

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

**“CARACTERIZAÇÃO DE *Amphobotrys ricini*, AGENTE CAUSAL DO  
MOFO-CINZENTO DA MAMONEIRA (*Ricinus communis* L.),  
AVALIAÇÃO DE GENÓTIPOS, CONTROLE QUÍMICO E  
ALTERNATIVO.”**

**HAROLDO ANTUNES CHAGAS**

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

BOTUCATU - SP

Outubro – 2012

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

**“CARACTERIZAÇÃO DE *Amphobotrys ricini*, AGENTE CAUSAL DO  
MOFO-CINZENTO DA MAMONEIRA (*Ricinus communis* L.),  
AVALIAÇÃO DE GENÓTIPOS, CONTROLE QUÍMICO E  
ALTERNATIVO.”**

**HAROLDO ANTUNES CHAGAS**

Orientador: Prof. Dr. Maurício Dutra Zanotto

Co-orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Furtado

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

BOTUCATU – SP

Outubro – 2012

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

C434c Chagas, Haroldo Antunes, 1976-  
Caracterização de *Amphobotrys ricini*, agente causal do mofo-cinza da mamoneira (*Ricinus communis* L.), avaliação de genótipos, controle químico e alternativo / Haroldo Antunes Chagas. - Botucatu : [s.n.], 2012  
xi, 98 f. : il. color., gráfs., tabs., fots.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2012

Orientador: Maurício Dutra Zanotto

Co-orientador: Edson Luiz Furtado

Inclui bibliografia

1. Euphorbiaceae. 2. Fungicidas. 3. Fungos fitopatogênicos. 4. Mamona. 5. Plantas oleaginosas.  
I. Zanotto, Maurício Dutra. II. Furtado, Edson Luiz.  
III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU  
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

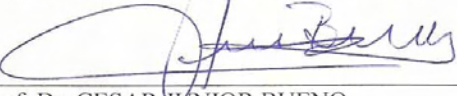
TÍTULO: "CARACTERIZAÇÃO DE *Amphobotrys ricini*, AGENTE CAUSAL DO MOFO-CINZENTO DA MAMONEIRA (*Ricinus communis* L.), AVALIAÇÃO DE GENÓTIPOS, CONTROLE QUÍMICO E ALTERNATIVO"

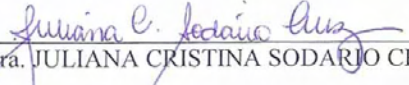
ALUNO: HAROLDO ANTUNES CHAGAS

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

Aprovado pela Comissão Examinadora

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. MAURICIO DUTRA ZANOTTO

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. CESAR JUNIOR BUENO

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. JULIANA CRISTINA SODARIO CRUZ

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. ADRIANA ZANIN KRONKA

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. IVAN HERMAN FISCHER

Data da Realização: 30 de outubro de 2012.

**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;*

**À minha querida sobrinha**

*Helena, você é um presente de Deus, que chegou para alegrar ainda mais a nossa família.*

*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 Agronômicas de Botucatu, pelo aprendizado;*

*Aos Professores Maurício Dutra Zanotto e Edson Luiz Furtado, pela amizade, paciência, ensinamentos e pela orientação durante o período de doutorado;*

*Aos amigos Willian Bucker Moraes, Renato Boreli, Ana Carolina Firmino, Cristiane Di Pieri, Diego Zied, Marília Pizzeta, Caroline Geraldi Pierozzi, Martha Maria Passador, Juliana Sodário, João Zago, Junia, Tatiana Mituti, Mônica, Tadeu e Juan pela amizade, convivência, pela força e estímulo que me deram durante essa fase da minha vida;*

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

*Ao senhor Milton Pereira Marques, pela ajuda na instalação dos experimentos 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;*

*A CAPES pela concessão da bolsa de estudos;*

*Aos pesquisadores Neslon Dias Suassuna, Angelo Aparecido Barbosa Sussel da Embrapa Algodão e Embrapa Cerrados e Rafael Galbieri do Instituto Matogrossense do Algodão (IMA-MT), por cederem os isolados de *Amphobotrys 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> ) e ( <i>Botrytis cinerea</i> ) .....	11
4.3 Caracterização morfológica, cultural e molecular de fungos.....	12
4.4 Controle químico .....	14
4.5 Extratos vegetais .....	16
4.6 Resistência de plantas a doenças fúngicas .....	18
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	21
5.1 Obtenção e manutenção de isolados de <i>Amphobotrys ricini</i> e <i>Botrytis cinerea</i> .....	21
5.2 Patogenicidade dos isolados.....	22
5.3 Microscopia eletrônica de varredura .....	24
5.4 Caracterização cultural .....	25
5.4.1 Avaliação do crescimento micelial dos isolados monospóricos de <i>Amphobotrys ricini</i> e de <i>Botrytis cinerea</i> , em diferentes temperaturas .....	25
5.4.2 Aspecto de colônia e formação de escleródios .....	25
5.5 Caracterização morfológica.....	26
5.5.1 Tamanho de conídios .....	26
5.5.2 Comprimento de conidióforos .....	26

5.6 Caracterização enzimática .....	27
5.6.1 Atividade celulolítica .....	27
5.6.2 Atividade lipolítica .....	27
5.6.3 Atividade proteolítica .....	28
5.6.4 Atividade pectinolítica .....	28
5.6.5 Análise de dados .....	29
5.7 Caracterização molecular dos isolados .....	29
5.8 Controle <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> do crescimento micelial de <i>Amphobotrys ricini</i> , utilizando diferentes fungicidas e extratos vegetais .....	30
5.8.1 Coleta do material vegetal .....	30
5.8.2 Preparo dos extratos .....	31
5.9 Avaliação de genótipos de mamoneira visando a resistência ao mofo – cinzento em duas localidades diferentes em condições de campo .....	35
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	36
6.1 Patogenicidade dos isolados .....	36
6.2 Microscopia eletrônica de varredura .....	40
6.3 Caracterização cultural .....	44
6.3.1 Avaliação do crescimento micelial dos isolados monospóricos de <i>Amphobotrys ricini</i> e de <i>Botrytis cinerea</i> , em diferentes temperaturas .....	44
6.3.2 Aspecto da colônia e formação de escleródios .....	47
6.4 Caracterização morfológica .....	52
6.4.1 Tamanho de conídios e conidióforos de <i>Amphobotrys ricini</i> e de <i>Botrytis cinerea</i> .....	52
6.4.2 Comprimento de conidióforos .....	55
6.5 Caracterização enzimática .....	58
6.6 Caracterização molecular dos isolados .....	62
6.7 Controle <i>in vitro</i> do crescimento micelial de <i>Amphobotrys ricini</i> utilizando diferentes	



fungicidas e controles alternativos.....	67
6.7.1 Controle <i>in vivo</i> do crescimento micelial de <i>Amphobotrys ricini</i> utilizando diferentes fungicidas e controles alternativos.....	74
6.8 Avaliação de genótipos de mamoneira visando a resistência ao mofo – cinzento em duas localidades diferentes.....	75
7. CONCLUSÃO.....	80
8. REFERÊNCIAS.....	82

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
1. Relação de isolados de <i>Amphobotrys ricini</i> e <i>Botrytis cinerea</i> utilizados nos ensaios de laboratório.....	23
2. Fungicidas testados quanto à eficiência <i>in vitro</i> no controle de <i>A. ricini</i> Botucatu-SP, 2012.....	32
3. Avaliação da severidade dos isolados de <i>A. ricini</i> e de <i>B. cinerea</i> inoculados em frutos destacados de mamoneira. Botucatu- SP, 2012. ....	38
4. Índice de velocidade média de crescimento (IVMC) de isolados de <i>A. ricini</i> e de <i>B. cinerea</i> em seis diferentes temperaturas. Botucatu-SP, 2012. ....	45
5. Características culturais dos isolados de <i>A. ricini</i> e de <i>B. cinerea</i> . Botucatu – SP, 2012. ....	49
6. Características culturais dos escleródios de <i>A. ricini</i> e de <i>B. cinerea</i> . Botucatu - SP, 2012. ....	51
7. Comprimento e largura dos escleródios dos isolados de <i>A. ricini</i> e de <i>B. cinerea</i> Botucatu-SP, 2012. ....	51
8. Diâmetros de conídios dos isolados de <i>A. ricini</i> . ....	54
9. Comprimento e largura dos conídios dos isolados de <i>B. cinerea</i> .....	54
10. Comprimentos do conidióforo de <i>A. ricini</i> e de <i>B. cinerea</i> . Botucatu-SP. 2012. ....	57
11. Enzimas extracelulares produzidas por isolados de <i>A. ricini</i> e de <i>B. cinerea</i> em meios específicos, em condições de ensaio <i>in vitro</i> . Botucatu-SP, 2012. ....	61
12. Isolados usados para montagem da árvore filogenética. ....	65
13. Porcentagem de inibição de crescimento micelial (PICs) de <i>A. ricini</i> (ISO-24) em diferentes concentrações de fungicidas. Botucatu-SP, 2012. ....	69
14. Dose efetiva mediana (ED <sub>50</sub> ) de vários fungicidas relativos à inibição de crescimento micelial de isolado de <i>A. ricini</i> (ISO 24), Botucatu-SP, 2012. ....	69
15. Crescimento micelial de <i>A. ricini</i> sob a ação de diferentes controles alternativos. Botucatu-SP, 2012. ....	72

16. Controle de doença causada <i>A. ricini</i> , em cachos de genótipo (BRS Energia) de mamoneira com fungicidas e produtos alternativos. Botucatu – SP, 2012. ....	75
17. Severidade de mofo-cinzento em racemos de mamoneira, em duas localidades diferentes. Botucatu-SP, 2012. ....	77

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
1. Frutos de mamoneira infectados com os fungos de <i>Amphobotrys ricini</i> (esquerda) e <i>Botrytis cinerea</i> (direita). .....	39
2. Microscopia eletrônica de varredura do isolado (ISO- 24) de <i>A. ricini</i> em diferentes períodos de colonização. A: 6h após a inoculação; B: 12h após inoculação [tubo germinativo (tg), conídio (c)] e C: 24h após a inoculação. ....	42
3. Microscopia eletrônica de varredura do isolado (ISO-34) <i>B. cinerea</i> em diferentes períodos de colonização. D: 6h após a inoculação; E : 12h após inoculação [tubo germinativo (tg) e apressório (ap)] e F: 24h após a inoculação. ....	43
4. Comportamento do crescimento micelial dos isolados 1, 24 e 29 de <i>A. ricini</i> nas temperaturas de 15, 20, 22, 25, 30 e 35° C de cima para baixo e da esquerda para a direita. ....	46
5. Curva de crescimento micelial da população de <i>A. ricini</i> , de mamoneira, em diferentes temperaturas. ....	46
6. Curva de crescimento micelial da pequena população de <i>B. cinerea</i> , de diferentes hospedeiros, em diferentes temperaturas. ....	47
7. Aparência da colônia quanto a cor e aspecto. <i>A. ricini</i> - A e B: branco acinzentado e cottonoso (frente); C e D: creme na borda e marrom avermelhado no centro (verso). <i>B. cinerea</i> - E: Cinza escuro e compacto (frente) e F: cinza escuro (verso). ....	50
8. Distribuição de escleródios de <i>A. ricini</i> na superfície da placas de petri em meio Batata Dextrose Ágar aos 25°C. A: toda a superfície da placa; B: disperso irregularmente e C: em torno do centro da placa. D: escleróidio de <i>A. ricini</i> (esquerda) e de <i>B. cinerea</i> (direita), E: escleróidio de <i>A. ricini</i> agrupado e F: escleróidio em close. ....	52
9. A: Conídios globosos de <i>A. ricini</i> . B: Conídios elipsoidais e globosos de <i>B. cinerea</i> . Barra = (50 µm). ....	55
10. A: Conidióforo de <i>A. ricini</i> . B: Conidióforo de <i>B. cinerea</i> . Barra = (50 µm). ....	58

11. Teste enzimático com formação de halo ao redor da área de crescimento micelial de isolados de *A. ricini* das enzimas celulase (A, B, C) e (D) testemunha; lipase (E, F, G) e testemunha (H); protease (I, J, K,) e testemunha (L); pectinase (M, N, O) e testemunha (P). ..... 62
12. Dendrograma gerado por “Neighborg-Joining” ilustrando a homologia nas sequências de nucleotídeos das regiões ITS1 e ITS2 de 13 isolados de *A. ricini*, causador do mofo cinzento da mamoneira e de dois isolados de *B. cinerea* (ISO-31 e ISO-34). ..... 66
13. Comportamento dos fungicidas: Tebuconazol (A); Trifloxistrobina + Tebuconazol (B); Piraclostrobina + Epoxiconazol (C); Iprodione (D); Difenconazol (E); Procloraz (F) e Propiconazol (G), na inibição do crescimento micelial de *A. ricini* nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000  $\mu\text{L/L}$  mais testemunha, de cima para baixo e da esquerda para a direita. .... 70
14. Efeito de diferentes métodos de controle alternativo na inibição do crescimento micelial de *A. ricini*. ..... 72
15. Comportamento de genótipos de *Ricinus communis* plantados no município de Botucatu – SP. A: genótipo 1 (343); B: genótipo 2 (319); C: genótipo 3 (360/2); D: genótipo 4 (360/1); E: genótipo 5 (IAC-80) e F: genótipo 6 (IAC-2028). ..... 78
16. Comportamento de genótipos de *Ricinus communis* plantados no município de São Manuel- SP. A: genótipo 1 (343); B: genótipo 2 (319); C: genótipo 3 (360/2); D: genótipo 4 (360/1); E: genótipo 5 (IAC-80) e F: genótipo 6 (IAC-2028). ..... 79

## 1 RESUMO

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é uma espécie oleaginosa tropical, cujo principal produto é o óleo extraído de suas sementes, sendo um dos mais versáteis da natureza e com muitas aplicações na indústria. Mesmo considerada uma planta rústica, a mamoneira está sujeita a doenças, dentre elas destacamos o mofo-cinzento, causada pelo fungo *Amphobotrys ricini*.

Apesar de não ter relato no Brasil, o mofo-cinzento causado, também, pelo fungo *Botrytis cinerea* em mamoneira já foi descrito na Coréia do Sul, podendo vir a ser um patógeno em potencial para a cultura no Brasil.

Até 1973, ambos os fungos pertenciam ao gênero *Botrytis*. Não é fácil distinguí-los em condições de campo.

Apesar da importância da doença para a cultura, poucos são os trabalhos envolvendo a caracterização morfo-cultural, enzimática e molecular de *A. ricini*, bem como ensaios de avaliações de genótipos para resistência a doença e métodos de controle químico e alternativo.

Considerado o patossistema *R. communis* versus *A. ricini*, o presente trabalho teve os seguintes objetivos: (a) avaliar a patogenicidade de isolados de *A. ricini* e de *B. cinerea* em frutos de mamoneira; (b) efetuar a caracterização morfo-culturais, enzimáticas e moleculares de isolados de *A. ricini* e de *B. cinerea*; (c) visualizar a colonização do *A. ricini* e do *B. cinerea* em frutos de mamoneira, utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura; (d) avaliar genótipos de mamoneira para resistência ao mofo-cinzento; (e) investigar princípios ativos de produtos químicos (fungicidas) e de produtos alternativos visando o controle *in vitro* e *in vivo* do fungo.

Todos os isolados foram patogênicos a frutos de *R. communis* L.

As características morfoculturais analisadas confirmaram que 29 isolados pertenceram a espécie *A. ricini* e dois a espécie *B. cinerea*.

Os isolados de *A. ricini* foram capazes de produzir *in vitro* as enzimas celulase, pectinase, lipase e protease, tendo se destacado a enzima pectinase e, provavelmente, estando ela relacionada a patogênese.

Os isolados de *B. cinerea* não produziram *in vitro* as enzimas celulase e lípase. As enzimas pectinase e protease foram produzidas por isolados por *B. cinerea* e, possivelmente, estão relacionadas a patogênese.

As análises de microscopia eletrônica de varredura mostraram diferenças morfológicas interessantes entre os isolados de *A. ricini* e *B. cinerea*, como a presença de apressório neste último.

A árvore filogenética com sequências das regiões ITS permitiu identificar 13 dos 29 isolados utilizados pertencentes a espécie *A. ricini* e os dois para a espécie *B. cinerea*.

Observou-se baixa variabilidade encontrada entre os isolados de *A. ricini* estudados, mesmo o de regiões distantes. Quando comparado com o isolado de *A. ricini* da China (nº 327422168), houve uma relação filogenética distante.

Os fungicidas pertencentes aos grupos químicos das estrobirulinas e triazóis apresentaram os melhores resultados em todas as concentrações testadas na inibição do crescimento micelial do fungo *A. ricini*. Quanto aos tratamentos alternativos, o extrato de *Momordica charantia* (ramos) e o produto comercial a base de extrato Pirolenhoso foram os que apresentaram os resultados mais satisfatórios.

No ensaio *in vivo*, os fungicidas a base de estrobirulinas e triazóis apresentaram resultados satisfatórios no controle da doença no campo.

