sp, demonstrou melhores resultados de inibição doença quando comparado aos alternativos (óleos), apresentando severidade de 34,28 e 30,57% para o cultivar AL-Guarani e de 30,97 e 31,67% para o híbrido Lyra, respectivamente. O sintoma da doença característico nas folhas é o surgimento de uma necrose.

Tabela 8. Severidade da doença em folhas de dois genótipos de mamoneira, causada por *Amphobotrys ricini*, em relação a tratamentos com fungicidas, agentes de controle e óleos essenciais. Botucatu-SP, 2009.

Tratamentos	Genótipos	
	AL -Guarany	Lyra
	Folhas Doentes (%)	
<i>Trichoderma</i> sp.	30,57 A ab	31,67 A b
<i>Clonostachys rosea</i>	34,28 A ab	30,97 A b
Óleo de <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	26,07 B b	43,82 A ab
Óleo de <i>Cymbopogon martini</i>	40,85 A ab	46,69 A ab
Procimidone	0,00 A c	0,00 A c
Iprodione	0,00 A c	0,00 A c
Testemunha inoculada	45,48 A a	55,45 A a
Testemunha não inoculada	0,00 A c	0,00 A c
CV(%)	40,36	

Médias seguidas de letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de tukey.

Os resultados encontrados estão muito similares aos relatados na avaliação no campo em relação ao comportamento dos tratamentos aplicados cujos dados serão discutidos posteriormente. O que leva a concluir que apesar dos sintomas principais, aparecerem mais nitidamente quando a planta começa a emitir inflorescências e racemos, enquanto que os sintomas nas folhas, como a necrose aparecem e devem ser melhor estudados, pois poucos são os relatos de sintomas neste estágio de desenvolvimento da planta (Figura 9). Dessa maneira, essa metodologia de inoculação em plântulas torna-se uma alternativa viável, no que diz respeito ao ganho de tempo, na avaliação de genótipos que possam vir a apresentar alguma resistência para o mofo-cinzento ou mesmo servindo como ferramenta complementar na avaliação de genótipos. No trabalho desenvolvido por Lima & Soares (1990), as avaliações só foram realizadas quando os materiais encontravam-se numa fase de desenvolvimento mais avançada, se a avaliação em plântulas fosse realizada, a mesma poderia auxiliar na seleção dos materiais utilizados no plantio em campo, ou mesmo na complementação do trabalho, gerando mais dados.



Figura 9. Sintomas de necrose causados por *Amphobotrys ricini* em folhas de mamoneira. Botucatu-SP, 2009.

6.7 Elaboração de escala diagramática para avaliação de mofo-cinzento

No estudo conduzido, a severidade do mofo-cinzento, em mamoneira, apresentou valor máximo de 100%, ocorrendo em alguns casos quedas dos frutos. Em condições climáticas favoráveis pode-se observar perdas de até 100% da cultura com relação ao mofo-cinzento (ANJANI et al., 2002).

A proposta de estabelecer um sistema padronizado para orientar a avaliação da severidade de determinada doença é de grande responsabilidade, pois, caso o sistema seja deficiente, o custo de sua utilização pode ser maior do que os benefícios alcançados com seu uso (NUTTER JUNIOR e SCHULTZ, 1995; LEITE e AMORIM, 2002).

A padronização de avaliação da doença é altamente desejável, pois a uniformização da metodologia permite comparações entre os resultados obtidos em diferentes instituições e localidades (BERGAMIN FILHO e AMORIM, 1996). A escala diagramática proposta foi composta por seis níveis de severidade, a saber: 0; 8; 22; 43; 76 e 100% (Figura 10). Para o uso desta escala, recomenda-se observar mudanças de cultivares, nutrição, região e demais condições específicas de cada cultivo.

Na validação da escala diagramática, os avaliadores, nas condições descritas na metodologia, mostraram-se com boa acurácia, sendo que os valores estimados de severidade ficaram próximos aos valores da severidade real. (Figura 11.)

Com a adoção da escala proposta, a totalidade dos avaliadores apresentou boa acurácia ($R^2=0,94$), pois os valores de “a” não foram significativamente diferentes de zero (0) e os valores de “b” não foram significativamente diferentes de (1) (Tabela 9).

Tabela 9. Estimativas de intercepto (a), do coeficiente angular da reta (b) e do coeficiente de determinação (R^2) de equações de regressão linear simples, relacionando estimativas visuais de danos de racemos de mamoneira provocados por *Amphobotrys ricini* efetuadas por avaliadores, com e sem auxílio da escala diagramática. Botucatu-SP, 2009.

Avaliador	Sem escala			Com escala		
	a	b	R^2	a	b	R^2
1	8,49*	0,86	0,8	0,4	0,97	0,97
2	3,41*	0,88	0,79	0,21	0,95	0,92
3	-4,06*	0,94	0,81	-0,27	0,96	0,95
4	4,63*	0,84	0,79	2,28	0,92	0,92
Média	3,12	0,88	0,8	0,66	0,95	0,94