Na avaliação dos genótipos no campo, os resultados mostraram que o material 360/1 foi o que apresentou os menores índices de severidade, nos municípios de Botucatu e São Manuel, com valores de 16,96% e 10,43% respectivamente.

Os resultados do presente trabalho elucidaram boa parte da etiologia de ambos os fungos na cultura e, ainda, apresentaram dados de controle alternativo de controle do fungo, em função da inexistência de material de mamoneira com bom nível de resistência a doença. O presente trabalho abre ainda espaço para facilitar a busca de genótipos resistentes ao fungo.

---

Palavra-chave: fungos fitopatogênicos, caracterização molecular, fungicidas, extratos vegetais, plantas oleaginosas, euphorbiaceae.

CHARACTERIZATION OF *Amphobotrys ricini*, CAUSAL AGENT OF GRAY MOLD OF CASTOR BEAN (*Ricinus communis* L.), GENOTYPE EVALUATION, CHEMICAL AND ALTERNATIVE CONTROL. Botucatu, 2012. 98p. Tese (Doutorado em Agronomia / Agricultura)- Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: Haroldo Antunes Chagas

Adviser: Maurício Dutra Zanotto

Co-adviser: Edson Luiz Furtado

## 2 SUMMARY

The tropical oilseed species castor bean (*Ricinus communis* L.) whose main extracted product is the oil its from seeds.

This is one of the most useful oil that comes from nature and there are many ways to be applied in industry. Even though it's considered a rustic plant, the castor beans trees are submitted diseases, among them gray-mold from fungus *Amphobotrys ricini* which is highlighted on this paper.

The gray mold disease caused by *Botrytis cinerea* fungus, has already related in South Korea may be a potential pathogen in Brazil crops. Until 1973, both fungi were *Botrytis* gender. Distinguish them on the field is an uneasy task. Despite of the disease be an important point, there are few papers involving the morpho-cultural characteristics, enzymatic and molecular *A. ricini* as well the evaluation test of genotypes to get resistance against disease and chemical control or alternative methods.

Considering the *R. communis* versus *A. ricini* pathosystem, this labor introduces the following objectives: a) evaluate the pathogenicity of isolates *A. ricini* and *B. cinerea* from castor beans fruit. b) getting the morpho-cultural characteristics, enzymatics and moleculars from *A. ricini* and *B. cinerea* isolates, c) visualizing the colonization *A. ricini* and *B. cinerea* in fruit using scanning electronic microscope d) evaluating castor beans plant genotypes against gray mold e) exploring active principles from chemical fungicides and alternative products in order to get fungus control *in vitro* and *in vivo*.



Every isolated became pathogenic fruit of *R. communis* L. Were confirmed 29 isolated that belonged to *A. ricini* and 2 to *B. cinerea* specie as morphocultural characteristics.

*A. ricini* isolated were able to produce cellulase enzymes, pectinase, lipase and protease, which pectinase enzyme was highlighted and most likely related to the pathogenesis. *B. cinerea* isolated didn't produce the cellulase and lipase enzymes in vitro. The pectinase and protease were produced by *B. cinerea* isolated and are possibly related to the pathogenesis.

Interesting differences between isolated *A. ricini* and *B. cinerea* were showed up by scanning electronic microscope analysis when occurred appressorium in the last one. The phylogenetically tree with sequences of regions ITS allowed that 13 of 29 isolated could be identified whose species belonged to *A. ricini* and 2 belonged to *B. cinerea*.

Low variability were found in *A. ricini* species even from distant places. When they were compared to *A. ricini* from China ( 327422168) there was a slightly phylogenetically relation.

Fungicides belonged to chemical groups of strobirulins and triazoles showed the best results of all concentrated test about inhibiting mycelial from *A. ricini* fungus. According to alternative treatments, the *Momordica charantia* (branches ) extract de the market products based on pyroligneous extract showed quite satisfying results. In vivo essay, fungicides based on strobirulins and triazoles showed satisfactory results over field disease. Genotypes evaluated on field, the results about 360/1 material was fewer indices of severity in Botucatu and São Manuel whose values were 16.96% and 10.43% respectively.

The results which etiology came from this labor, explained a high amount of both fungus in culture and introduces data about alternative fungus control however a good resistant material disease was nonexistent. Meanwhile this labor is an opened space to further researches to find resistant fungus genotypes.

---

Keyword: phytopathogenic fungi, molecular characterization, fungicides, plant extracts, oilseeds plants, euphorbiaceae.

### 3. INTRODUÇÃO

A cultura da mamoneira (*Ricinus communis* L.) se apresenta como uma alternativa de importância econômica e social para o Brasil, especificamente no estado de São Paulo, cuja produção é de aproximadamente mil toneladas de mamona em baga. Essa quantidade é insuficiente para abastecer as indústrias instaladas. A capacidade de moagem das empresas no estado encontra-se na faixa de 120 a 150 mil toneladas anuais. Denota-se, portanto, uma oportunidade de negócio para os produtores de regiões propícias ao desenvolvimento da cultura, principalmente dentro do estado de São Paulo (KHIL, 2006).

Também conhecida como carrapateira ou rícino, é uma espécie de origem tropical que vegeta naturalmente desde a longitude 40° Norte até 40° Sul. O óleo extraído de suas sementes é um dos mais versáteis da natureza, com inúmeras aplicações industriais (CHIERICE; CLARO NETO, 2001).

Segundo Savy Filho et al. (1999), durante décadas o Brasil ocupou o posto de maior produtor de mamona em baga e maior exportador de óleo de mamona do mundo, responsável por cerca de 30 a 45% da produção mundial até a década de 70. No entanto, o Brasil perdeu a hegemonia para países como a Índia e China, principalmente em função do alto custo da colheita manual.

A elevada viscosidade e estabilidade do óleo 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).

Beltrão e Lima (2007) relatam que o biodiesel, combustível obtido a partir do óleo de mamona, é outro subproduto muito importante para economia do país, além de ser de origem vegetal e renovável, pode contribuir para a diminuição da importação de petróleo.

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

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

Apesar de no Brasil não terem sido descritos relatos de mofo- cinzento causado por *Botrytis cinerea*, este patógeno apresenta alto potencial de dano, pois é amplamente distribuído no mundo, infectando mais de 200 gêneros diferentes de plantas (JARVIS, 1977), ampla distribuição geográfica e potencial para epidemias severas e rápidas, tornando-o um dos patógenos mais importantes mundialmente. Essas afirmações são reforçadas pelo trabalho desenvolvido por Hong et al. (2001), onde foi constatada a presença tanto de *A. ricini* quanto *B. cinerea* em plantas de mamoneira, sendo apenas possível diferencia-los através de caracterizações morfológicas e culturais.

O Departamento de Agricultura da Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Campus de Botucatu -SP (FCA-UNESP), realiza melhoramento

genético com a cultura da mamoneira. Há genótipos que apresentam características com grande potencial agrônomo e econômico (porte anão, pecíolos curtos, ciclo curto e maior teor de óleo). Essas características são importantes quando se visa o aumento de produção, pelo simples fato do aumento do estande, sem mencionar o valor agregado obtido pelo óleo, seja para produção de tintas, vernizes, etc, bem como para a produção de biodiesel.

No entanto, esses genótipos da FCA-UNESP não recebem pesquisas na área de fitopatologia e, portanto, os mesmos devem ser estudados quanto à sua resistência ao mofo-cinzeno e combinação destes materiais com outras medidas de controle visando o manejo integrado da doença. Para se chegar ao citado, torna-se necessário, “a priori”, conhecer alguns atributos inerentes ao patógeno, como a sua etiologia, ciclo de vida completo, patogênese, características fisiológicas, correta identificação e etc, para que as pesquisas possam depois serem direcionadas para a implementação de técnicas de manejo da doença, seja com o uso de fungicidas (BEZERRA, 2007), extratos vegetais e até plantio de materiais com resistência ou moderada resistência ao patógeno. Apesar da ampla distribuição do patógeno no país, há poucas informações a seu respeito.

Dessa maneira, o presente trabalho teve como objetivo geral realizar vários estudos visando a compreender melhor a interação que ocorre no patossistema *A. ricini* – *R. communis*. Para isso, os seguintes objetivos específicos foram investigados:

- Patogenicidade de isolados de *A. ricini* e de *B. cinerea* em frutos destacados de mamona em bandejas;
- Caracterização morfológica, cultural, molecular e enzimática dos isolados de *A. ricini* e de *B. cinerea*;
- Visualização da colonização do *A. ricini* e do *B. cinerea* em frutos de mamoneira, utilizando microscopia eletrônica de varredura;
- Efeito de extratos vegetais e fungicidas sobre *A. ricini* em ensaios *in vitro* e em *in vivo* – estufa;
- Avaliação de genótipos de mamoneira visando detectar nível de resistência ao mofo cinzeno (*A. ricini*), em duas localidades diferentes.

## 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 Mamoneira (*Ricinus communis* L.)

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é uma planta pertencente a família Euphorbiaceae, sendo a única do gênero *Ricinus*. Possivelmente, ela seja originária da Abissínia no continente Africano (BELTRÃO; LIMA, 2007). É uma espécie preferencialmente autógama, mas pode apresentar alta taxa de cruzamentos, podendo chegar a 40% (BELTRÃO et al., 2001).

Apresenta as seguintes características: quanto ao porte da planta, na maioria das vezes apresenta-se como um arbusto, podendo atingir a altura de uma árvore, chegando até 10 metros. Caule cilíndrico, grosso, com diâmetro em torno de 30 centímetros, brilhante e tenro quando a planta é jovem, tornando-se lenhoso e a cor variando do verde, arroxeada e até vermelha (PRATA, 1969 ; RODRIGUES et al., 2002).

O fruto é uma cápsula que pode ser lisa ou com estruturas semelhantes a espinhos, podendo ser deiscente, quando o fruto sofre abscisão, e as sementes são arremessadas ao solo antes mesmo da colheita ou indeiscente, quando os frutos só se abrem por beneficiamento mecânico, com cor verde ou vermelha, e colorações intermediárias. De acordo com Mazzani (1983), a variabilidade dos frutos ocorre na cor,

cerosidade, forma, tamanho, deiscência, caducidade e presença ou ausência de papilas (acúleos) vulgarmente chamados de espinhos.

Segundo Ribeiro Filho (1966), as folhas são simples, grandes, do tipo digitolobadas, denticuladas e com pecíolos longos. A mamoneira apresenta inflorescência do tipo panicular, denominada de racemo, com flores femininas acima e masculinas na parte inferior (que possuem estames ramificados de cor amarela).

O óleo da mamona é o produto mais importante explorado comercialmente. Apresenta um amplo uso industrial, embora impróprio para o consumo humano. Devido às características únicas, tais como elevada viscosidade e estabilidade a altas temperaturas, o ácido graxo ricinoléico obtido da semente da mamona proporciona alta capacidade de reações químicas, dessa maneira o óleo de mamona possui diversas aplicações: fabricação de tintas e vernizes, detergentes, náilons, resinas de plástico, lubrificantes, inseticidas, aditivos para combustíveis, bactericidas, fungicidas, produtos sintéticos, fluídos especiais para transmitir pressões hidráulicas, próteses humanas para coluna vertebral, crânio, mandíbulas, 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. Com o advento do Programa Nacional de Biodiesel, autorizando a adição de 2% de biodiesel (B2) ao diesel em 2005, diversos estados do Nordeste tiveram grande incentivo do governo federal para a expansão da produção de mamona, embasada principalmente na agricultura familiar (SAVY FILHO, 2005).

A torta de mamona tem sido utilizada como adubo orgânico em várias culturas, tais como café, cana-de-açúcar, hortaliças, citrus, frutíferas e por apresentar efeito nematicida (SAVY FILHO et al., 1999), podendo ser utilizada para alimentação animal (SANTOS et al., 2001).

O Brasil foi o maior produtor mundial de mamona em grão e maior exportador de óleo durante décadas, mas na década de 80 esse cenário sofreu alterações, quando países como Índia e a China ultrapassaram o Brasil (SAVY FILHO et al., 1997). Durante o período de 1978 e 2004, Índia, China e Brasil mantiveram-se respectivamente na

primeira, segunda e terceira posição como os maiores produtores de mamona do mundo (AZEVEDO e BELTRÃO, 2007).

Quanto aos aspectos climáticos, a cultura 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 MYCZKOWSKI, 2003). Já Tavora (1982) relata que a precipitação situa-se na faixa de 750 mm e 1.500 mm, com um mínimo de 600 mm a 750 mm durante o ciclo cultural; de preferência, a época de plantio deve ser ajustada para que a planta receba de 400 mm a 500 mm até o início da floração.

De acordo com Oliveira (2007), 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.

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 é 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).

Devido à crescente expansão e ao valor agregado da sua principal matéria prima, a cultura da mamona apresenta um importante valor econômico, social e ambiental (BELTRÃO et al., 2001; LARA, 2010).

Vários estados realizam programas de melhoramento para a cultura da mamoneira, como São Paulo, Bahia e Paraíba. Dentro dos vários objetivos buscados pelos programas, destacam-se: uniformidade, porte baixo da planta, indeiscência do fruto no campo, sementes de tamanho médio, com alto teor de óleo e resistência às principais doenças

(*Fusarium oxysporum* f. sp. *ricini*, *Alternaria ricini*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *ricini*, *Macrophomina phaseolina* e *Amphobotrys ricini*) (SAVY FILHO, 1999).

O mofo-cinzento causado pelo fungo *Amphobotrys ricini*, destaca-se atualmente como a principal doença da cultura da mamoneira, causando problemas em quase todas as regiões produtoras. O uso de cultivares resistentes tem sido recomendada por vários autores (KIMATI, 1980; DRUMMOND; COELHO, 1981). Infelizmente são poucas as informações sobre o comportamento das cultivares de mamoneira à infecção por *A. ricini*, sendo necessários mais trabalhos para avaliar genótipos promissores quanto a resistência a doença.

#### 4.2 Mofo-cinzento (*A. ricini*) e (*B. cinerea*)

A doença é causada pelo fungo mitosporico *A. ricini* (Buchw.) Hennebert (sin. *Botrytis ricini* Godfrey), sendo popularmente conhecida como mofo-cinzento, cuja forma perfeita corresponde a *Botryotinia ricini* (Godfrey) Wetzell, ainda não relatada no Brasil. De acordo com Alexopoulos et al. (1995), o patógeno pertence à divisão Ascomycota, ordem Helotiales e família Sclerotiniaceae.

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

Períodos de alta umidade relativa e temperaturas em torno de 25°C são condições climáticas favoráveis ao progresso do mofo-cinzento da mamoneira. A doença é dependente dessas condições, pois são responsáveis pela capacidade destrutiva do mofo-cinzento em regiões onde o período de floração e frutificação da mamoneira coincide com esses períodos. Essas condições estimulam a abundante esporulação do fungo na superfície dos tecidos afetados, o que confere à área lesionada um aspecto pulverulento de coloração cinza escuro (GODFREY, 1923; MASSOLA JR.; BEDENDO, 2005).

Segundo Batista et al. (1996), 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. Os primeiros sintomas são pequenas manchas de tonalidade azulada nas inflorescências e frutos em desenvolvimento (GODFREY, 1923).

*Botrytis cinerea* Pers. Ex. Fr. é um fungo mitospórico, sendo anamorfo de *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (PEARSON; GOHEEN, 1988), mas nesta fase o teleomorfo raramente é observado no campo (FARETRA et al., 1988). Pertencente ao filo ascomicota, da ordem Heliales e família Sclerotiniaceae, do gênero *Botryotinia* (ELLIOT, 1964).

É um importante patógeno de frutos armazenados e transportados, como por exemplo legumes, plantas ornamentais e viveiros, ocorrendo sempre que suas culturas hospedeiras são cultivadas, abrangendo desde zonas temperadas frias para áreas subtropicais (JARVIS, 1977).

Apesar dos sintomas do mofo cinzento variarem em função do hospedeiro e do órgão afetado, esses são quase sempre caracterizados pela descoloração dos tecidos, aspecto úmido e necrótico das lesões e presença de um crescimento cottonoso acinzentado (conídios e conidióforos) sobre as áreas afetadas (TÖFOLI et al., 2011).

A grande variação genética e morfológica, encontrada entre as populações de *B. cinerea* acredita-se ser causada por mutações frequentes e aneuploidia (BUTTNER et al, 1994,. BARALDI et al, 2002) e heterocariose (BACKHOUSE et al, 1984.).

Os conídios são unicelulares apresentando dimensões de 7-10µm de largura x 9 -14 µm de comprimento (HANCOCK; LORBERR, 1963), 6-9 µm x 9-17 µm (MORGAN, 1971), 11,22µm de comprimento e 6,75 µm de largura, hialinos ou quase hialinos. Podendo ser elipsóides a ovóides ou globosos, quanto a forma (CALDARI JUNIOR, 1998). Temperaturas em torno de 15° a 20° C e umidade relativa de 95%, são favoráveis a germinação dos conídios (PEARSON; GOHEEN, 1988).