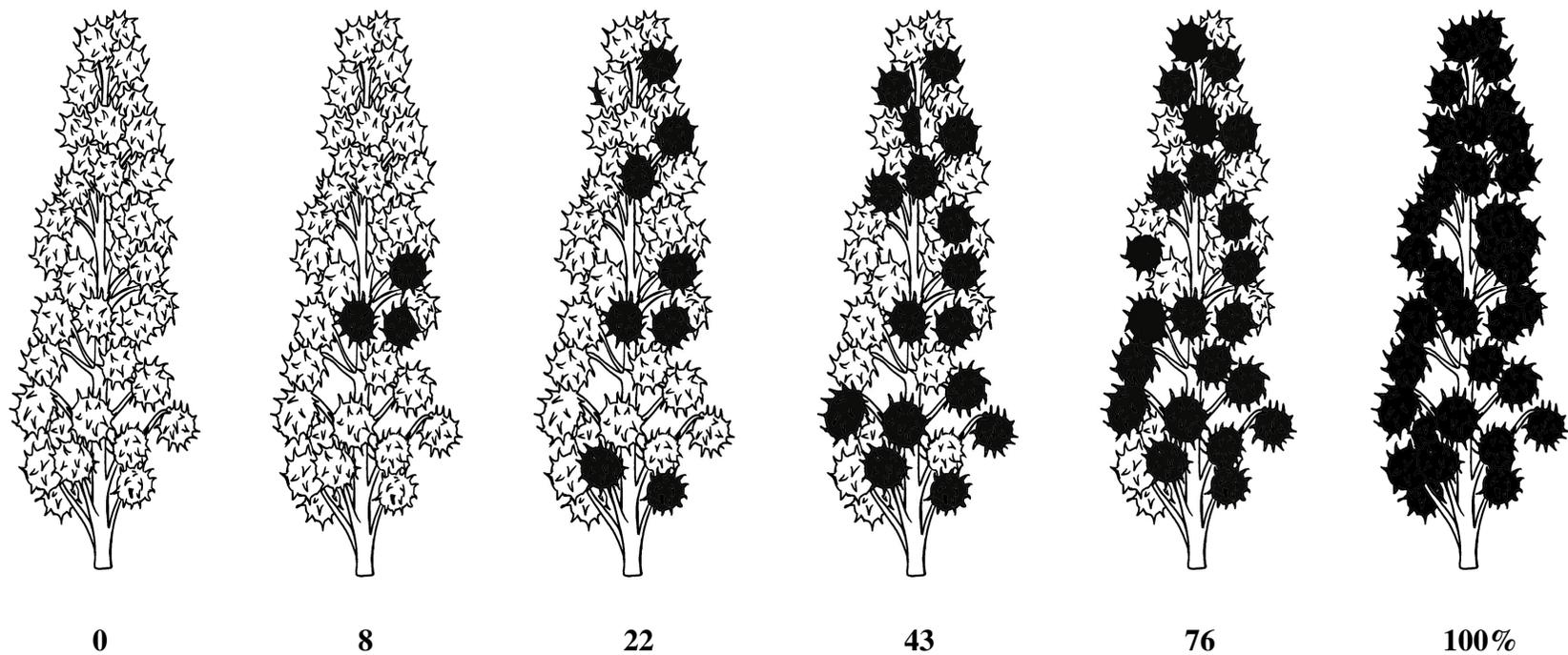
* Asterísco representa situações onde a hipótese de nulidade ($a=0$ ou $b=1$) foi rejeitada pelo teste t ($P \leq 0.01$).

A precisão é um importante fator a ser considerado na validação de uma escala diagramática, sendo definida como a exatidão de uma operação onde há rigor ou

refinamento na medida (BERGAMIN FILHO e AMORIM, 1996), e as estimativas visuais da severidade explicaram 92 a 97% da variação (R^2), com média de 94% entre os avaliadores após a adoção da escala diagramática, enquanto a média sem o uso da escala foi bem inferior com média de 80%.

Portanto, além das técnicas adotadas para o preparo da escala, o sucesso do seu uso, medido pela precisão e acurácia na estimativa da severidade da doença, irá depender do treinamento, experiência e da percepção individual de cada avaliador (AMORIM, 1995).

A avaliação do comportamento de doenças por meio de metodologia científica e a padronização dos métodos de avaliação de doenças proporcionam maior confiabilidade no monitoramento e auxiliam em futuros estudos sobre a doença.



(Ilustração: Rafael Antunes Chagas)

Figura 10. Escala diagramática para avaliação dos danos provocados por *Amphobotrys ricini* em racemos de mamoneira, indicando os níveis de 0, 8, 22, 43, 76 e 100% de danos.