### **4.3 Caracterização morfológica, cultural e molecular de fungos**

Para o desenvolvimento de estudos sobre o patógeno é fundamental o conhecimento de características morfológicas de colônias, micélio e conídios, bem como fisiológicas, como composição química dos meios de cultura que determina a eficiência da esporulação e crescimento micelial dos fitopatógenos (DHINGRA; SINCLAIR, 1995).

As análises da variabilidade genética de fungos envolvem as técnicas clássicas ou moleculares. Os fenótipos podem ser avaliados pelas técnicas clássicas, e características bioquímicas. Para a determinação de indivíduos dentro de espécies, as técnicas moleculares são mais indicadas, pois permitem a análise ao nível do DNA (ROSEWICH; MCDONALD, 1994).

Dessa maneira, vem sendo amplamente utilizadas técnicas moleculares pela análise dos ácidos nucléicos, conseguindo diferir os indivíduos e esclarecer a filogenia dos organismos estudados. Na maioria das vezes, as análises moleculares complementam os estudos morfológicos, mas algumas vezes ocorrem conflitos com os resultados obtidos da análise de DNA. Essa contradição pode ser observada principalmente na classificação taxonômica de microrganismos (SAMUELS; SEIFERT, 1995)

A diversidade dos fungos nem sempre é refletida por meio das características morfológicas e bioquímicas, pois a variabilidade existente é enorme (FEGAN et al., 1993).

Torna-se mais fácil e confiável a taxonomia destes organismos em alguns casos com o uso de análise de DNA, pois permite que a variabilidade seja interpretada de forma correta (KHACHATOURIANS, 1986).

Trabalhos como o de Zhang et al. (1998) distinguiram cinco taxóons de *Phomopsis* isolados de soja utilizando sequências das regiões ITS do DNA ribossomal, porém não foram capazes de diferenciá-los com base nas características morfológicas. Em 2002 Farr, Castlebury e Rossman, utilizando sequências das regiões ITS1 e ITS2 do gene 5,8S e por características morfológicas, caracterizaram linhagens de *Phomopsis* sp. isoladas de *Vaccinium corymbosum* e *V. macrocarpon*, verificando que a maioria dos isolados tratava-se de *Phomopsis vaccinii*, pois houve agrupamento com uma cultura referência dessa espécie.

Bezerra (2007), trabalhando com duas subpopulações de *A. ricini* da Paraíba, encontrou baixa variabilidade entre elas, utilizando marcadores do tipo RAPD. Muitas são as técnicas utilizadas para identificação molecular de fungos e detectar, variabilidade entre isolados de mesma espécie fúngica, entre as quais destacam-se:

RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”) (WHELISH; MCCLELLAND, 1990), AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”) (VOS et al., 1995), RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”) (REIS, 2009), (análise do DNA

ribossômico muitas vezes através de sequências das regiões ITS (“Internal Transcribed Spacer”) (HILLIS; DIXON, 1991), análise do polimorfismo do DNA telomérico, e, ainda, a análise de outras sequências como o gene do fator de alongação, genes da actina, beta-tubulina e dentre outros. Dessa forma, estas técnicas de biologia molecular para o estudo de fungos permitem obter uma quantidade quase ilimitada de marcadores moleculares (STRINGARI, 2009).

A técnica de PCR (“Polymerase Chain Reaction”), desenvolvida por Kary Mullis na década de 80, destaca-se entre todas as técnicas desenvolvidas para a análise de DNA e RNA pelo alto impacto que causou. Assim, tornou-se possível a produção de múltiplas cópias de sequências específicas de DNA (ALBERTS et al., 2004).

Para o melhor entendimento dos aspectos evolutivos dos patógenos, o DNA ribossômico (rDNA) vem sendo muito utilizado para estudos de identificação de organismos. Para isso, através da técnica de PCR, o rDNA é amplificado, pois consiste de regiões no genoma conservadas e separados por regiões variáveis de acordo com White et al. (1990).

A evolução lenta das sequências codificantes do rDNA e sua alta conservação, acabam promovendo sua utilização em estudos com organismos pouco relacionados taxonomicamente. Em contrapartida, ocorre a evolução mais rápida das regiões ITS dos genes, pois apresentam alto grau de polimorfismo, contribuindo nos estudos filogenéticos em níveis taxonômicos mais baixos como gênero e espécies. Dessa maneira, a classificação taxonômica de várias espécies tem sido beneficiada pela utilização de sequências ITS na identificação de fungos fitopatogênicos, como mais uma fonte de informação (BAAYEN et al., 2002; BONANTS et al., 2003; PANDEY; REDDY; SURYANARAYANAN, 2003; RODRIGUES et al., 2004; STRINGARI et al., 2004).

#### **4.4 Controle químico**

Com o intuito de obter sempre altas produtividades e qualidade de produção, a única medida que mostra-se eficiente é o controle químico das doenças, características estas tão almeçadas pela agricultura moderna. São utilizados vários tipos de produtos, comumente denominados agroquímicos, incluindo fertilizantes e pesticidas. O grupo

mais importante de pesticidas utilizados para o controle de doenças de plantas é dos fungicidas (KIMATI, 1995).

A facilidade de aplicação e os resultados imediatos obtidos os tornaram amplamente difundidos em diversas culturas. Por isso representa um dos principais métodos de controle de doenças em plantas. Um dos principais problemas com o uso indiscriminado dos fungicidas é a seleção de fungos fitopatogênicos resistentes aos mesmos (GHINI; KIMATI, 2002).

Devido a possuírem propriedades químicas e variáveis, os fungicidas podem envolver vários tipos de controle em função da natureza do produto, da época e metodologia de aplicação e dos estádios de desenvolvimento epidemiológico da doença (KIMATI, 1995)

A Embrapa Clima Temperado realizou teste preliminares em condições de laboratório com fungicidas cujos princípios ativos são recomendados para o controle de *B. cinerea* em outras plantas cultivadas, podendo ser usados, também, no controle do mofo cinzento causado por *A. ricini*. Dentre os fungicidas testados e que apresentaram resultados satisfatórios estão o clorotalonil, mancozeb, iprodione (fungicidas de contato) e tebuconazol, tiofanato metílico e procimidone (fungicidas sistêmicos) (EMBRAPA, 2007).

Independente do princípio ativo utilizado, o controle químico deve ser usado preventivamente para o mofo-cinzento, principalmente quando as condições edafoclimáticas são favoráveis ao desenvolvimento da doença e os cultivares atuais ainda não apresentam resistência esperada ao patógeno. (CARTAXO et al., 2004).

Entretanto, vale lembrar que os produtos citados ainda não apresentam registro para uso na cultura da mamona no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (AGROFIT, 2012).

Bezerra (2007), trabalhando com isolados de *A. ricini* dos estados da Paraíba e Alagoas, obteve sensibilidade aos princípios ativos de fungicidas carbendazim e azoxistrobina. Chagas (2009), em seu trabalho com os fungicidas tiofanato metílico, carbendazim, tebuconazole e iprodione, nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 µL/L, obteve inibição no crescimento micelial de *A. ricini in vitro*.

## 4.5 Extratos vegetais

Na maioria dos casos, o controle de doenças em plantas é realizado com o uso de fungicidas. Em processos orgânicos de produção, o seu uso é proibido, pois esse é um dos requisitos exigidos pelas empresas certificadoras. Nesse caso, o uso de produtos alternativos ganha espaço. Um dos maiores problemas envolvendo os defensivos agrícolas é o seu uso indiscriminado no controle de doenças, o que pode causar sérios riscos a saúde humana, contaminação do meio ambiente e possíveis problemas de resistência de fitopatógenos (GHINI; KIMATI, 2000).

As plantas possuem uma variedade enorme de compostos, obtidos principalmente via metabolismo secundário (DI STASI, 1996). Há a possibilidade de alguns compostos substituírem produtos agrícolas no controle de doenças de plantas (CASTELLANOS, et al., 2001). Dessa maneira, após a descoberta do composto e esse sendo eficiente, tentar sintetizá-lo em laboratório e produzi-lo em larga escala como fungicida.

Entre os compostos, podemos citar os fenóis e os terpenos (POSER e MENTZ, 2004). Estes compostos podem agir de diferentes formas do ponto de vista fitossanitário. Tais como:

Antimicrobiano: por meio da atividade direta contra os fitopatógenos, inibindo o crescimento micelial, germinação de esporos ou a multiplicação de bactérias ou outros fitopatógenos (TALAMINI; STADNIK, 2004; MELLO et al., 2006; FRANZENER et al., 2007; SILVA et al., 2008).

Indução de resistência: por meio de atividade indireta pela ativação de mecanismos de defesa da planta ao patógeno (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005) ou por promover o crescimento das plantas pelos chamados ‘bioestimulantes’ (TALAMINI; STADNIK, 2004).

A azadiractina é o principal composto da planta conhecida como nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss), originário da Índia, e pertencente à família Meliaceae. Há estudos por diversos autores utilizando nim para controle de fitopatógenos (MELLO et al., 2005; PIGNONI; CARNEIRO, 2005; CARNEIRO, 2003; NEVES et al., 2003). O nim apresenta, também, propriedades biodegradáveis e de persistência curta no meio ambiente (MARTINEZ, 2002).

O extrato de melão-de-são-caetano (*Momordica charantia* L.), da família Cucurbitaceae, pode ser obtido das sementes, folhas, hastes, raízes ou frutos, onde foram encontrados substâncias biotivas como alcalóides, flavonóides, glicosídeos, saponinas, açúcares redutores, resinas, ácidos livres, constituintes e fenólicos (TORRES et al, 2002). A planta é originária do leste indiano ou do sul da China (ROBINSON e DECKER-WALTERS, 1997). No trabalho realizado por Celoto et al. (2008), resultados de controle de *Colletotrichum gloesporioides* foram obtidos por extratos de melão-de-são-caetano e eucalipto.

O extrato pirolenhoso é uma mistura obtida através da condensação da fumaça produzida durante o processo de carbonização da madeira. Constitui-se de 800 a 900 dm<sup>-3</sup> de água e uma série de componentes químicos, predominando, quantitativamente, o ácido acético, o metanol, a acetona e os fenóis (ZANETTI et al., 2004). É empregado em diversas culturas como arroz, batata-doce e melão, e com finalidades diferentes como fertilizante orgânico, nematicida e fungicida (ZANETTI et al., 2003).

Nos últimos vinte anos, as pesquisas envolvendo fungicidas originados de plantas vêm aumentando, apesar de sua utilização ocorrer há séculos. Entre os exemplos encontrados na literatura, podemos destacar o uso de extrato de alho e capim-santo para controle de *Fusarium proliferatum in vitro* (SOUZA et al., 2007).

Domingues et al. (2009) não obtiveram inibição completa por parte de nenhum extrato utilizado no trabalho no crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum*. No entanto, eles obtiveram resultados positivos de controle no crescimento de *Sclerotium rolfsii* com os extratos de arruda (*Ruta graveolens*), allamanda (*Allamanda cathartica*), maria-sem-vergonha (*Impatiens walleriana*) e extrato de maria-sem-vergonha (*Impatiens walleriana*) no controle de *Alternaria solani*. Wilson et al. (1997) testaram contra *B. cinerea* a ação antifúngica de 345 extratos de plantas e 49 óleos essenciais.

Chagas (2009) obteve resultados positivos no controle *in vitro* de *A. ricini* utilizando os óleos essenciais de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e Palma-Rosa (*Cymbopogon martinii*), nas concentrações de 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 µL/L.

#### 4.6 Resistência de plantas a doenças fúngicas

As plantas apresentam resistência natural ao ataque de patógenos, pois, se fosse o contrário elas seriam afetadas pelas doenças. Dessa forma, pode-se considerar resistência como regra e suscetibilidade como exceção. A luta entre hospedeiro e patógeno é constante, sempre visando a sobrevivência do mais apto. O hospedeiro lança mão de um arsenal de mecanismos de defesa tais como: estruturais e/ou bioquímicos (PASCHOLATTI; LEITE, 1995).

Outros autores descrevem a resistência como uma característica em que uma planta restringe o desenvolvimento do patógeno e da doença (FRY, 1982). Parlevliet (1997) conceitua resistência como a habilidade da planta em suprimir, retardar ou prevenir a entrada ou a subsequente atividade do patógeno (crescimento e desenvolvimento) em seus tecidos.

O melhoramento genético visando a resistência das plantas a doenças é uma das técnicas mais utilizadas, por ser mais eficiente, simples e de reduzido impacto na natureza. Este é o foco principal de muitas empresas na busca de genótipos com alta produtividade e elevada resistência a inúmeras doenças. No entanto, a competição torna-se desleal pelo fato dos patógenos apresentarem algumas vantagens seletivas sobre os genótipos hospedeiros. Entre as vantagens, podemos destacar: ciclo de vida rápido e capacidade de produzir novas combinações genéticas de patogenicidade (MATIELLO et al., 1997).

São diversas as formas como a resistência pode ser manifestada, em função da estabilidade e da especificidade. Podendo ser dividida em resistência vertical ou horizontal.

De acordo como Van Der Planck (1982), a resistência vertical obtida por um ou mais genes, podendo ser monogênica ou oligogênica, com expressão de genes maiores, apresentando resistência a raças específicas e com pouca estabilidade. Os trabalhos realizados por Flor (1956) explicam as bases da resistência vertical. Nestes trabalhos, foram utilizados o linho (*Linum usitatissimum* L.) e sua principal doença, a ferrugem do linho (*Melampsora lini*). Essa relação entre a resistência do linho e a virulência do fungo da ferrugem permitiu que Flor (1971) propusesse a teoria “gene-a-gene”, que diz que para cada gene de resistência no hospedeiro há um gene específico e relacionado, determinando a

patogenicidade no fungo. É mais fácil se trabalhar com a resistência vertical, pois é condicionada por poucos genes de expressão, sendo eficaz em programas de melhoramento pela fácil transferência destes de um material para o outro, por simples cruzamento. Em contrapartida, os patógenos quebram essa resistência com mais facilidade (MATIELLO, 1997).

A resistência horizontal é uniforme, condicionada por vários genes (poligênica) de pequeno efeito, raça-não-específica, geralmente durável, sem interação diferencial entre as raças do patógeno e as variedades do hospedeiro (VAN DER PLANK, 1975). Este tipo de resistência caracteriza-se por apresentar vários fenômenos tais como: baixa capacidade de penetração e esporulação do patógeno; os genes são recessivos e interagem entre si; não são específicas para determinada raça. A resistência horizontal é interessante, pois a possibilidade de incorporar ou encontrar em determinado genótipo uma variedade de genes é fundamental, pois as chances que um patógeno tem para quebrar essa resistência é muita pequena (MATIELLO, 1997).

Há outras alternativas no melhoramento visando a resistência a doenças: Resistência a doenças induzida pela nutrição mineral (ZAMBOLIM; VENTURA, 1993); Resistência adquirida (HADWIGER; CULLEY, 1993); Mistura de variedades (BURDON; CHILVERS, 1982; MARTINELLI, 1990); Multilinha (PARLEVLIET; ZADOKS, 1977) e Piramidização (DYCK; KERBER, 1985).

O mofo-cinza da mamoneira, causado pelo fungo *A. ricini* Buchw., forma anamórfica de *B. ricini* (GODFREY, 1923), é um patógeno bastante difundido no Brasil, e apesar da importância da doença, pouco são os trabalhos envolvendo a avaliação de genótipos quanto à resistência à doença. O tipo de herança ainda não foi determinada. Em trabalhos envolvendo outras plantas e patógenos pertencentes ao gênero *Botryotinia*, que engloba as formas teleomórficas de *Botrytis* e *Amphobotrys*, o mais comum é a herança ser monogênica ou controlada por poucos genes (CAMPBELL, 1984; CHATUVERDI et al., 1995; NIKOLIC, 1997), mas, em outros trabalhos, como no de Jennings (1983) com *Hibiscus cannabinus* L. e cebola (*Allium cepa*) (LIN et al., 1995), foram verificadas heranças poligênicas com ação aditiva para resistência a *Botrytis*.

De acordo com Milani et al. (2005), é possível que a herança seja do tipo poligênica, devido a reações quantitativas dos genótipos à doença no campo.



Outras características como número e distribuição de acúleos (LIMA e SOARES, 1990); conformação do cacho (BATISTA et al., 1998; COSTA et al., 2004) e conformação da planta (MILANI et al., 2005), também podem contribuir na seleção e avaliação de genótipos de mamoneira.

A busca contínua por materiais, sejam eles silvestres ou linhagens resistentes, é muito importante quando se visa a estabilidade da resistência genética da cultura, contribuindo assim para o rendimento da mesma.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Obtenção e manutenção de isolados de *A. ricini* e *B. cinerea*.

Os isolados de *A. ricini* foram coletados em cachos com sintomas da doença nas seguintes cidades do Estado de São Paulo: Vicentinópolis, Nova Canaã Paulista, Botucatu, São Manuel e Bariri. Os isolados provenientes da cidade de Primavera do Leste-MT foram cedidos pelo pesquisador Msc. Rafael Galbieri, do Instituto Mato-Grossense do Algodão (IMA-MT), enquanto que os de Campina Grande-PB (EMBRAPA ALGODÃO) foram cedidos pelo pesquisador Nelson Dias Suassuna. O isolado de Lavras – MG (UFLA) foi cedido pelo pesquisador Dr. Angelo Barbosa Sussel. Foram utilizados para fim de comparação dois isolados de *B. cinerea*, sendo um isolado de muda de eucalipto e o outro isolado de uma planta ornamental conhecida como poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*).

Os materiais coletados foram levados para o Laboratório de Fungos de solo “Nilton Luiz de Souza”, do Departamento de Produção Vegetal – Defesa Fitossanitária, da Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA), localizada na cidade de Botucatu – SP.

Para isolamento do patógeno, os fragmentos dos materiais coletados foram submetidos a uma desinfestação superficial com solução de álcool a 70% durante 1 minuto, seguido de uma submersão em solução hipoclorito de sódio a 2% durante 1 minuto,

finalizando com uma lavagem em água destilada autoclavada por mais 1 minuto. Os fragmentos desinfestados foram secos em papel de filtro estéril e depositados sobre placas de Petri contendo o meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar), e mantidos em câmara do tipo B.O.D com fotoperíodo de 12h de luz durante 2 dias a 25° C. Assim que os primeiros sinais de crescimento micelial apareceram, discos de micélio de 0,5 cm foram transferidos para novas placas de Petri contendo meio de cultura BDA.

Para a obtenção de culturas monospóricas, as colônias obtidas do isolamento foram lavadas com uma alíquota de 10 mL de solução salina (500 mL de água destilada + 4,25 g de NaCl) autoclavada, logo em seguida retirou-se uma alíquota de 1mL de suspensão de esporos, a qual foi transferida para tubos contendo 9 mL de solução salina, realizando-se “a posteriori” uma diluição seriada e as concentrações das suspensões de esporos foram padronizadas para aproximadamente  $10^2$  esporos/mL. Foi depositado 0,1 mL dessa suspensão de esporos em placas contendo o meio BDA acrescido de 0,005% de chloramphenicol. Através de visualização em lupa estereoscópica 40 X, os esporos foram individualizados e transferidos com agulha entomológica para meio BDA para formação das colônias monospóricas. Em seguida, cada isolado monospórico foi preservado no método Castellani.

## 5.2 Patogenicidade dos isolados

Os isolados monospóricos obtidos foram nomeados com o prefixo ISO seguidos de numeração de acordo com a ordem em que foram obtidos. Os isolados cedidos de outras instituições tiveram seu código alterado apenas para fim de facilitação de identificação no trabalho, mas sua identificação original foi mencionada (Tabela 1).

A metodologia utilizada na patogenicidade consistiu na inoculação de discos de micélio dos respectivos isolados monospóricos em frutos destacados de mamoneira em bandejas plásticas. Cada bandeja recebeu 15 frutos da cultivar IAC-80 e foram adicionados copos plásticos com algodão umedecido. Logo em seguida as bandejas foram colocadas em sacos plásticos para formação de câmara úmida. As bandejas permaneceram em câmara climática durante 5 dias, na temperatura de 25°C, fotoperíodo de 12 h e umidade relativa de aproximadamente 90%. Posteriormente, realizou-se a avaliação dos frutos com uma escala de notas

com valores variando de 1 até 5. Sendo a nota 1- ausência de sintomas; nota 2- aproximadamente 25% do fruto com sintomas; nota 3 –aproximadamente 50% do fruto com sintomas; nota 4 – aproximadamente 75% do fruto com sintomas e nota 5 – 100% do fruto com sintomas. O delineamento foi em blocos inteiramente casualizados. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística não-paramétrica, pelo teste de Friedman a 5% de probabilidade, optou-se pela estatística não paramétrica devido ao fato dos dados não apresentarem uma distribuição normal utilizando o programa estatístico ASSISTAT 7.6<sup>®</sup> (SILVA; AZEVEDO, 2002).

Tabela 1. Relação de isolados de *Amphobotrys ricini* e *Botrytis cinerea* utilizados nos ensaios de laboratório.

Isolado Código Anterior	Material Vegetal	Parte da Planta	Cidade de origem	Estado de origem	Isolado Código Atual
AR06	<i>Ricinus communis</i>	Racemo	Botucatu	São Paulo	ISO -1
AR08	<i>Ricinus communis</i>	Racemo	Botucatu	São Paulo	ISO -2
AR26	<i>Ricinus communis</i>	Racemo	Botucatu	São Paulo	ISO -3
AR29	<i>Ricinus communis</i>	Racemo	Botucatu	São Paulo	ISO -4
AR64	<i>Ricinus communis</i>	Racemo	Bariri	São Paulo	ISO -5
AR77	<i>Ricinus communis</i>	Racemo	Bariri	São Paulo	ISO -6
AR84	<i>Ricinus communis</i>	Racemo	Bariri	São Paulo	ISO -7
AR86	<i>Ricinus communis</i>	Racemo	Bariri	São Paulo	ISO -8
AR89	<i>Ricinus communis</i>	Racemo	São Manuel	São Paulo	ISO -9
AR90	<i>Ricinus communis</i>	Racemo	São Manuel	São Paulo	ISO -10
AR98	<i>Ricinus communis</i>	Racemo	São Manuel	São Paulo	ISO -11
AR99	<i>Ricinus communis</i>	Racemo	São Manuel	São Paulo	ISO -12
AR101	<i>Ricinus communis</i>	Racemo	São Manuel	São Paulo	ISO -13
AR106	<i>Ricinus communis</i>	Racemo	São Manuel	São Paulo	ISO -14
A1	<i>Ricinus communis</i>	Racemo	Campina Grande	Paraíba	ISO -15
L3	<i>Ricinus communis</i>	Racemo	Campina Grande	Paraíba	ISO -16
L2	<i>Ricinus communis</i>	Racemo	Campina Grande	Paraíba	ISO -17
S1	<i>Ricinus communis</i>	Racemo	Campina Grande	Paraíba	ISO -18
AS1	<i>Ricinus communis</i>	Racemo	Lavras	Minas Gerais	ISO -19
210	<i>Ricinus communis</i>	Racemo	Primavera do Leste	Mato Grosso	ISO -21
213	<i>Ricinus communis</i>	Racemo	Primavera do Leste	Mato Grosso	ISO -22
215	<i>Ricinus communis</i>	Racemo	Primavera do Leste	Mato Grosso	ISO -23
AR1	<i>Ricinus communis</i>	Racemo	Vicentinópolis	São Paulo	ISO -24
AR3	<i>Ricinus communis</i>	Racemo	Vicentinópolis	São Paulo	ISO -25
AR4	<i>Ricinus communis</i>	Racemo	Vicentinópolis	São Paulo	ISO -26
AR5	<i>Ricinus communis</i>	Racemo	Vicentinópolis	São Paulo	ISO -27
AR1	<i>Ricinus communis</i>	Racemo	Nova Canaã Paulista	São Paulo	ISO -28
AR2	<i>Ricinus communis</i>	Racemo	Nova Canaã Paulista	São Paulo	ISO -29
AR8	<i>Ricinus communis</i>	Racemo	Nova Canaã Paulista	São Paulo	ISO -30
BOT01	<i>Euphorbia Pukherrima</i>	Folha	Botucatu	São Paulo	ISO -31
BOT02	<i>Eucaliptus grandis.</i>	Folha	Botucatu	São Paulo	ISO -34

AR-*Amphobotrys ricini*; BOT- *Botrytis cinerea* ; ISO- isolado.

### 5.3 Microscopia eletrônica de varredura

Para uma melhor compreensão da interação planta-patógeno foi realizado o acompanhamento da colonização da superfície de frutos de mamoneira por *Amphobotrys ricini* e *Botrytis cinerea*. Para isso, frutos da cultivar IAC 80 foram inoculados usando dois isolados, um de *A. ricini* (ISO-24) e um de *B. cinerea* (ISO-34). Sobre a área da superfície do fruto foram depositados 10  $\mu$ L de uma suspensão contendo  $10^5$  conídios /mL de cada fungo, em três pontos diferentes do fruto. Como testemunha um fruto foi inoculado somente com água destilada autoclavada.

Após a inoculação, os frutos foram mantidos em câmara do tipo gerbox a 25° C em B.O.D com fotoperíodo de 12h de luz. A área inoculada (cerca de 0,5 cm de diâmetro) foi retirada utilizando um furador manual e coletada em intervalos de tempo pré-determinados (6, 12 e 24 horas) e fixadas em solução de “Karnovsky” (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,0%, tampão fosfato 0,05M, pH 7,2), por um período mínimo de 24 horas, para serem preparadas e analisadas ao microscópio eletrônico de varredura LEO435-VP. Foram usados três frutos para cada intervalo de tempo pré-determinados.

As amostras do fruto inoculadas foram retiradas do fixador “Karnovsky” e transferidas para microtubos de 1,5 mL contendo tampão fosfato de sódio 0,05M, onde permaneceram por dez minutos. O tampão foi trocado três vezes. Subsequentemente, as amostras foram desidratadas em série crescentes de concentrações de acetona (30%, 50%, 70%, 90% – 10 minutos cada e 100% por três vezes de 10 minutos). Após esta etapa, as amostras foram levadas ao aparelho de ponto crítico (Baltec CPD 030) para completar a secagem. Após completa a desidratação, as amostras foram cuidadosamente montadas em “stubs” com fita de carbono dupla face para aderência das amostras e cobertas com 20nm de ouro em aparelho Baltec SCD 050. A preparação e observação das amostras foram feitas no Centro de Microscopia Eletrônica localizado na ESALQ/USP.

## 5.4 Caracterização cultural

### 5.4.1 Avaliação do crescimento micelial dos isolados monospóricos de *A. ricini* e *B. cinerea* em diferentes temperaturas

As 31 colônias dos isolados monóspóricos foram cultivadas em meio de cultura BDA e quando atingiram o diâmetro total da placa de petri foram repicadas e transferidas, novamente, para placas de petri contendo meio BDA suplementado com o antibiótico chloramphenicol a 0,005%, para evitar possíveis contaminações por bactérias. O experimento consistiu em quatro repetições de cada isolado em delineamento experimental inteiramente casualizado, distribuídos em seis B.O.Ds, cada uma com uma temperatura diferente (15° C; 20° C; 22° C; 25° C; 30° C e 35° C) e com fotoperíodo de 12 horas de luz até o 5° dia. A avaliação foi realizada por meio da medição diária dos diâmetros (cm) das colônias em dois sentidos perpendiculares entre si, tomando como valor de crescimento a média das duas medidas. Os resultados foram submetidos ao teste de média de Scott Knott, a 5% de probabilidade. Os dados de crescimento de todos os isolados nas diferentes temperaturas foram tabulados visando-se à verificação da temperatura que proporcionou máximo crescimento micelial de cada isolado e, também, da população. Posteriormente, esses dados de crescimento da população foram submetidos à análise de regressão linear com o intuito de se ajustar e se calcular a melhor equação da curva de crescimento, nas diferentes temperaturas.

### 5.4.2 Aspecto de colônia e formação de escleródios

A avaliação consistiu na observação das colônias dos isolados monospóricos do ensaio anterior (item 5.4.1), em função do efeito das diferentes temperaturas. Os aspectos analisados foram coloração e aspecto da colônia.

Para os escleródios, os parâmetros analisados foram: forma, cor e tamanho (mm) e temperatura. O tamanho dos escleródios foram definidos de acordo com a metodologia descrita por Sussel (2008), com algumas adaptações, segundo o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. O ensaio permaneceu durante 30 dias nas

estufas tipo B.O.D. e foram avaliados o comprimento e largura de 20 escleródios de cada isolado.

Quanto aos dados de tamanho dos escleródios, calculou-se a média dos dados de ambas as populações, a de *A. ricini* e a de *B. cinerea*, mensurando-se, também, os valores máximos e mínimos, para se ter uma idéia da amplitude da média.

## **5.5 Caracterização morfológica**

### **5.5.1 Tamanho de conídios**

Foram preparadas lâminas semi-permanentes contendo o corante azul de algodão (fenol cristalizado 20 g; ácido láctico 20 ml; glicerina 40 ml; água destilada 20 ml; azul-algodão 0,05 g) a partir de placas de Petri contendo colônias de *A. ricini* com 11 dias, para que os conídios fossem observados sob microscópio ótico com câmera Opton, modelo TA-0124XS, na resolução de 40X, conectados a um microcomputador, contendo o programa DN-2 for Windows 98, Copyright 2002. Para a calibração do equipamento, utilizou-se uma lâmina micrografada (Carl Zeiss®). Foram medidos 50 conídios de cada isolado.

Quanto aos dados de tamanho dos conídios, calculou-se a média dos dados de ambas as populações, a de *A. ricini* e a de *B. cinerea*, mensurando-se, também, os valores máximos e mínimos para se ter uma idéia da amplitude da média.

### **5.5.2 Comprimento de conidióforos**

Discos de micélio dos isolados foram transferidos para placas de petri contendo o meio de cultura ágar-água (AA) e foram mantidos em estufa do tipo B.O.D a 25° C com fotoperíodo de 12h de luz. Após 10 dias, as estruturas foram analisadas utilizando os mesmos equipamentos citados no ensaio anterior, diferindo apenas na resolução utilizada que foi de 10x. Mediu-se o comprimento de 30 conidióforos e o tipo de ramificação apresentada.

Quanto aos dados de comprimento dos conidióforos, calculou-se a média dos dados de ambas as populações, a de *A. ricini* e a de *B. cinerea*, mensurando-se, também, os valores máximos e mínimos para se ter uma idéia da amplitude da média.

## 5.6 Caracterização enzimática

O fungo *A. ricini* de acordo com a literatura utiliza-se de enzimas celulolíticas e pectinolíticas na degradação da parede celular do fruto de mamona. Devido a isso, o presente experimento foi proposto para avaliar a produção enzimática dos isolados analisados. As enzimas averiguadas foram celulase, pectinase, lipase e protease. As metodologias seguem descritas a seguir: Após o preparo de cada meio enzimático, depositou-se no centro de cada placa um disco de micélio de cada isolado, tanto de *A. ricini*, qto de *B. cinerea*. Testemunha consistiu de disco de meio sem o fungo.

### 5.6.1 Atividade celulolítica

O meio de cultura foi composto de 1 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 5 g de  $\text{MgSO}_4$ , 0,001g de NaCl, 15 g de ágar e 10 g de carboximetil-celulose (CMC) em 1 L de água destilada. Logo depois o meio foi autoclavado (120° C, 1 atm, 20 min.), vertido em placas de Petri, os isolados e testemunha foram incubados por 4 dias a 25° C, com fotoperíodo de 12 horas. Foram realizadas seis repetições para cada tratamento em delineamento experimental inteiramente casualizado. A atividade foi verificada pela presença de zonas alaranjadas ao redor da colônia após a aplicação da solução de vermelho Congo (0,1 g de vermelho congo, 100 mL de água destilada), após duas horas. A metodologia sofreu algumas modificações, mas baseou-se nas metodologias propostas por Ryckeboer et al., (2003) e Pereira, (2009).

A avaliação da área de degradação da celulose foi realizada com o auxílio de uma régua milimetrada, mensurando-se os diâmetros perpendiculares do crescimento micelial e do crescimento micelial mais o halo de degradação da celulase para cálculo de áreas. A área de degradação foi obtida subtraindo-se a área do crescimento micelial.

### 5.6.2 Atividade Lipolítica

Foram adicionados 10 g de petona, 5,0 g de NaCl, 0,1 g de  $\text{CaCl}_2$ , 20,0 g de Ágar, 0,01 g de rodamina a 1 L de água destilada e pH 6,0. O meio foi homogeneizado e



autoclavado (120° C, 1 atm, por 20 min.). O Tween 20 esterilizado em autoclave foi adicionado ao meio na proporção de 1:100 (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975) adaptado.

O meio foi vertido em placas de Petri, onde, após a solidificação do meio, discos de micélio de 0,5 cm de diâmetro de cada tratamento foram transferidos e incubados por cinco dias no escuro. Em seguida, as placas foram colocadas a 4° C por 48 h. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis repetições. O aparecimento de halo claro ao redor da colônia resultou da formação de cristais de cálcio láurico, devido à reação da enzima e à completa degradação dos sais lipídicos. Para melhor evidenciar a presença do halo de degradação, adicionaram-se 2 mL da solução de vermelho de fenol ( 0,2 g de vermelho de fenol em 100 mL de água destilada.). A avaliação da área de degradação ocorreu como citado anteriormente no item 5.6.1.

### **5.6.3 Atividade proteolítica**

A metodologia utilizada foi a proposta por Hankin e Anagnostakis (1975) adaptada. Foram adicionados 5 g de Peptona, 3 g de extrato de levedura, 1 g de NaCl, 15 g de Agar, 0,4 g de gelatina, 1 L de água em pH 6,0. A gelatina foi autoclavada separadamente e depois adicionada ao meio de cultura, antes de vertê-lo nas placas.