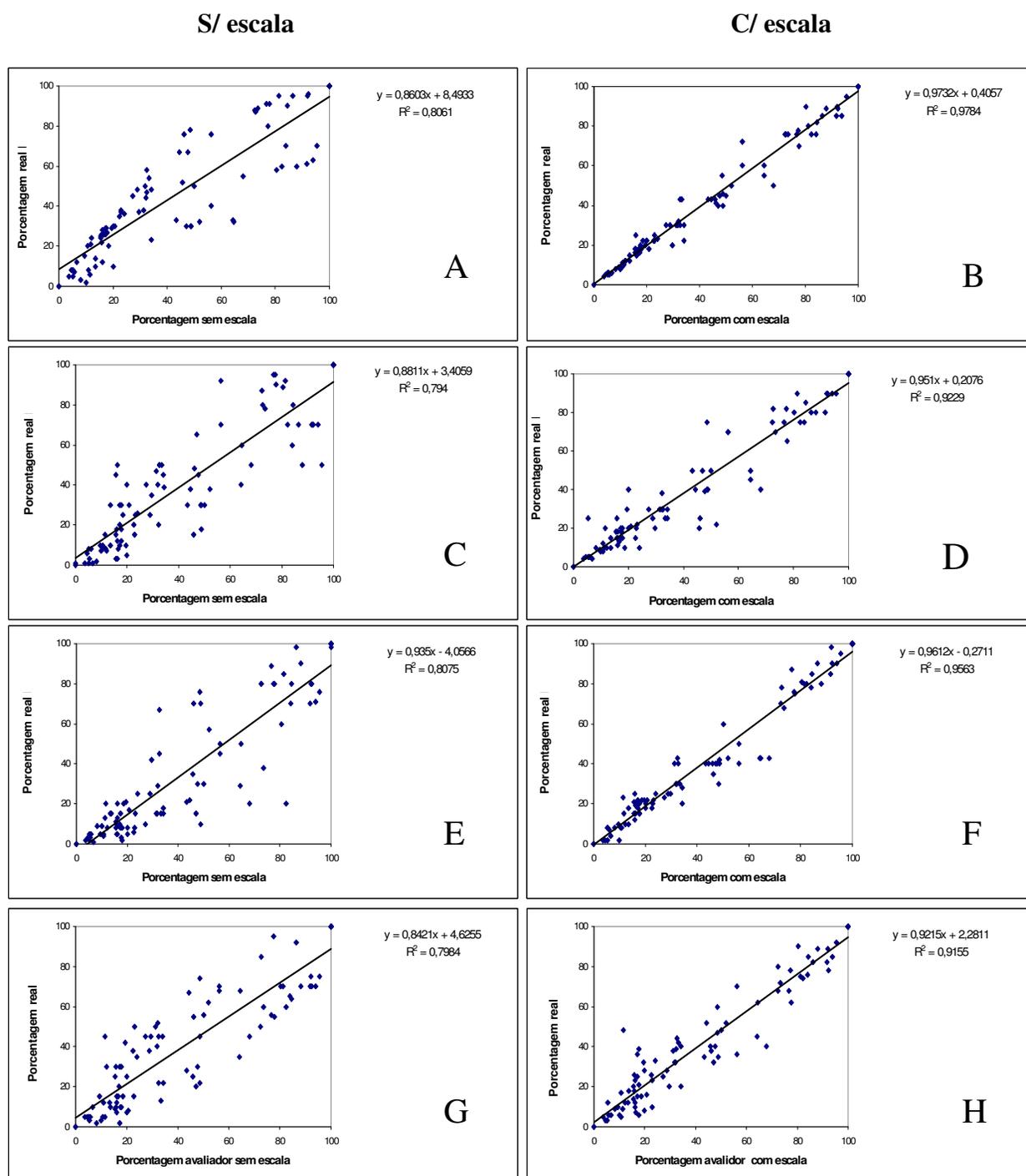


Figura 11. Severidade estimada com e sem o auxílio da escala diagramática (pontos) e linhas de regressão obtidas entre a severidade real e a estimada (linha cheia) para o mofo-cinza em racemos de mamoneira (*Ricinus communis* L). A-B avaliador 1 com e sem escala; C-D avaliador 2 com e sem escala; E-F avaliador 3 com e sem escala; G-H avaliador 4 com e sem escala.

6.8 Avaliação da severidade de *Amphobotrys ricini* a campo

Com base nos resultados obtidos nas avaliações *in vitro*, os dois melhores tratamentos com óleos essenciais foram utilizados no campo. Para os fungicidas, apesar dos resultados diferirem quanto aos melhores produtos devido ao fato de ter ocorrido resultados diferentes para as avaliações de crescimento micelial e germinação de esporos, optou-se por utilizar os fungicidas iprodione e procimidone, por estes já serem utilizados na cultura. Não houve diferenças significativas entre a cultivar AL Guarany e o híbrido Lyra, dessa maneira os materiais foram avaliados juntos.

As avaliações ocorreram durante 3 semanas (Tabela 10 e Figura 12), sendo que na primeira semana o melhor tratamento foi a pulverização de iprodione com severidade de 4,31%, que não diferiu estatisticamente da testemunha não inoculada (0,00%), seguido do tratamento procimidone (21,88%), a seqüência continuou com o óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* (67,91%), suspensão de esporos de *Clonostachys rosea* a 1×10^6 conídios/ml (71,56%), suspensão de *Trichoderma* sp (72,16 %), óleo de *Cymbopogon martini* (82,94%), testemunha inoculada (89,91%).

Tabela 10. Avaliação da severidade de mofo-cinzento em racemos de mamoneira durante 3 semanas, em função da aplicação de diferentes tratamentos. Botucatu-SP, 2009.

Tratamentos	Severidade da doença (%)		
	semana 1	semana 2	semana3
Testemunha inoculada	89,91 A a	98,13 A a	99,38 A a
Testemunha não inoculada	0,00 A d	0,00 A c	0,00 A c
Óleo essencial de palmarosa	82,94 B a	99,38 A a	99,68 A a
Óleo essencial de canela	67,91 B b	91,09 A a	94,06 A a
Suspensão de esporos <i>Clonostachys rosea</i>	71,56 A b	81,25 A a	88,22 A a
Suspensão de esporos de <i>Trichoderma</i> spp.	72,16 B b	92,34 A a	93,91 A a
iprodione	4,31 B d	12,81 B c	30,16 A c
procimidone	21,88 B c	60,16 A b	62,81 A b
CV(%)	39,72		

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

SINTOMAS DA DOENÇA

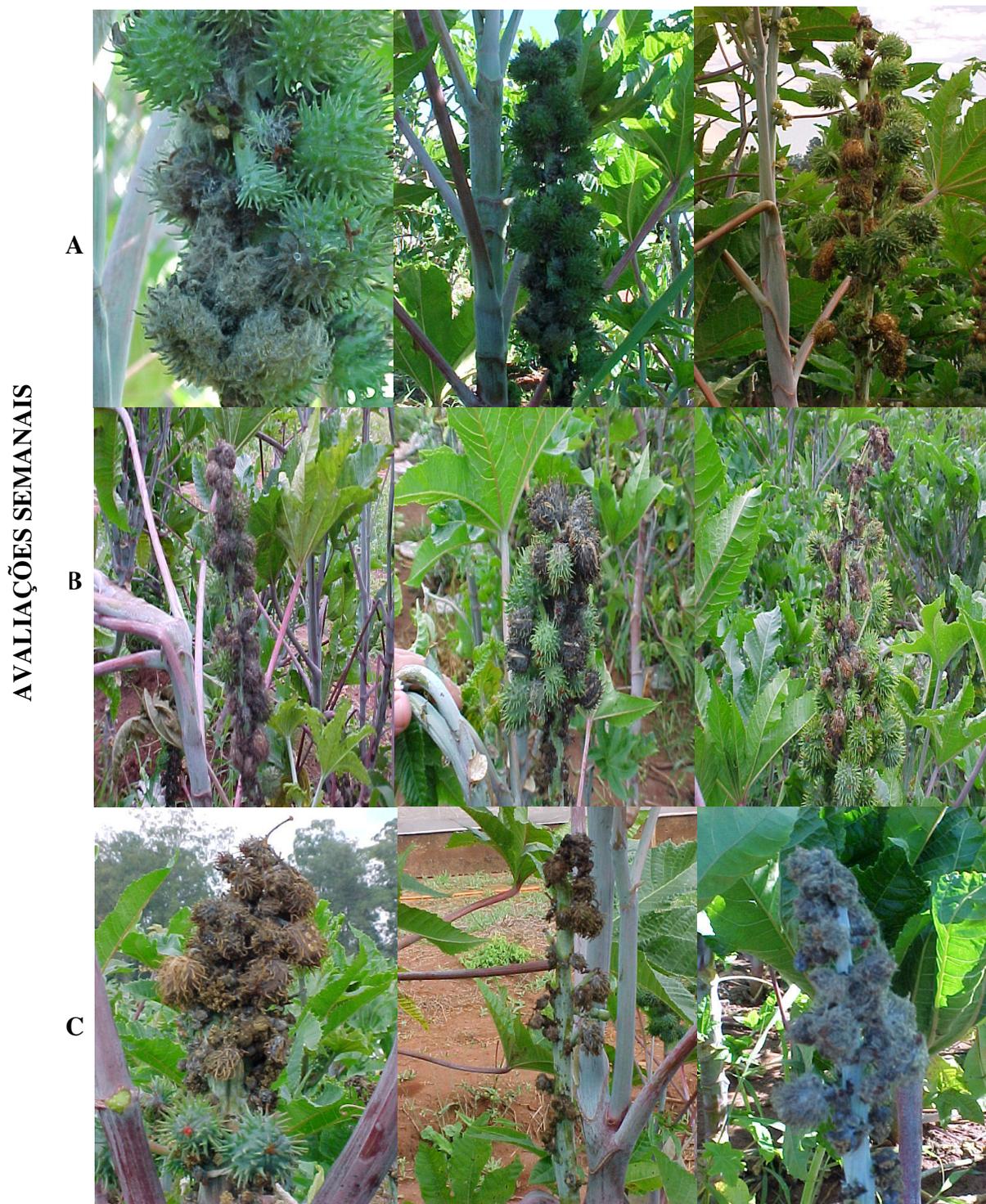


Figura 12. Sintomas de mofo cinzento em racemos de mamoneira. A- primeira semana de avaliação; B- segunda semana e C- terceira semana.

Na segunda semana a ordem da eficiência dos tratamentos quase não sofreu alteração, permanecendo o melhor tratamento a aplicação de iprodione (12,81%), que não diferiu estatisticamente da testemunha não inoculada, sendo seguida pelo tratamento de procimidone (60,16%). A alteração ocorreu em relação ao tratamento de óleo essencial de *Cinnamomun zeylanicum* que mostrou maior severidade (91,09%) quando comparado com os tratamentos de *Clonostachys rosea* e de *Trichoderma* sp., cujas severidades foram, respectivamente, de 81,25% e de 92,34%, mas não houve diferença significativa entre esses tratamentos.

Não houve alteração muito grande da severidade da doença em função dos tratamentos na terceira semana. O tratamento cuja aplicação foi Ipridione permaneceu como sendo o melhor com valor de 30,16%, não diferendo da testemunha não inoculada (0,00%), seguida novamente pelo tratamento de Procimidone (62,81%). Em relação aos demais tratamentos, os mesmos não mostraram diferenças significativas entre si, sendo os valores dos mesmos para *Cinnamomum zeylanicum* (94,06%), *Cymbopogon martini* com 99,68%, *Clonostachys rosea* 88,22% e 93,91% para *Trichoderma* sp..

A utilização de iprodione mostrou-se o melhor quando comparado com os demais tratamentos. Os resultados obtidos com o tratamento *C. rosea*, apesar dos resultados serem inferiores aos do melhor tratamento, - iprodione possivelmente pelo fato de tratar-se de um método biológico, e, também, devido ao número de aplicações realizadas de apenas 1 por semana foram animadores. Em testes para comparar a eficiência de *C. rosea* e do fungicida Captan na proteção das flores do morango - principal via de invasão do fruto pelo *B. cinerea*, o fungo (10^6 esporos/mL) suprimiu a incidência de *B. cinerea* em estames de 93% para 79% e em frutos de 76% para 48%, uma performance igual ou melhor que outros antagonistas e o fungicida. O antagonista *C. rosea* foi mais eficaz que Captan contra *B. cinerea* em frutos de 8 diferentes cultivares de morango. Os tratamentos foram aplicados aos vasos ao amanhecer e antes do anoitecer, baseados na conjectura que orvalho e escuro podem facilitar a sobrevivência e a atividade dos organismos de biocontrole (SUTTON et al., 1997). Dessa forma, pelo menos duas aplicações semanais de *C. rosea* poderiam ser realizadas, ou até mesmo o uso associado as aplicações com o fungicida iprodione ou outro fungicida.

No trabalho desenvolvido por Lima & Soares (1990), 15 cultivares de mamoneira foram avaliados quanto à resistência ao mofo-cinzeno. Uma das cultivares

avaliadas foi a Guarani, que apresentou índice de doença na primeira e segunda avaliação de 40,83 % e 48,38%, respectivamente, sendo considerado com resistência moderada ao *A. ricini*. Na avaliação da intensidade da doença em cinco cultivares de mamoneira (Guarany, AL Guarany 2002, Mirante 10, híbrido Lyra e híbrido 2), sob diferentes arranjos populacionais, foi observado que todas as cultivares comportaram-se como suscetíveis, com variação de incidência de frutos infectados de 25% (AL Guarany) a 48 % (Guarany), comprometendo, nas condições experimentais, a produtividade das cultivares avaliadas (FERNANDES et al., 2006). Resultados similares foram encontrados por Rego Filho (2007), onde a cultivar AL Guarany não diferiu estatisticamente do híbrido Lyra, apresentando incidência de mofo cinzento de 20,00% e 25,50%, respectivamente.