As colônias foram incubadas por cinco dias em B.O.D a 25° C no escuro, seguindo o delineamento experimental inteiramente casualizado com seis repetições. Após este período, o halo representado por uma região amarelada ao redor da colônia contrastando com o vermelho presente no restante da placa onde não houve atividade da enzima protease. Para isso, adicionou-se ao meio 10 mL de vermelho de metila 2% em cada placa, que permaneceu por 30 minutos e após esse período realizou-se a avaliação da área de degradação como citado anteriormente no item 5.6.1.

### **5.6.4 Atividade pectinolítica**

Foram utilizados dois meios de cultura diferentes: o primeiro foi o meio tamponado (MMT) (2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 7 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 3 g de pectina; 1 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,6 g de extrato de levedura, 13 g de Agar, 1 L de água destilada, pH 7,2 )

(PEREIRA, 2009). As placas de Petri permaneceram a 25° C sob fotoperíodo de 12 horas, durante quatro dias. Depois desse período, discos de 0,5 cm de diâmetro de MMT com micélios isolados foram transferidos para outras placas de Petri contendo o meio Mac Ilvaine (7,74 g de ácido cítrico; 17,93 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,5 g de pectina cítrica; 13g de ágar; 1 L de água destilada; pH = 6,0), o qual permitiu a difusão das pectinases para o meio circundante. As placas permaneceram sob fotoperíodo de 12 h a 25° C, durante 48 h. Após esse período de incubação, utilizou-se 2 mL de solução lugol sobre a superfície do meio de cultura, passados 10 minutos o corante lugol foi descartado. A área de degradação consistiu de um halo claro ao redor da colônia. A avaliação da área de degradação ocorreu como citado anteriormente no item 5.6.1. O delineamento foi inteiramente casualizado com seis repetições por isolado.

### **5.6.5 Análise de dados**

A atividade das enzimas citadas foi estimada semiquantitativamente, calculando-se a área da coroa circular (GIECK, s/ano), que é o local da atividade. Os dados obtidos pelo teste enzimático foram submetidos ao teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, com valores transformados em  $\sqrt{x+0,5}$ , utilizando o programa SISVAR 5.0 DEX/UFLA.

### **5.7 Caracterização molecular dos isolados**

A extração de DNA dos isolados coletados foi realizada conforme o método desenvolvido por Murray e Thompson (1980) modificado. Em cada tubo de microcentrífuga de 1,5 mL foram macerados três discos de micélio com 1000 µL de tampão de extração CTAB (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1,4 M NaCl; 0,02 M EDTA; 2 % CTAB; 0,2 % β-mercaptoetanol). Em seguida, os tubos foram incubados a 65°C, por 30 minutos. Subsequentemente, adicionaram-se 500 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v) aos tubos e estes foram misturados manualmente, por agitação, durante 10 minutos e centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa foi removida para novos tubos com isopropanol. A mistura foi centrifugada por 15 minutos a 12.000 rpm e o “pellet” obtido foi lavado com 500 µL de etanol a 70% e submetido a uma nova centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi

descartado e o precipitado foi seco à temperatura ambiente e ressuspenso em 100 µL de água com DEPC (Diethylpirocarbonato).

A reação de PCR foi feita utilizando os pares de primers ITS 1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') e ITS 4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'), que amplificam a região ITS-5,8S rDNA do fungo. Para a PCR, empregaram-se 3 µL de DNA total extraído (30ng), tampão 1X da enzima *GoTaq* DNA polimerase (Promega®), 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP, 0,2 µM de cada primer na concentração e 1,25 U de *GoTaq* DNA polimerase (Promega®), ajustando o volume da reação para 50 µL com água tratada com DEPC. O regime de programa utilizado no termociclador foi: 94°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C por 35 segundos, 52°C por 1 min, 72°C por 1 min, finalizando-se o processo com 72°C por 15 min. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose corado com Brometo de etídio e observados sob luz UV. Para sequenciamento dos fragmentos amplificados, o produto de PCR foi purificado com o Kit SV Gel and PCR Clean UP system (Promega®). O DNA dos isolados obtidos foi sequenciado no centro de genoma Humano da USP. As sequências obtidas foram editadas através do software BioEdit Sequence Alignment Editor (1997-2005). Após edição, estas foram utilizadas para procurar sequências similares usando o software Blastn do NCBI. As sequências obtidas foram alinhadas e processadas com o programa Mega 5.05 para que fosse construída a árvore filogenética dos isolados de *A. ricini* e *B. cinerea*, utilizando o método “p-distance” (TAMURA, 1992). Árvore filogenética gerada por “Neighbour-Joining” foi construída com base em 10.000 réplicas das árvores embasadas no algoritmo de “bootstrap”.

## **5.8 Controle *in vitro* e *in vivo* do crescimento micelial de *A. ricini*, utilizando diferentes fungicidas e extratos vegetais**

### **5.8.1 Coleta do material vegetal**

As partes aéreas de plantas de Melão-de-São-Caetano foram coletadas nas dependências da faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu-S.P. As folhas e caule foram separados e foram submetidos à metodologia proposta por Celoto (2005). Os frutos de nim e de laranja foram apenas macerados.

### 5.8.2 Preparo dos extratos

A metodologia para a preparação dos extratos seguiu a proposta por Vigo-Schultz (2008). Os extratos vegetais foram obtidos utilizando 20 g das matérias primas obtidas em solução de álcool etílico a 70% (1000 mL) por 7 dias, em temperatura ambiente e no escuro. Posteriormente, o extrato etanólico foi filtrado em gaze e em papel filtro Whatman nº 01 e preservado sob refrigeração para utilização nos diferentes ensaios.

O experimento foi realizado no Laboratório de Patologia Florestal do Setor de Defesa Fitossanitária do Departamento de Produção Vegetal. Foram utilizados cinco extratos vegetais das seguintes espécies: caule e folhas trituradas e secas de *Momordica charantia* (Melão-de-São-Caetano), cascas frescas macerada de *Citrus sinensis* (Laranja), fruto fresco e macerado de *A. indica* (nim), extrato comercial Pirolenhoso, e duas soluções, sendo um de álcool a 70% e outra de hipoclorito de sódio a 10 % e testemunha. Foram preparadas placas de Petri contendo meio BDA com cinco diferentes concentrações dos extratos, a saber: 1000; 2000; 3000; 4000 e 5000µL/L. Repicaram-se para o meio BDA, contendo os tratamentos, discos de 0,7 cm de diâmetro do isolado ISO-24 de *A. ricini* retirados das bordas de colônia com sete 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 5º 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 7 x 5 + testemunha, representados por 7 tratamentos, 5 concentrações e 5 repetições. Os resultados foram submetidos ao teste de média de Scott- Knott, a 5% de probabilidade.

Para o controle químico foram comparados nove fungicidas comerciais (Tabela 2) de diferentes grupos químicos, tanto usados para tratamento de sementes, quanto para parte aérea, para controle de *B. cinerea*.

Tabela 2. Fungicidas testados quanto à eficiência *in vitro* no controle de *A. ricini* Botucatu-SP, 2012.

Ingrediente ativo (i.a)	Grupo químico	Classe	Formulação	Concentração i.a
azoxistrobina + ciproconazol	estrobirulina + triazol	sistêmico	SC	200 + 80 g/L
difeconazol	triazol	sistêmico	CE	250 g/L
iprodione	dicarboximida	contato	PM	500 g/Kg
piraclostrobina + epoxiconazol	estrobirulina + triazol	sistêmico	SE	133 + 50 g/L
procimidone	dicarboximida	sistêmico	PM	500 g/Kg
Procloraz	imidazolcarboxamida	ação e contato	CE	450 g/L
propiconazol	triazol	sistêmico	CE	250 g/L
tebuconazol	triazol	sistêmico	CE	200 g/L
trifloxistrobina + tebuconazol	estrobirulina + triazol	mesostêmico e sistêmico	SC	100 + 200 g/L

SC- suspensão concentrada; PM - pó molhável; CE- concentração emulsional; SE- Susp/Emulsão

Para produção do inóculo, discos de micélio do isolado ISO-24, 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, diluições em série foram feitas, 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 (CHAGAS, 2009).

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, para as testemunhas foram utilizados 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 quatro concentrações de cada um dos fungicidas mais a testemunha. O delineamento foi inteiramente casualizado, esquema fatorial 9 X 4 + testemunha ou seja, nove tratamentos (fungicidas), quatro concentrações (1, 10, 100 e 1000 ppm) e cinco 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 nove 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. Calculando-se o valor da porcentagem de inibição de crescimento micelial (PIC) (MENTEN et al., 1976).

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

Crescimento da testemunha

Para a análise estatística, as médias dos dados foram comparadas pelo teste de Scott- knott 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 ( $ED_{50}$ ), 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  $ED_{50}$ , 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)  $ED_{50} < 1 \mu\text{L/L}$ : Altamente eficiente (A.E);
- b)  $ED_{50}$  entre 1-10  $\mu\text{L/L}$ : moderadamente eficiente (M.E);
- c)  $ED_{50}$  entre 10-50  $\mu\text{L/L}$ : pouco eficiente (P.E);
- d)  $ED_{50} > 50 \mu\text{L/L}$ : ineficiente (I).

No experimento *in vivo* foram utilizados 80 vasos de 20 L com uma mistura de solo autoclavado na proporção de 1:1:1 de areia:esterco e substrato do tipo PLANTMAX<sup>®</sup>. Os vasos foram distribuídos seguindo o delineamento inteiramente casualizado com dez repetições por tratamento. Mudanças de mamoneira da cultivar BRS-Nordestina foram transplantadas para os vasos quando as mesmas apresentavam 20 dias após a emergência e transferidas para condições semicontra-ladas de casa de vegetação. Os tratamentos consistiram nos melhores resultados obtidos nos teste *in vitro*. Sendo cinco a base de fungicidas e um a base de extrato vegetal e duas testemunhas, uma inoculada e outra não inoculada. Os cachos das plantas que compunham o tratamento testemunha não inoculada foram protegidas com sacos de papel para evitar possíveis contaminações. O período de ensaio ocorreu entre os meses de Setembro à Dezembro de 2011, a irrigação ocorria quatro vezes ao dia entre os horários das 8:00 até 18:00 hs durante 1 minuto.

As pulverizações foram dirigidas no cacho até o ponto de escorrimento dos tratamentos foram realizadas com pulverizador manual por duas vezes com intervalos de uma semana entre eles, quando 30% das plantas começaram a formar os cachos. Uma semana após a última pulverização, foi inoculada uma suspensão com  $1 \times 10^6$  conídios/mL em todos os tratamentos exceto o tratamento testemunha não inoculado, que permaneceu separada dos demais afim de evitar possíveis contaminações. Um dia após a inoculação, a irrigação da estufa foi ligada para que a umidade relativa ficasse por voltar de 90%. Os tratamentos permaneceram na estufa por 15 dias, quando foi realizada a avaliação, que consistiu na utilização de escala de notas, que variaram de 1 a 5. Sendo a nota 1 – ausência de sintomas; nota 2 – aproximadamente 25% do cacho infectado; nota 3- aproximadamente 50% do cacho infectado; nota 4- aproximadamente 75% do cacho infectado e nota 5 – 100% do cacho infectado. Optou-se por este método, pelo simples fato de que as plântulas permaneceram em vasos de 20L e os cachos formados não apresentaram o mesmo desenvolvimento caso fossem plantadas a campo, não sendo viável a utilização da escala diagramática desenvolvida por Chagas et al., (2010). Os dados foram submetidos a análise-não-paramétrica, pelo teste de Friedman, seguido do teste T a 5 % de probabilidade. Optou-se por esse teste pois o dados se podem ser utilizados com distribuições de resultados que não obedeçam aos parâmetros da curva normal. Sendo utilizados quando os dados experimentais são mensurados com base em

escalas de medida ao nível ordinal ou nominal (INFOPÉDIA, 2012). O programa utilizado foi o ASSISTAT, versão 7.6 (SILVA; AZEVEDO, 2002).

Os tratamentos foram:

- 1- Fungicida Tebuconazol, na dosagem de 100 g de i.a / 500 L de água;
- 2- Fungicida Trifloxistrobina e Tebuconazol, na dosagem de 100 g/ 200g de i.a / 500 L de água;
- 3- Fungicida Piraclostrobina e Epoxiconazol, na dosagem de 133 g/ 50 g de i.a / 500 L de água;
- 4- Fungicida Procloraz na dosagem de 450 g de i.a / 500 L de água;
- 5- Fungicida Propiconazol na dosagem de 250 g de i.a / 500 L de água;
- 6- Extrato Pirolenhoso na dosagem de 1000 µL/ L de água;
- 7- Testunha inoculada;
- 8- Testemunha não inoculada.

### **5.9 Avaliação de genótipos de mamoneira visando resistência ao mofo – cinzento em duas localidades diferentes em condições de campo**

Buscando avaliar a resistência ao mofo-cinzento com quatro genótipos provenientes do programa de melhoramento genético da Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp de Botucatu, (319, 343,360/1 e 360/2) o presente ensaio foi realizado. As cultivares IAC – 80 e IAC-2028, cedidos pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), pela pesquisadora Dra. Tammy Aparecida Manabe Kihl, foram utilizadas como testemunhas por serem moderadamente suscetíveis (IAC 2012; SAVY FILHO et al.,2007). Os materiais foram semeados nas fazendas experimentais da UNESP localizadas nos municípios de Botucatu - SP e São Manuel – SP.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com quatro repetições, sendo que cada genótipo foi representado por uma linha distribuída



aleatoriamente dentro do bloco, sendo cada linha composta por 14 plantas. O espaçamento utilizado foi o 1,0 m entre linhas e 0,5 m entre plantas. A área experimental apresentou dimensões totais de 36,5 m de comprimento por 13,0 m de largura, com espaçamento entre blocos de 1,5 m. A distribuição dos tratamentos dentro dos blocos foi igual para os dois locais do experimento, e ambos receberam inoculação artificial do patógeno.

A avaliação consistiu na utilização de uma escala diagramática com seis níveis de severidade (0; 8; 22; 43; 76 e 100%), nos cachos primários da plantas, proposta por Chagas (2010), durante o período de 3 semanas. Os dados foram transformados em  $\arcsen\sqrt{x/100}$  e submetidos ao teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade utilizando o programa ASSITAT 7.6 (SILVA; AZEVEDO, 2002).

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Patogenicidade dos isolados

Todos os isolados monospóricos foram patogênicos quando inoculados aos frutos de mamoneira da cultivar IAC-80 (Figura 1), diferindo apenas no número de frutos infectados. Os isolados 5, 6, 7, 18, 24 e 27, de *A. ricini*, e os isolados 31 e 34 de *Botrytis cinérea* (Tabela 3), apresentaram 100% severidade nos 15 frutos destacados que formavam os tratamentos em câmara climática com temperatura de 25°C. Dos quatro isolados coletados na cidade de Bariri, os isolados 5, 6 e 7 apresentaram nota 5, o que corresponde a 100% de severidade, não diferindo estatisticamente entre si.

Os dois isolados de *B. cinerea* apresentaram 100% de severidade. Este resultado não surpreende devido a alta capacidade patogênica do fungo e o mesmo apresentar alta inespecificidade, sendo relatada sua presença nas mais diversas culturas (ELAD et al., 2004). Dessa maneira, se as condições climáticas forem favoráveis ao *Botrytis cinerea*, o mesmo pode, também, vir a ser um patógeno potencial para a cultura, mesmo não havendo relatos no Brasil de sua presença em plantios de mamoneira. Divergindo do que foi relatado por Hong et al. (2001), em seu trabalho na Coreia, onde, trabalhando com isolados coletados de folhas de mamoneira com sintomas da doença, obtiveram 25 isolados, sendo que cinco foram identificados como *B. cinerea* e 20, como *A. ricini*, de acordo com as características culturais e morfológicas dos isolados.

Tabela 3. Avaliação da severidade dos isolados de *A. ricini* e *B. cinerea* inoculados em frutos destacados de mamoneira. Botucatu- SP, 2012.

Isolados	Severidade <sup>1</sup>
1	1,80 ghij <sup>2</sup>
2	1,67 fghi
3	3,80 b
4	2,67 def
5	5,00 a
6	5,00 a
7	5,00 a
8	2,40 defg
9	1,47 hijl
10	1,93 defg
11	2,60 de
12	3,67 bc
13	1,27 ijl
14	1,47 hijl
15	1,27 ijl
16	2,20 defg
17	2,00 efg
18	5,00 a
19	4,13 b
21	3,07 cd
22	2,07 efgh
23	2,60 defg
24	5,00 a
25	2,80 de
26	1,53 hijl
27	5,00 a
28	1,27 ijl
29	2,20 def
30	1,47 hijl
31	5,00 a
34	5,00 a
Testemunha	1,00 l

<sup>1</sup>Severidade da doença - Escala de notas, a saber: nota 1- ausência de sintomas; nota 2- aproximadamente 25% do fruto com sintomas; nota 3 – aproximadamente 50% do fruto com sintomas; nota 4 – aproximadamente 75% do fruto com sintomas e nota 5 – 100% do fruto com sintomas.