Vários são os fatores envolvidos nos resultados, do ponto de vista genético não podem ser esquecidas que genótipos cujas cápsulas possuem poucos acúleos são mais resistentes ao ataque do mofo cinzento, enquanto que aquelas com cápsulas com muitos acúleos comportaram-se como as mais suscetíveis ao patógeno o que foi comprovado por Lima & Soares (1990). As dificuldades encontradas na obtenção de linhagens de mamoneira com resistência a *A. ricini* podem ser devidas à produção de enzimas hidrolíticas, possivelmente enzimas pécticas e celulolíticas, que decompõem os tecidos dos frutos infectados (THOMAS; ORELLANA, 1963), bem como devido a maior quantidade de açúcares solúveis presente nas cápsulas de mamoneira suscetíveis (ORELLANA; THOMAS, 1962). Portanto, em estudos seguintes visando à obtenção de cultivares de mamoneira com certo nível de resistência a *A. ricini*, faz-se necessário investigar com maior detalhamento as características morfológicas, os teores de açúcares solúveis da planta e a produção de enzimas hidrolíticas por este patógeno.

Dessa maneira, vários são os fatores que devem ser levados em consideração no que diz respeito ao controle do mofo-cinzento da mamoneira, um trabalho conjunto visando métodos de controle tanto químicos, quanto alternativos e a busca por materiais com níveis de resistência genética aceitáveis.

7 CONCLUSÕES

Quanto à esporulação, o melhor meio para o patógeno *Amphobotrys ricini* foi o V8-20%, enquanto que para o antagonista *Clonostachys rosea* foi o TJ-5%;

O único meio que proporcionou abundante produção de escleródios de *A. ricini* foi o aveia-ágar;

Quanto a inibição do crescimento micelial de *A. ricini*, os melhores tratamentos com os óleos essenciais foram os com *C. martini* e *C. zeylanicum* em todas as concentrações testadas enquanto que com os fungicidas, em todas as concentrações testadas os melhores foram os ingredientes ativos tiofanato metílico, carbendazin, tebuconazole e iprodione;

Quanto a inibição da germinação dos conídios de *A. ricini*, os fungicidas clorotalonil e tebuconazole foram os melhores em todas as concentrações testadas, enquanto que os melhores óleos essenciais foram os a base de *C. martini* e *C. zeylanicum* em todas as concentrações testados;

A melhor aplicação do antagonista *Clonostachys rosea*, em frutos destacados de mamona da cultivar AL- Guarany e do híbrido Lyra, independentemente de haver ou não ferimentos, foi de maneira preventiva.

A escala diagramática desenvolvida para avaliar a severidade da doença em racemos de mamoneira foi validade, pois as estimativas (R^2) da severidade entre os avaliadores foram de 92 a 97%, com média de 94%.

Tanto nas aplicações em estufa quanto no campo, o tratamento com o fungicida iprodione (Rovral) foi o melhor quanto ao controle da doença quando comparados com os tratamentos biológico e alternativo (óleos essenciais).

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, C. L. M. **Controle de *Alternaria solani* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) com óleos essenciais**. Botucatu, 2006. 71f. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

ALBUQUERQUE, J. M. de Pe. **Plantas medicinais de uso popular**. Brasília, ABEAS/MEC, 1989. 96p.

ALEXOPOULOS, C.J., MIMS, C.W., BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**, Fourth ed. John Wiley and Sons, New York, USA. 1995.

AMORIM, L. Avaliação de doenças. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 647-671.

ANDREI, E. **Compêndio de defensivos agrícolas**: guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola. 6. ed. São Paulo: Organização Andrei, 1999. 672 p.

ANJANI, K. ; RAOOF, M. A.; REDDY, P.A.V.; RAO, C. H. Sources of resistance to major castor (*Ricinus communis* L.) diseases. **Bulletin de Ressources** n. 137, p. 46-48, 2002

BARD, M. et al. Geraniol interferes with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*. **Lipids**. Champaign, v. 23, p. 534-538. 1988.

BATISTA, F.A.S.; LIMA, E.F.; SOARES, J.J.; AZEVEDO, D.M.P. de. **Doenças e pragas da mamoneira (*Ricinus communis* L.) e seu controle**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 1996. 53p (Embrapa Algodão. Circular Técnica, 21).

BELTRÃO, N. E. M. et al. Fitologia. In: AZEVEDO, D. M. P. de. LIMA, E. F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa Algodão, 2001. cap. 2, p. 37-61.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1996. 299p.

BIZZETTO, A.; HOMECHIN, M.; SILVA, H.P. *Diploidia maydis e Gibberella zea: produção micelial e esporulação em substratos naturais e meios de cultura*. **Summa Phytopathologica**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 88-91. jan. 2000b.

BOLLEN, J.; FUCKS, A. On the specificity of the *in vitro* and *in vivo* antifungal activity of benomyl. **Netherland Journal of Plant Pathology**, v.76, p.299-313,1970.

BRENT, K J. **Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed**. FRAC Monograph No 1, GIFAP: Brussels, 1995. 48p.

BRENT, K. J.; HOLLOMON, D.W. **Fungicide resistance: The assessment of risk** FRAC Monograph No 2, Global Crop Protection Federation, Brussels, 1998. 48p.

CACCIONI, D. R. L.; GUIZZARDI, M. Inhibition of germination and growth of fruit and vegetable postharvest pathogenic fungi by essential oil components. **Journal of Essential Oil Reserch**. Camberra, v. 6, n. 2, p. 173-179, 1994.

CARVALHO, L. O. Mamona (*Ricinus communis* L.). In: SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Coordenadoria de Assistência Técnica Integral. **Manual técnico das culturas**. 2. ed. Campinas, 1997. cap. 11, p. 349-368.

CALDARI JÚNIOR, P. **Caracterização morfológica, esporulação e sensibilidade a fungicidas de isolados de Botrytis cinerea de flores e plantas ornamentais**. 1998. 51f. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Fitopatologia)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

CHIERICE, G.O.; CLARO NETO, S. Aplicação Industrial do óleo. AZEVEDO, D.M.P. de; LIMA, E.F. (Eds) **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p. 89-120.

CHOPRA, R. N. The nim (*Melia azadirachta* L. – Meliaceae). In: CHOPRA, R. N. **Indigenous drugs of India**. 2.ed. Nova Delhi: Academic Publishers, 1958. p.360-363.

DAVIDSE, L. C. Benzimidazole fungicides; mechanism of action and resistance. In: DELP, C.J. (ed) **Fungicide resistance in North America**. 2. ed. St. Paul: APS Press, 1994. cap. 3, p. 25-27.

DHINGRA, O.D. & SINCLAIR, J.B. **Basic Plant Pathology**. Methods. Florida. CRC Press. 1985.

EDINGTON, L.V.; KHEN, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, v.61, p.42-44, 1971.

FERNANDES, C. D.; PEREIRA, F.A.R.; SHIEEREN, B.R. Intensidade de doenças em cultivares de mamoneira cultivadas em diferentes arranjos populacionais. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 31, suplemento, p. 226, 2006 (Resumo).

FERREIRA, E.M., ALFENAS, A.C., MAFFIA, L.A. & MAFIA, R.G. Eficiência de fungicidas sistêmicos para o controle de *Cylindrocladium candelabrum* em eucalipto. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p.468-475, 2006.

FISHER, I. H. **Seleção de plantas resistentes e de fungicidas para o controle da “morte prematura” do maracujazeiro, causada por *Nectria haematococca* e *Phytophthora parasitica***. 2003. 48f. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Fitopatologia)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

FOKKEMA, N.J. Opportunities and problems of control of foliar pathogens with micro-organisms. **Pesticide Science**, v.37(4), p.411-416, 1993.

FORNAZIERI JUNIOR, A. **Mamona**: uma rica fonte de óleo e de divisas. São Paulo: Ícone, 1986. 72 p.

FUJINAMI, A., OZAKI, K., YAMAMOTO, S. Studies on biological activity of cyclic amide compounds. Part 1. Antimicrobial activity of 3-phenyloxazolidine-2,4-diones and related compounds. **Agric. Biol. Chem.**, v. 35, p.1707 – 1719, 1971.

GIBELLI, F. Projeto poiuretano de óleo de mamona e seus subprodutos. In: CÂMARA, G. M. S., CHIAVEGATO, E. J. (Coord.). **O agronegócio das plantas oleaginosas**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/ Departamento de Produção Vegetal, 2001. cap. 10, p. 181-184.

GODFREY, G.H. Gray mold of castor bean. **Journal of Agricultural Research**, v. 23, n. 9, p. 679-716, 1923.

HADDAD, F., MAFFIA, L.A. & MIZUBUTI, E.S.G. Avaliação de fungicidas para o controle de *Colletotrichum gloeosporioides* em cebola. **Fitopatologia Brasileira**. v. 28 p. 435-437, 2003.

HILL, P.; EVANS, C.S.; VENESS, R.G. Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 24, p. 269-275, 1997.

HISADA, Y.; KATO, T.; KAWASE, Y. Systemic movements in cucumber plants and control of cucumber gray mould by a new fungicide, S-7131. **Netherl. J. Plant Pathol**, v. 83, p. 71-78, 1977.

HORSFALL, J. G. Fungi and fungicides: The story of a nonconformist. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v.13, p. 1-14, 1975

JAMES, R.L.; DUMROESE, R.K.; WENNY, D.L. **Principles and potencial for biocontrol of diseases in forest and conservation nurseries**. In: Landis, T.D., technical coordinator. Proceedings, Western Forest Nursery Association, Fallen Leaf Lake, CA, September 14-18 1992. Disponível em <<http://www.fcnet.org/proceedings/1992/james.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2003.

KATARIA, H.R.; GROVER, R.K. Comparison of fungicides for the control of *Rhizoctonia solani* causing damping-off of mung bean (*Phaseolus aureus*). **Annual Applied Biology**, v. 88, p.257-263, 1978.

KIMATI, H. Doenças da mamoneira – *Ricinus communis* L. In: GALLI, F. (coord.) **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. v. 2, p. 347-351.

KIMURA, M.K. **Sensibilidade in vitro de *Botrytis cinerea* a fungicidas**. 1999. 132f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – UFLA, 1999.

KRUGNER, T.L.; BACCHI, L.M.A.A. Fungos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p.46-96.

LACROIX, L.; BIC, G.; BURGAUD, L.; GUILLOT, M.; LEBLANC, R.; RIOTTOT, R.; SAULI, M. Etude des proprietes antifongiques d'une nouvelle famille de derives de l'hydantoine et en particulier du 26019 R.P. **Phytiatrie-Phytopharmacie**, v. 23, p. 165-174, 1974.

LEITE, R. M. V. B. C.; AMORIM, L. Elaboração e validação de escala diagramática para mancha de *Alternaria* em girassol. **Summa Phytopathologica**, v. 28, n. 1, p. 14-19, 2002.

LI, G.Q.; HUANG, H.C.; KOKKO, E.G.; ACHARYA, S.N. Ultrastructural study of mycoparasitism of *Gliocladium roseum* on *Botrytis cinerea*. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 43, p. 211-218, 2002.

LIMA, E.F.; SOARES, J.J. Resistência de cultivares da mamoneira ao mofo cinzento causado por *Botrytis ricini* **Fitopatologia Brasileira**, v. 15(1), mar. 1990.

LIMA, E.F.; ARAÚJO, A.E.; BATISTA, F.A.S. Doenças e seu controle. In.: AZEVEDO, D.M.P. de; LIMA, E.F. (Eds) **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p. 191-212.

LORENZ, G. **Dicarboximide fungicides**: History of resistance development and monitoring methods. In: DELP, C.J. Fungicide resistance in North America 2. ed. St. Paul: APS Press, 1994. cap.4, p. 45-51.

MASSOLA JUNIOR, N. S. & BEDENDO, I. P. **Doenças da mamoneira**. In: KIMATI, H. ... [et al.]. **Manual de Fitopatologia**. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2: it. p. 445-447.