<sup>2</sup>Médias seguidas de letras iguais, na coluna, não diferem entre si, segundo o Teste T ao nível de 5% de probabilidade, da análise não-paramétrica de Friedman.



Figura 1. Frutos de mamoneira infectados com os fungos *Amphobotrys ricini* (esquerda) e *Botrytis cinerea* (direita).

Apesar de não ter sido feito a patogenicidade cruzada dos isolados de *A. ricini*, há relatos da presença natural do patógeno em outras plantas da família Euphorbiaceae, tais como: *Caperonia palustris* (WHITNEY; TABER, 1986), *Euphorbia pulcherrima* (HOLCOMB e BROWN, 1990) e *Jatropha podagrica* (LIMA et al., 2008). Testes envolvendo inoculações artificiais mostraram que *A. ricini* tem uma ampla gama de hospedeiros dentro das Euphorbiaceae, incluindo espécies de interesse econômico como mandioca (*Manihot utilissima*) (HOLCOMB et al., 1989; KUMAR et al., 2007; LIMA et al., 2008). No entanto, nada impede a possibilidade do patógeno infectar plantas fora da família Euphorbiaceae.

Outra característica importante é que *A. ricini* não penetra no hospedeiro por aberturas naturais, dependendo de enzimas hidrolíticas, provavelmente enzimas celulolíticas e pécnicas, que decompõem os tecidos do fruto, sendo que o processo inicia-se devido à quantidade de açúcares solúveis presentes na cápsula de mamoneira, onde a suscetibilidade ao fungo é devido às maiores quantidades de açúcares solúveis presentes (ORELLANA; THOMAS, 1962).

## 6.2 Microscopia eletrônica de varredura

Após os resultados obtidos pela caracterização patogênica dos isolados em frutos destacados de mamoneira, dois isolados foram escolhidos, por apresentarem nota 5, que corresponde a 100% de severidade, sendo eles o ISO- 24 (*A. ricini*) e ISO-34 (*B.cinerea*)

Seis horas após a inoculação, o isolado de *A. ricini* (ISO-24) iniciou a emissão do tubo germinativo, apesar de que em placa de Petri observada em microscópio ótico, nesse mesmo período a emissão de tubo germinativo já tinha sido suficiente (dados não publicados do autor). Essa diferença pode ser devido a algum fator envolvendo a interação patógeno-hospedeiro. Por outro lado, o isolado de *B. cinerea*. (ISO-34), no mesmo período, já havia emitido o tubo germinativo, indicando haver realmente diferenças na velocidade de crescimento dos patógenos (Figuras 2 e 3). Elad et al. (2007) relatam a formação de tubo germinativo com apenas três horas após a inoculação de conídios de *B. cinerea*, o que corrobora o observado para o isolado ISO-34.

No período de 12 horas, pode ser observada no isolado de *A. ricini* a emissão do tubo germinativo, e, também os conídios estavam mais próximos uns dos outros, produzindo uma espécie de mucilagem, possivelmente envolvida no processo de patogenicidade. Não foi observado a formação de apressório, indicando realmente que o patógeno utiliza apenas enzimas hidrolíticas e pécticas para degradar a parede celular do fruto de mamoneira. Por outro lado Godfrey (1923), relata em seu trabalho a presença de apressório. No isolado de *B. cinerea*, constatou-se a presença de apressório, mas seus conídios não estavam tão próximos uns dos outros como os de *A. ricini*, mas seu tubo germinativo por outro lado apresentava tamanho superior (Figuras 2 e 3).

Estruturas de penetração, como no caso de apressórios, sejam elas simples ou compostas, são formadas dentro de seis horas após a germinação, quando os tubos germinativos atingem o comprimento de 10-15  $\mu\text{m}$  (EMMET; PARBERY, 1975). O fungo *B. cinerea* forma protoapressório, também em seis horas, de acordo com Clark e Lorbeer (1976), corroborando os dados obtidos para o isolado ISO-34 (Figura 3).

No período de 24 horas não foi possível observar a formação de conidióforos em nenhum dos isolados avaliados. Possivelmente seja necessário um período

maior para que isso ocorra. O que se visualizou foi um maior adensamento dos conídios de *A. ricini* e um aumento de uma espécie de mucilagem na superfície do fruto. Para *B. cinerea*, constatou-se um aumento rápido das hifas na superfície do fruto de mamoneira. Possivelmente, essa capacidade de adesão dos fungos seja devido à hidrofobicidade existente entre os conídios e o substrato, como relatado no trabalho de Doss et al. (1993), trabalhando com *B. cinerea*.

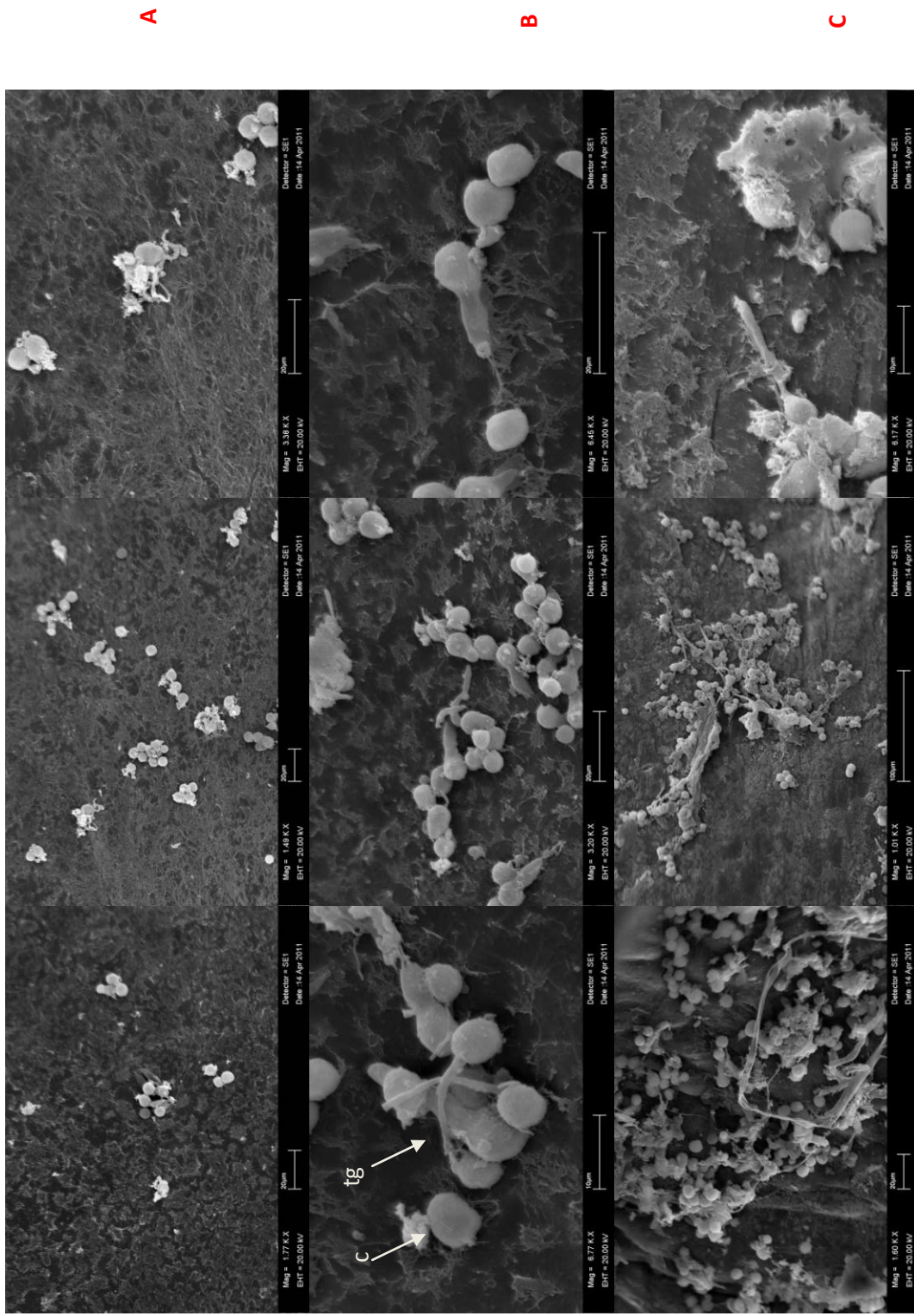


Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura do isolado (ISO-24) de *A. ricini* em diferentes períodos de colonização. A: 6h após a inoculação; B: 12h após inoculação [tubo germinativo (tg), conídio (c)] e C: 24h após a inoculação.

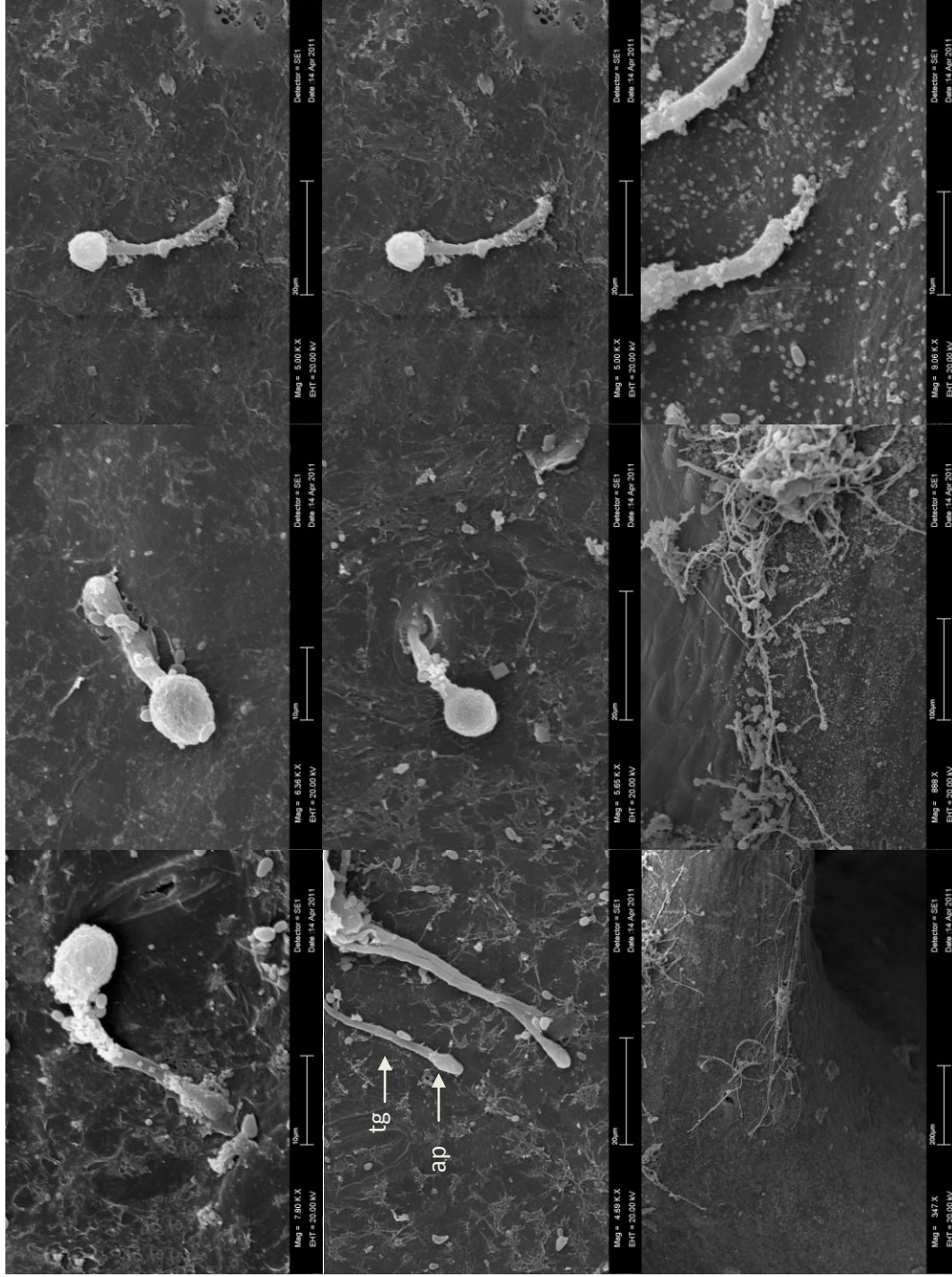


Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura do isolado (ISO-34) de *B. cinerea* em diferentes períodos de colonização. D: 6h após a inoculação; E: 12h após inoculação [tubo germinativo (tg) e apressório (ap)] e F: 24h após a inoculação.



## 6.3 Caracterização cultural

### 6.3.1 Avaliação do crescimento micelial dos isolados monospóricos de *A. ricini* e *B. cinerea* em diferentes temperaturas.

Houve crescimento micelial dos isolados nas temperaturas de 15, 20, 22, 25 e 30°C, mas a 35°C isto não ocorreu para nenhum dos isolados avaliados. Apesar de apresentarem diferenças estatísticas entre si, não foi possível agrupá-los por região de coleta. Os isolados 1, 3, 4, 5, 9, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 23, 25, 26, 27, 28, 29 e 30 obtiveram os melhores índices de crescimento micelial (IVMC) na temperatura de 25°C, enquanto que os índices de crescimento micelial dos isolados 2, 6, 7, 8, 10, 11, 22 e 24 ficaram na faixa de 30°C. Já o isolado 13 apresentou o melhor índice na temperatura de 20°C. O isolado 15 foi o que apresentou os menores índices de crescimento em todas as temperaturas testadas (Tabela 4 e Figura 4). Godfrey (1923), em seu trabalho obteve crescimento de isolados de *A. ricini* na faixa de 35° C, apesar de citá-la como temperatura máxima limitante, utilizando o meio de cultura ágar corn-meal, contrastando com o observado no presente trabalho onde não houve crescimento micelial na temperatura de 35°C .

Sussel (2008) trabalhando *in vitro* com isolados de *A. ricini*, de diferentes localidades, obteve crescimento, esporulação e germinação na faixa de 14°C e 28°C. Já para Ueno (2007), a melhor temperatura foi 20,1°C. Suassuna et al. (2004), trabalhando com crescimento de isolados de *A. ricini* em diferentes temperaturas, obtiveram maior crescimento micelial na faixa de 20° a 25°C para quatro isolados e para apenas um deles o maior crescimento ficou na faixa de 15° a 20°C.

Os isolados de *B. cinerea* (31 e 34) foram os que apresentaram maiores médias de IVMC na temperatura de 20°C, mas estatisticamente não diferiram entre as temperaturas de 15° a 25°C e de 15° a 20°C respectivamente, sendo eles diferentes dos isolados de *A. ricini* (Tabela 4 e figura 4). Houve ainda inibição do crescimento micelial do isolado 34 na temperatura de 30°C, reforçando a preferência do patógeno por temperaturas mais amenas. Kwon et al. (2011) na Coréia trabalhando com *B. cinerea*, patógeno problema pós colheita em mirtilo, obtiveram a mesma temperatura ótima de 20°C para o crescimento micelial e formação de escleródios.

Tabela 4. Índice de velocidade média de crescimento (IVMC) de isolados de *A. ricini* e de *B. cinerea* em seis diferentes temperaturas. Botucatu-SP, 2012.