MCCALLEY, D.; TORRES-GRIFOL, J. F. Analysis of volatiles in good and bad conditions by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. **Analyst**, Washington, v. 117, p. 721-725, 1992.

MELO, I. S. de. Trichoderma e Gliocladium como Bioprotetores de plantas. In: **Revisão anual de patologia de plantas**. LUZ, W. C. (Ed.) Passo Fundo, RS, Gráfica Editora Pe. Berthier, 1996. 415 p.

MELO, I.S. Agentes microbianos no controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I.S. & AZEVEDO, J.L. (Eds.) **Controle Biológico**, v.1. Jaguariúna, SP: EMBRAPA, 1998. p.17-67.

MENTEN, J.OM.; MINUSSI, C.C.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophominia Phaseolina* (Tass.) Goid. "in vitro". **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 57-66, 1976.

MISHRA, N. et al. Antifungal efficacy of essential oil of *Cymbopogon martini* (lemon grass) against *Aspergillus*. **International Journal of Crude Drug Research**. Lisse, v. 26, n.2, p. 73-76, 1988.

MYCZKOWSKI, M. L. **Variabilidade genética para o teor de óleos entre progênes autofecundadas de mamona (*Ricinus communis* L.) da cultivar guarani**. 2003. 33 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

MONTES-BELMONT, R.; CARVAJAL, M. Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. **Journal of Food Protection**. Annes, v. 61, p. 616-619, 1998.

MOREIRA, M. R. et al. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT**. London, v. 38, p. 565-570, 2005.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. Londres: McMillan, 1979. 839 p.

NÓBREGA, M. B. M.; ANDRADE, F. P.; SANTOS J. W.; MILANI, M. LEITE, E.J. Germoplasma, In: AZEVEDO, D. M. P. de; LIMA, E. F. (Ed.) **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa Algodão, 2001. cap. 11., p. 257-281.

NORMAN, S.; CRAFT, C. C.; DAVIS, P. L. Volatiles from injured and uninjured Valencia oranges at different temperatures. **Journal Food Science**, Chicago, v. 32, p. 656-659, 1967.

NUTTER JUNIOR.; F. W.; SCHULTZ, P. M. Improving the accuracy and precision of disease assessments: selection of methods and use of computer-aided training programs. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 17, n. 1, p. 174-184, 1995.

OLIVEIRA, I. J. **Eficiência da seleção recorrente para redução da altura de plantas em mamoneira (*Ricinus communis* L.)** Botucatu, 2007. 43f. Dissertação (Mestrado em Agronomia /Agricultura)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

ORELLANA, R.G.; THOMAS, C.A. Nature of predisposition of castorbeans to *Botrytis*. I. Relation of leachable sugar and certain other biochemical constituents of the capsule to varietal susceptibility. **Phytopathology**, v. 52, p. 533-538, 1962.

PENG, G.; SUTTON, J.C.; KEVAN, P.G. Effectiveness of honey bees for applying the biocontrol agent *Gliocladium roseum* to strawberry flowers to suppress *Botrytis cinerea*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.14(2), p.114-129, 1992.

POMMER, E-H.; MANGOLD, D. Vinclozolin (BAS 352F) ein neuer Wirkstoff zur Bekämpfung von *Botrytis cinerea*. **Meded. Fak. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent**, v. 40, p. 713-722, 1975.

POMMER, E-H.; LORENZ, G. (1987) **Dicarboximide fungicides**. In: Modern Selective Fungicides. Ed H. Lyr, Gustav Fischer 1987, p.99-118.

PUNJA, Z.K.; UTKHEDE, R.S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, v.21(9), p.400-407, Sept. 2003.

QUEIROZ, F.M., BATISTA, U.G. & BROMMONSCHENKEL, S.H. Avaliação de meios de cultura no crescimento micelial e esporulação de *Alternaria brasiliensis*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 541-543. 2004.

RÊGO FILHO, L. M.; BEZERRA NETO, F. V.; SANTOS, Z. M. **Avaliação da incidência de mofo cinzento em genótipos de mamoneira no período outono-inverno em Campos dos**

GOYTACAZES – RJ. 4º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, gorduras e Biodiesel. Varginha – MG. p. 834-840 CD-ROM. 2007.

SAHOO, S.; DUTTA, P.K. Selection of high yielding palmarosa genotypes for the growth of palmarosa oil industries in the rural sector. **Indian Perfumer**. Kanpur, v. 26, n. 2-4, p. 41-45, 1982.

SALGADO, A.P.S.P.; CARDOSO, M.G.; SOUZA, P.E.; SOUZA, J.A.; ABREU, C.M.P.; PINTO, J.E.B.P. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de Eucalyptus sobre Fusarium oxysporum, Botrytis cinerea e Bipolaris sorokiniana. **Ciênc. Agrotéc.**, Lavras, v. 27, n.2, p. 249-254, 2003.

SANTOS, R. F.; BARROS, M. A. L.; MARQUES, F. M.; FIRMINO, P. de T.; REQUIÃO, L. E. G. Análise Econômica. In: AZEVEDO, D. M. P. de.; LIMA, E. F. (Ed). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. Cap. 1 p. 17-35.

SAVY FILHO, A.; BANZATTO, N. V.; BARBOZA, M. Z.; MIGUEL, A. M. R.; DAVI, L. O. de C.; RIBEIRO, F.M. Mamona. In: COORDENADORIA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA INTEGRAL. **Oleaginosas no estado de São Paulo: análise e diagnóstico**. Campinas, 1999. 39 p. (Cati). Documento Técnico, 107.

SAVY FILHO, A. Melhoramento da mamona. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Editora UFV, 1999. p. 383-407.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. da S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Revista Floresta**. Curitiba, PR. v. 30, nº 1 e 2, p. 129-137, 2000.

SCHROERS, H.J.; SAMUELS, G.J.; SEIFERT, K.A.; GAMS, W. Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *G. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. **Mycologia**, v. 91, p. 365-385, 1999.

SILVA, I. C. **Manejo Ecológico de pragas: resíduos, controle biológico e natural**. Disponível em: <<http://www.esam.br/gvaa/publicacao/gr11-05-01.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2003.

- SILVA, M. B. da; ROSA, M. B.; BRASILEIRO, B. G.; ALMEIDA, V.; SILVA, C. A. Desenvolvimento de produtos à base de extratos de plantas para o controle de doenças de plantas. In: VENEZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J. de; PALLINI, A. (Eds.). **Controle Alternativo de Pragas e Doenças**. Viçosa: EPAMIG/CTZM, 2005. p. 221-246.
- SIMÕES, C.M.O; SPITZER, V. **Óleos voláteis**. In: SIMÕES, C.M.O. et. al. Farmacognosia da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 1999. p. 387-416.
- SINGH, R. S.; PATHAK, M. G.; BODOLI, D. W. Response of Java citronella cultivars to nitrogen under Jorhat conditions. **Indian Perfumer**. Kampur, v. 24, n. 4, p. 192- 198, 1980.
- SINGH, H. B. et al. Cinnamon bark oil, a potent fungitoxicant against fungi causing respiratory tract mycoses. **Allergy**, Copenhagen, v.50 p. 995-999, 1995.
- SINGH, B.,; SHARMA, M.K.; MEGHWAL, P.R.; SAHU, P.M.; SINGH, S. 2003. Anti-inflammatory activity of shikonin derivatives from *Arnebia hispidissima*. **Phytomedicine** 10: 375–380
- SMITH, C.M. **Benzimidazole fungicides**. In: DELP, C.J. (ed) Fungicide Resistencia in North America. 2. ed. St. Paul: APS Press, 1994. cap.3, p. 23-44.
- SOUZA, S. M. C. et al. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras, v. 28, n. 3, p. 685-690, maio/jun., 2004.
- SURGEONER, G. **Pest Management Research – Plant Program**. University of Guelph – Presented to the Agricultural Research of Ontario, 162p., Oct. 1998.
- SUTTON, J.C.; LI, DE-WEI; PENG, G.; YU, H.; ZHANG, P.; VALDEBENITO SANHUEZA, R.M. *Gliocladium roseum*: a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. **Plant Disease**, Ontário, v. 81, p. 316-328, 1997.
- THOMAS, C.A.; ORELLANA, R.G. Biochemical tests indicative of reaction of castor bean to *Botrytis*. **Science**, v. 139, p. 334-335, 1963.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. **Óleo Essencial de Eucalipto**. Documentos florestais n. 17, Agosto de 2003.

WILSON, C.L. et al. Rapid evaluation of plant extratic and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, n. 2, p. 204-210. 1997.

9 APÊNDICE

Tabela 11. Composição química dos óleos essenciais utilizados no experimento. Botucatu-SP, 2009.

Espécie	Substâncias	(%)	Espécie	Substâncias	(%)
<i>Eucalyptus citriodora</i>	alfa-pipeno	0,45	<i>Melaleuca alternifolia</i>	alfa-pineno	2,32
	beta-pipeno	0,68		sabineno	0,41
	limoneno	0,33		beta-pineno	0,80
	1,8-cineol	1,51		mirceno	0,82
	isopulegol	5,18		delta-3-careno	0,34
	citronelal	74,74		alfa-terpineno	7,51
	isso-isopulegol	4,33		orto-cimeno	4,38
	citronelol	6,26		limoneno	1,69
	geraniol	2,96		1,8-cineol	5,25
	acetato de citronelila	1,24		gama-terpineno	18,16
	acetato de geranila	0,28		terpinoleno	2,84
	trans-cariofileno	0,72		4-terpinol	46,74
	Total	98,68		alfa-terpineol	3,43
<i>Cymbopogon martini</i>	trans-ocimeno	1,45	trans-cariofileno	0,37	
	geraniol	86,98	aromadendreno	1,00	
	geranial	0,41	alfa-selineno	1,27	
	acetato de geranila	9,03	gama-cadieno	0,99	
	trans-cariofileno	0,63	Total	98,32	
	Total	98,5	<i>Mentha piperita</i>	alfa-pineno	0,6
<i>Citrus limon</i>	triciclono	0,33		sabineno	0,38
	alfa-pineno	1,61		beta-pineno	1,12
	beta-pineno	1,75		mirceno	0,12
	mirceno	10,69		3-octanol	0,25
	gama-2-careno	1,98		ortho-cymeno	0,25
	para-cimeno	0,28		limoneno	1,79
	limoneno	72,49		1,8-cineol	7,03
	gama-terpineno	9,06		trans-beta-ocimeno	0,25
	terpinoleno	0,28		gama-terpineno	0,7
	neral	0,49		mentona	22,54
	geranial	0,89		meta-acetato cresol	6,39
	alfa-trans bergamoteno	0,36		neo-mentol	2,88
	Total	99,21	mentol	45,18	
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	alfa-pineno	1,24	n.d.	0,72	
	canfeno	0,4	isomentol	0,47	
	beta-pineno	0,47	pulegone	1,55	
	alfa-felandreno	1,32	acetato de mentil	5,97	
	orto-cimeno	1,11	trans-cariofileno	1,21	
	beta-felandreno	1,1	gama-muroleno	0,59	
	linalol	3,58	Total	98,19	
	alfa-terpineol	0,36	<i>Azadirachta indica</i>	Azadiractina	nd
	trans-cinamaldeído	0,77		neemola	nd
	safrol	1,25		marjosin	nd
	eugenol	73,45		acido palmítico	nd
	alfa-copaeno	0,75		ácido oléico	nd
	cis-cariofileno	4,67		acido ttradecoico	nd
cis-acetato de cinamila	2,11	ácido D		nd	
benzoato de benzila	2,92	nimbim		0,1	
Total	95,44	nimbinim		0,01	
		nimbidim		1,1	
		Total		1,21	

Fonte: Abreu (2006) e Chopra (1958);