Isolado	Temperaturas (°C)					
	15	20	22	25	30	35
IVMC (cm)						
1	0,15 <sup>2</sup> Dd <sup>1</sup>	0,53 Ce	0,77 Be	1,17 Ac	0,84 Bc	0,00 Ea
2	0,11 Dd	0,38 Cf	0,46 Cg	0,58 Bg	0,76 Ad	0,00 Da
3	0,22 Ec	0,66 Cd	0,49 Dg	1,35 Ab	0,88 Bc	0,00 Fa
4	0,52 Db	1,31 Bb	1,38 Bb	1,71 Aa	0,91 Cc	0,00 Ea
5	0,19 Eb	0,57 De	0,95 Cd	1,63 Aa	1,25 Ba	0,00 Fa
6	0,37 Ec	0,93 Cc	0,65 Df	1,17 Bc	1,33 Aa	0,00 Fa
7	0,20 Cd	0,43 Be	0,43 Bg	0,47 Bg	0,63 Ae	0,00 aD
8	0,10 Cd	0,35 Bf	0,32 Bh	0,42 Bh	0,75 Ad	0,00 Ca
9	0,00 Dd	0,59 Ce	0,85 Be	1,07 Ad	0,89 Bc	0,00 Da
10	0,23 Dc	0,54 Be	0,57 Bf	1,00 Ad	1,05 Ab	0,00 Ea
11	0,11 Dd	0,47 Ce	0,5 Cg	0,68 Bf	0,87 Ac	0,00 Da
12	0,13 Dd	0,46 Ce	0,66 Bf	1,01 Ad	0,72 Bd	0,00 Da
13	0,32 Dc	1,21 Ab	1,19 Bc	0,41 Dh	0,62 Ce	0,00 Ea
14	0,17 Cd	0,57 Be	0,65 Bf	0,84 Ae	0,66 Bd	0,00 Da
15	0,00 Ce	0,10 Bf	0,32 Ah	0,35 Ah	0,09 Bg	0,00 Ca
16	0,14 Bd	0,46 Ae	0,42 Ag	0,51 Ag	0,46 Af	0,00 Ca
17	0,22 Bc	0,58 Ae	0,57 Af	0,69 Af	0,55 Ae	0,00 Ca
18	0,34 Cc	0,75 Bd	0,75 Be	0,87 Ae	0,71 Bd	0,00 Da
19	0,20 Ed	0,75 Dd	1,05 Bd	1,33 Ab	0,88 Cc	0,00 Fa
21	0,31 Dc	0,84 Cc	0,79 Ce	1,38 Ab	1,22 Ba	0,00 Ea
22	0,29 Dc	0,51 Ce	0,49 Cg	0,79 Be	1,24 Ab	0,00 Ea
23	0,10 Cd	0,75 Bd	0,73 Be	1,19 Ac	0,73 Bd	0,00 Ca
24	0,29 Dc	0,56 Ce	0,51 Cg	0,84 Be	1,25 Aa	0,00 Ea
25	0,14 Cd	0,56 Be	0,76 Ae	0,83 Ae	0,70 Ad	0,00 Da
26	0,18 Cd	0,38 Bf	0,36 Bh	0,74 Af	0,67 Ad	0,00 Da
27	0,00 Be	0,10 Bf	0,08 Bi	0,34 Ah	0,06 Bg	0,00 Ba
28	0,23 Dc	0,51 Be	0,84 Ae	0,96 Ad	0,38 Cf	0,00 Ea
29	0,29 Cc	0,67 Bd	0,64 Bf	0,82 Ae	0,81 Ad	0,00 Da
30	0,10 Dd	0,51 Ce	0,57 Cf	0,86 Ae	0,68 Bc	0,00 Da
31	1,58 Aa	1,61 Aa	1,55 Aa	1,56 Aa	0,36 Bf	0,00 Ca
34	1,52 Aa	1,55 Aa	1,33 Bb	1,03 Cd	0,00 Dg	0,00 Da
Testemunha	0,00 Ae	0,00 Af	0,00 Ai	0,00 Ai	0,00 Ag	0,00 Aa
CV%	16,42					

<sup>1</sup>Média seguida de letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si, segundo o teste de Scott- Knott à 5% de probabilidade.

<sup>2</sup>Média de quatro repetições, sendo os valores transformados em  $\sqrt{x+0,5}$  pela análise estatística.

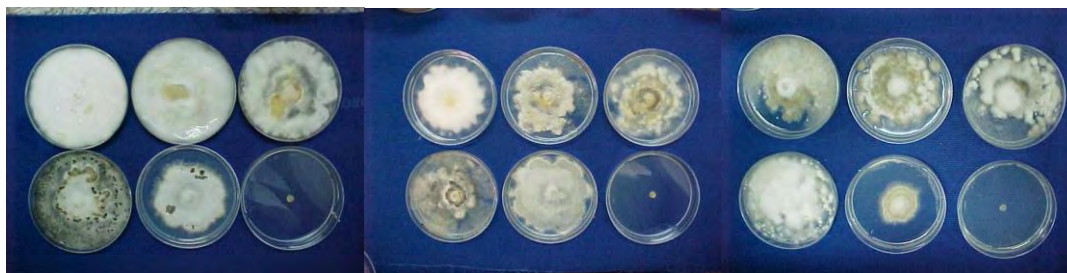


Figura 4. Comportamento do crescimento micelial dos isolados 1, 24 e 29 de *A. ricini*, nas temperaturas de 15, 20, 22, 25, 30 e 35°C de cima para baixo e da esquerda para a direita.

A estrutura vegetativa da população de *A. ricini* tem como temperatura ideal de crescimento a 25°C, sendo a média de crescimento de 2,2 cm (Figura 5). Para *B. cinerea*, a temperatura ideal de crescimento da população ficou a 20°C, com média de crescimento de 4,9 cm (Figura 6). Disto, observa-se que *B. cinerea* cresce mais em temperaturas baixas por volta de 20°C, em relação *A. ricini* que cresce em temperatura de 25°C e com baixo crescimento micelial em comparação com o *B. cinerea*.

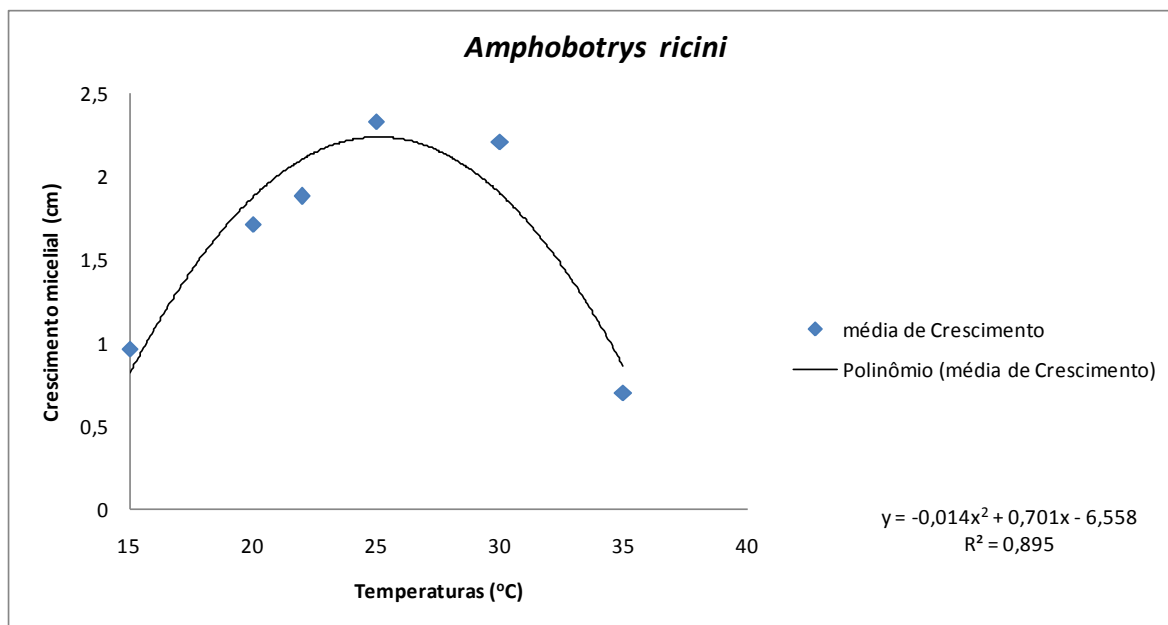


Figura 5. Curva de crescimento micelial da população de *A. ricini*, de mamoneira, em diferentes temperaturas.

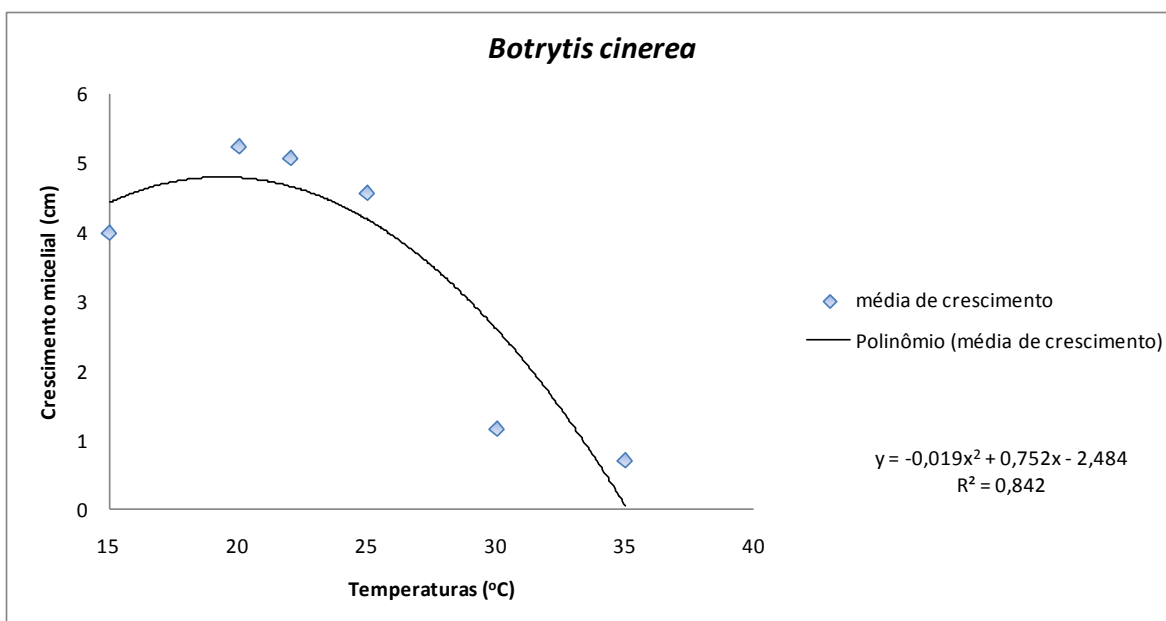


Figura 6. Curva de crescimento micelial da população de *B. cinerea*, de diferentes hospedeiros, em diferentes temperaturas.

### 6.3.2 Aspecto da colônia e formação de escleródios

A avaliação do aspecto das colônias de *A. ricini* e de *B. cinerea* foi realizada quando as colônias tinham 10 dias de crescimento, tempo esse adequado para o fungo expressar suas características em função do tamanho da colônia (Figura 7). As colônias de *A. ricini* apresentaram coloração branco-acinzentada, variando na intensidade de cinza de acordo com a intensidade da esporulação e da temperatura de crescimento. Quanto ao aspecto, as mesmas foram classificadas como cotonosa. Ainda apresentaram cor creme na borda e marrom-avermelhada no centro, quando visualiza o verso da placa de petri (Tabela 5), sendo a mesma característica descrita por Sussel (2008). Os dois isolados de *B. cinerea* apresentaram coloração cinza-escuro e compacta, na frente e no verso da placa (Tabela 5).

Os escleródios de *A. ricini* apresentaram coloração preta. Quanto a forma, os mesmos foram classificados como plano-convexo, achatado, rugoso, individualizado e agrupado (o escleródio apresentava um aspecto de uma massa única, não sendo possível sua medição). Em relação à distribuição na placa de petri, os escleródios foram classificados como: 1) toda a superfície da placa, 2) disperso irregularmente e 3) em torno do

centro da placa (Tabela 6). O meio de cultura utilizado foi o tipo BDA (Batata Dextrose Agar) (Figura 8). Godfrey (1923) e Chagas (2009) obtiveram abundante formação de escleródios no meio oatmeal-ágar.

Os escleródios de *B. cinerea* apresentaram, também, formato plano-convexo e alguns mais arredondados. Tais características já foram descritas por Hennebert (1973), Kwon et al. (2011) e Godfrey (1923) em seus respectivos trabalhos.

Em relação ao tamanho dos escleródios da população de *A. ricini*, os mesmos apresentaram valores médios de comprimento e largura variando de 2,87 x 1,93 mm (Tabela 7). Em relação ao comprimento, esses dados são semelhantes aos encontrados por Godfrey (1923), que relatou valores variando de 0,5 mm até 3 ou 4 mm. Sussel (2008) relatou a presença de escleródios com tamanhos variando de 0,5 a 5,0 mm de diâmetro.

Para os escleródios de *B. cinerea*, os valores obtidos no presente trabalho foram 1,90 x 1,68 mm, sendo tais valores próximos com os encontrados por Mirzaei et al. (2008).

Nem todos os isolados testados produziram escleródios (Tabela 6). Coley-Smith et al., (1980) relatam a importância dessa estrutura para a sobrevivência das espécies de *Botrytis*, podendo com ela resistir às mais adversas condições ambientais e produzir apotécio durante o processo sexual. Tais relatos podem valer para *A. ricini*, pois ambas as espécies, na sua forma perfeita, fazem parte do gênero *Botryotinia* e, provavelmente, se comportam da mesma maneira.

Tabela 5. Características culturais dos isolados de *A. ricini* e de *B. cinerea*. Botucatu – SP (2012).

Isolado	Aparencia da colônia		
	Cor frente da placa	Aspecto	Cor verso da placa
ISO-1	branco acinzentado	cotonoso	creme
ISO-2	branco	cotonoso	creme na borda e marrom avermelhado no centro
ISO-3	branco acinzentado	cotonoso	creme na borda e marrom avermelhado no centro
ISO-4	branco acinzentado	cotonoso	creme na borda e marrom avermelhado no centro
ISO-5	branco acinzentado	cotonoso	creme
ISO-6	branco acinzentado	cotonoso	creme
ISO-7	branco acinzentado	cotonoso	creme na borda e marrom avermelhado no centro
ISO-8	branco acinzentado	cotonoso	creme
ISO-9	branco acinzentado	cotonoso	creme
ISO-10	branco acinzentado	cotonoso	creme na borda e marrom avermelhado no centro
ISO-11	branco acinzentado	cotonoso	creme na borda e marrom avermelhado no centro
ISO-12	branco acinzentado	cotonoso	creme
ISO-13	branco acinzentado	cotonoso	creme
ISO-14	branco	cotonoso	creme na borda e marrom avermelhado no centro
ISO-15	branco acinzentado	cotonoso	creme
ISO-16	branco acinzentado	cotonoso	creme na borda e marrom avermelhado no centro
ISO-17	branco acinzentado	cotonoso	creme na borda e marrom avermelhado no centro
ISO-18	branco	cotonoso	creme
ISO-19	branco acinzentado	cotonoso	creme
ISO-21	branco acinzentado	cotonoso	creme na borda e marrom avermelhado no centro
ISO-22	branco acinzentado	cotonoso	creme na borda e marrom avermelhado no centro
ISO-23	branco acinzentado	cotonoso	creme
ISO-24	branco	cotonoso	creme
ISO-25	branco acinzentado	cotonoso	creme
ISO-26	branco acinzentado	cotonoso	creme
ISO-27	branco acinzentado	cotonoso	creme
ISO-28	branco	cotonoso	creme
ISO-29	branco acinzentado	cotonoso	creme
ISO-30	branco acinzentado	cotonoso	creme
ISO-31	Cinza escuro	compacto	cinza escuro
ISO-34	Cinza escuro	compacto	cinza escuro

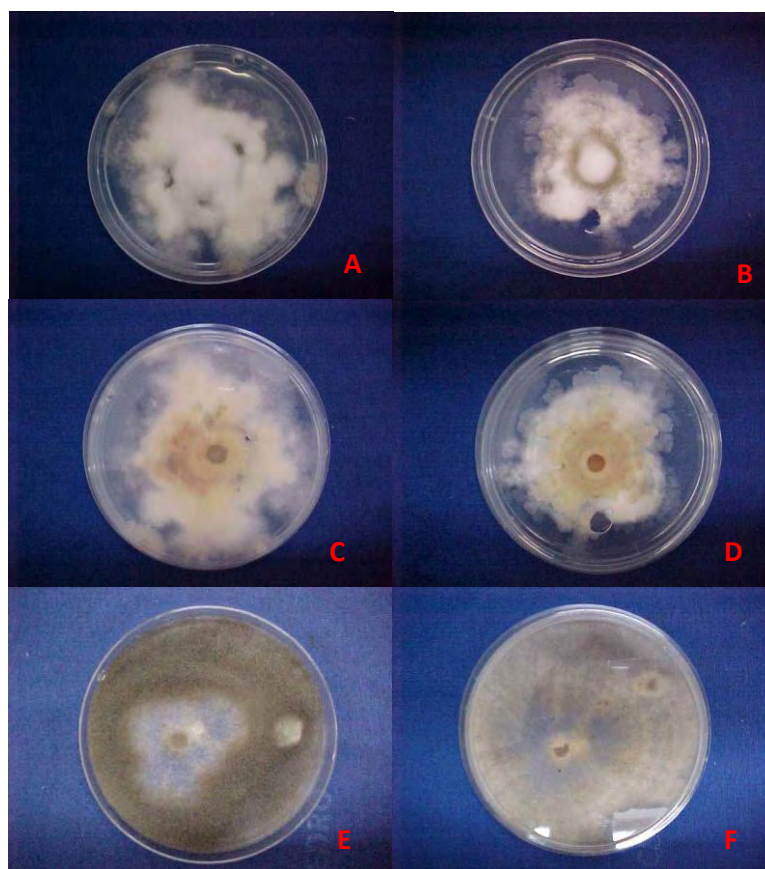


Figura 7. Aparência da colônia quanto a cor e aspecto. *A. ricini* - A e B: branco acinzentado e cottonoso (frente); C e D: creme na borda e marrom avermelhado no centro (verso). *B. cinerea* - E: cinza escuro e compacto (frente) e F: cinza escuro (verso).

Tabela 6. Características culturais dos escleródios de *A. ricini* e de *B. cinerea*. Botucatu - SP, 2012.

Isolado	Forma	Temperatura	Distribuição	Cor
ISO-1	individualizado, plano-convexo, rugoso	25°C	toda a superfície da placa	preto
ISO-2	agrupado, plano-convexo, rugoso	15°C, 25°C	toda a superfície da placa	preto
ISO-3	ausente	ausente	ausente	ausente
ISO-4	individualizado, plano-convexo, rugoso	15°C, 20°C, 22°C, 25°C	disperso irregularmente	preto
ISO-5	individualizado, plano-convexo, rugoso	15°C, 20°C, 25°C	disperso irregularmente	preto
ISO-6	individualizado, agrupado, plano-convexo, rugoso	15°C, 20°C, 22°C, 25°C	toda a superfície da placa	preto
ISO-7	individualizado, plano-convexo, rugoso	15°C, 20°C, 25°C	disperso irregularmente	preto
ISO-8	ausente	ausente	ausente	ausente
ISO-9	ausente	ausente	ausente	ausente
ISO-10	ausente	ausente	ausente	ausente
*ISO-11	individualizado, plano-convexo, rugoso	15°C, 20°C, 25°C, 30°C	disperso irregularmente	preto
ISO-12	ausente	ausente	ausente	ausente
ISO-13	ausente	ausente	ausente	ausente
ISO-14	ausente	ausente	ausente	ausente
ISO-15	ausente	ausente	ausente	ausente
ISO-16	ausente	ausente	ausente	ausente
ISO-17	ausente	ausente	ausente	ausente
ISO-18	ausente	ausente	ausente	ausente
ISO-19	individualizado, plano-convexo, rugoso	15°C, 20°C, 22°C, 25°C	disperso irregularmente	preto
ISO-21	ausente	ausente	ausente	ausente
ISO-22	ausente	ausente	ausente	ausente
ISO-23	ausente	ausente	ausente	ausente
**ISO-24	agrupado, plano-convexo, rugoso	25°C	em torno do centro da placa	preto
ISO-25	ausente	ausente	ausente	ausente
ISO-26	ausente	ausente	ausente	ausente
ISO-27	ausente	ausente	ausente	ausente
ISO-28	ausente	ausente	ausente	ausente
ISO-29	ausente	ausente	ausente	ausente
ISO-30	individualizado, plano-convexo, rugoso	25°C	em torno do centro da placa	preto
ISO-31	individualizado, plano-convexo, arredondado, rugoso	15°C, 20°C	disperso irregularmente	preto
ISO-34	ausente	ausente	ausente	ausente

\* quantidade insuficiente de escleródios para medição

\*\* medição não foi possível devido ao escleródio apresentar-se como uma massa única

Tabela 7. Comprimento e largura dos escleródios dos isolados de *A. ricini* e de *B. cinerea* Botucatu-SP, 2012.

Isolado	Escleródios					
	Comprimento (mm)			Largura (mm)		
	Média	Máximo	Mínimo	Média	Máximo	Mínimo
ISO-1	3,86	8,00	2,50	2,08	3,00	1,00
ISO-2	3,74	9,00	2,00	2,42	4,00	1,50
ISO-4	2,44	4,00	1,50	1,58	2,00	1,00
ISO-5	2,80	4,00	2,00	2,15	3,00	1,00
ISO-6	3,31	7,00	2,00	2,03	3,00	1,50
ISO-7	2,75	5,00	1,50	1,98	3,00	1,00
ISO-19	1,48	3,00	1,00	1,10	1,50	1,00
ISO-30	2,63	6,00	2,00	2,08	3,00	1,50
Média da População de <i>A. ricini</i>	2,87	5,75	1,81	1,93	2,81	1,19
ISO-31	1,90	2,50	1,00	1,68	2,00	1,00



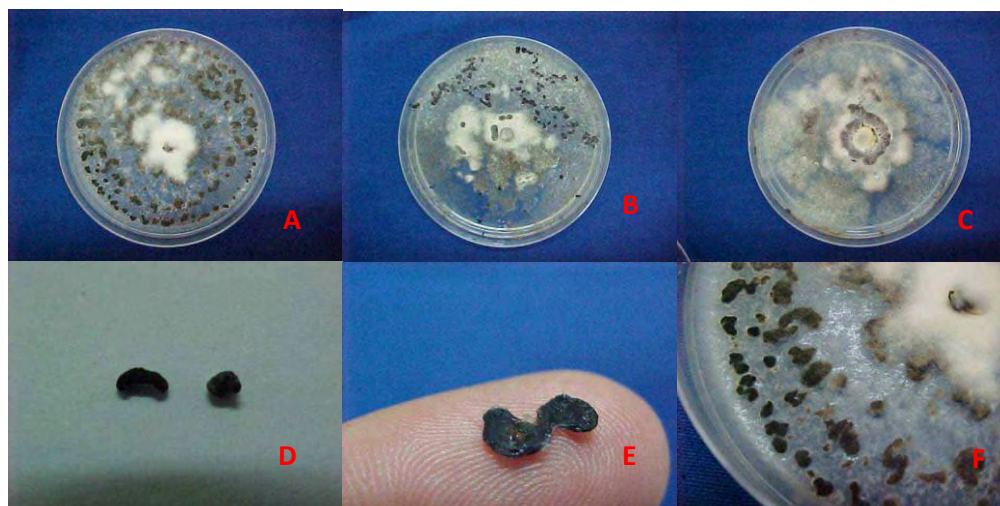


Figura 8. Distribuição de escleródios de *A. ricini* na superfície da placas de Petri em meio Batata-Dextrose-Ágar aos 25°C. A: toda a superfície da placa; B: disperso irregularmente e C: em torno do centro da placa. D: escleródio de *A. ricini* (esquerda) e de *B. cinerea* (direita), E: escleródio de *A. ricini* agrupado e F: escleródio em close.

## 6.4 Caracterização morfológica

### 6.4.1 Tamanho de conídios e conidióforos de *A. ricini* e de *B. cinerea*

Apesar da importância do mofo-cinzento causado pelo patógeno *A. ricini* na cultura da mamoneira, poucos são os estudos referentes às características morfológicas do mesmo. Dados sobre essas características são descritas nos trabalhos de Godfrey (1923) e de Hennebert (1973). No entanto, nenhum outro trabalho foi realizado utilizando diferentes isolados de distintas regiões do país, em busca de novas informações a respeito de possíveis diferenças morfológicas.

A população dos isolados de *A. ricini* apresentou diâmetro médio de conídio de 5,82µm, com valor mínimo de 4,24 µm e máximo 7,49 µm. (Tabela 8 e Figura 9).

Essas características confirmam o observado por Hennebert (1973), que relatou dimensões de conídios de 6 a 12 µm, normalmente 7 a 10 µm. Godfrey (1923) descreveu que microconídios apresentaram dimensões de 2 a 3,5 µm. Outras características como formato do tipo globoso, sub-hialino chegando a castanho, lisos também foram observados nos isolados avaliados, da mesma forma como descrito nos trabalhos anteriores.

Quanto a população de *B. cinerea*, as dimensões dos conídios foram descritas em comprimento e largura, pois os mesmos apresentaram um formato do tipo elipsóide. Os dados mostraram as seguintes características dos conídios: comprimento médio de (10,18  $\mu\text{m}$ ) X largura média (7,38  $\mu\text{m}$ ), com variação máxima de 13,68  $\mu\text{m}$  e mínima de 7,17  $\mu\text{m}$  de comprimento. Em relação largura, os valores foram máxima de 9,69  $\mu\text{m}$  e mínima de 5,97  $\mu\text{m}$  (Tabela 9 e Figura 9). Esses dados foram obtidos com os isolados mantidos em temperatura de 20°C e corroboram com os encontrados por Pezet e Pont (1990) trabalhando com conídios de *B. cinerea*, obtendo as medidas de 10 x 8,5  $\mu\text{m}$ . Mirzaei et al. (2007), trabalhando com 355 isolados de *Botrytis* sp., obtiveram valores para alguns dos isolados próximos aos descritos neste trabalho. Outras características como formato do conídio do tipo elíptico, subhialino, também foram encontrados e corroboram com o que Hennebert (1973) descreveu, reforçando essa classificação da população formada pelos isolados 31 e 34 como pertencentes à espécie *B. cinerea*.

Tabela 8 . Diâmetros de conídios dos isolados de *A. ricini*.

Isolados	Conídios		
	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )		
	Média	Máximo	Mínimo
ISO-1	5,36	7,70	3,03
ISO-2	5,84	7,70	3,72
ISO-3	5,97	7,91	3,72
ISO-4	5,25	7,54	3,03
ISO-5	6,79	9,10	5,12
ISO-6	5,92	7,44	5,12
ISO-7	6,11	7,44	4,65
ISO-8	5,51	6,82	4,42
ISO-9	5,43	6,76	3,96
ISO-10	6,85	10,00	5,35
ISO-11	5,19	6,75	3,76
ISO-12	5,41	6,97	3,72
ISO-13	5,17	8,35	3,33
ISO-14	6,09	7,68	4,43
ISO-15	2,72	3,52	2,33
ISO-16	5,45	7,21	3,27
ISO-17	5,57	6,85	2,72
ISO-18	5,57	6,85	2,72
ISO-19	6,03	7,94	4,19
ISO-21	6,34	7,69	5,14
ISO-22	6,43	7,45	5,12
ISO-23	5,40	6,53	3,50
ISO-24	6,27	7,20	4,87
ISO-25	6,31	8,61	4,89
ISO-26	6,18	7,90	5,34
ISO-27	7,21	8,64	6,28
ISO-28	5,99	7,23	5,13
ISO-29	6,51	7,66	5,34
ISO-30	6,03	7,69	4,66
<b>Média da População</b>	<b>5,82</b>	<b>7,49</b>	<b>4,24</b>

Tabela 9. Comprimento e largura dos conídios dos isolados de *B. cinerea*.

Isolados	Conídios					
	Comprimento ( $\mu\text{m}$ )			Largura ( $\mu\text{m}$ )		
	Média	Máximo	Mínimo	Média	Máximo	Mínimo
ISO 31	11,38	15,09	7,67	7,99	11,05	6,60
ISO 34	8,98	12,26	6,66	6,78	8,32	5,34
<b>Média da População</b>	<b>10,18</b>	<b>13,68</b>	<b>7,17</b>	<b>7,38</b>	<b>9,69</b>	<b>5,97</b>

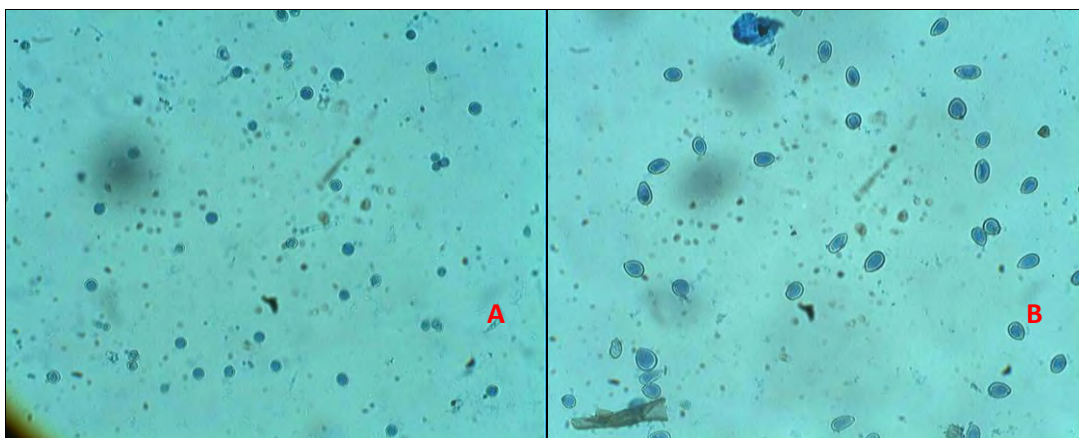


Figura 9. A: Conídios globosos de *A. ricini*. B: Conídios elipsoidais e globosos de *B. cinerea*. Barra (50  $\mu\text{m}$ ).

#### 6.4.2 Comprimento de conidióforos

Os dados obtidos quanto ao comprimento dos conidióforos da população de *A. ricini* (Tabela 10) variaram da seguinte forma: comprimento médio de 1159,24  $\mu\text{m}$ , máxima de 2385,32  $\mu\text{m}$  e mínima de 519,34  $\mu\text{m}$ .

Não foi possível comparar esses resultados, devido ao fato de que nos trabalhos de Hennebert (1973) e de Godfrey (1923), esses autores não relatam essa avaliação, mas descrevem as seguintes características observadas tais como: conidióforos do tipo ereto, simples, ligeiramente marrom, comprido, septado, a partir da metade do comprimento torna-se bifurcado num ângulo amplo, ramificações quase simétricas (dicotômico), podendo ocorrer até quatro divisões. Os internódios tornam-se mais curtos a partir da primeira bifurcação (Figura 10). Essas características, também, foram observadas em todos os isolados avaliados neste trabalho.

A população de *B. cinerea* apresentou os seguintes valores (mínimo); (médio) e (máximo): (455,94  $\mu\text{m}$ ), (1031,29  $\mu\text{m}$ ) e (1987,89  $\mu\text{m}$ ); Esses resultados são bem próximos aos obtidos por Mirzaei et al. (2007) e Khazaeli et al. (2010) trabalhando com isolados de gênero *Botrytis* no Iran.

Os conidióforos de *Botrytis* sp. apresentaram outras características como ramificação do tipo alternada, coloração do tipo subhialina para marrom, septados e

eretros (Figura 10). Essas características estão de acordo com as encontradas por Hennebert (1973).

Jarvis (1977) relatou que tradicionalmente a taxonomia dos fungos do gênero *Botrytis* tem se baseado nas características morfológicas e culturais. Entretanto Menzinger (1966a e 1966b) citado por Mirzaei et al. (2007) relatou em sua revisão da taxonomia de espécies de *Botrytis*, que condições culturais poderiam modificar consideravelmente as características taxonômicas, tais como dimensão e formato do conídio e que a mudanças de temperatura afetam a forma e características da colônia. Possivelmente, essas alterações possam afetar, também, os isolados de *A. ricini*. Dessa maneira, apesar dos resultados obtidos na caracterização morfológica e cultural indicarem que os isolados pertencem às espécies *A. ricini* e *B. cinerea*, caracterizações moleculares são necessárias para confirmar, definitivamente, o que foi observado neste trabalho, pois não foi possível agrupar os isolados por região de coleta, devido ao fato dos valores do comprimento dos conidióforos apresentarem valores próximos e dentro dos parâmetros taxonômicos já estudados para *B. cinerea*, e para *A. ricini* não há dados comparativos, sendo a separação entre as duas espécies feita apenas de forma visual.

Tabela 10. Comprimentos do conidióforo de *A. ricini* e de *B. cinerea*. Botucatu-SP. 2012.

Isolados	Conidióforo			
	Comprimento ( $\mu\text{m}$ )			Ramificação
	Média	Máximo	Mínimo	
ISO-1	1581,25	3464,83	624,99	Dicotômico
ISO-2	1358,04	2940,85	507,78	Dicotômico
ISO-3	1090,55	2330,96	705,19	Dicotômico
ISO-4	1102,75	2437,89	535,06	Dicotômico
ISO-5	1247,62	2751,89	449,76	Dicotômico
ISO-6	1038,21	2852,91	586,65	Dicotômico
ISO-7	1212,92	2286,10	336,62	Dicotômico
ISO-8	990,24	3390,48	553,22	Dicotômico
ISO-9	1024,89	1926,28	529,00	Dicotômico
ISO-10	1482,40	2100,31	782,19	Dicotômico
ISO-11	1459,68	3399,45	745,33	Dicotômico
ISO-12	1247,59	1884,11	517,85	Dicotômico
ISO-13	1233,60	2893,81	402,16	Dicotômico
ISO-14	1296,93	2540,35	458,87	Dicotômico
ISO-15	1200,61	2079,38	547,95	Dicotômico
ISO-16	1086,63	2793,91	413,69	Dicotômico
ISO-17	1040,88	2048,93	687,85	Dicotômico
ISO-18	403,90	881,42	157,63	Dicotômico
ISO-19	1141,48	1878,91	534,71	Dicotômico
ISO-21	1169,55	2216,13	416,49	Dicotômico
ISO-22	926,64	2063,02	119,24	Dicotômico
ISO-23	1158,87	1581,25	403,90	Dicotômico
ISO-24	956,96	1593,77	476,75	Dicotômico
ISO-25	1362,28	3266,21	672,60	Dicotômico
ISO-26	1055,53	2687,44	336,39	Dicotômico
ISO-27	1046,44	1990,08	580,31	Dicotômico
ISO-28	1344,57	2681,11	672,29	Dicotômico
ISO-29	1083,08	1828,06	682,28	Dicotômico
ISO-30	1273,80	2384,36	623,99	Dicotômico
Média da População <i>A. ricini</i>	1159,24	2385,32	519,34	Dicotômico
ISO-31	1227,99	2544,57	502,38	Alternado
ISO-34	834,59	1431,21	409,49	Alternado
Média da População <i>B. cinerea</i>	1031,29	1987,89	455,94	Alternado

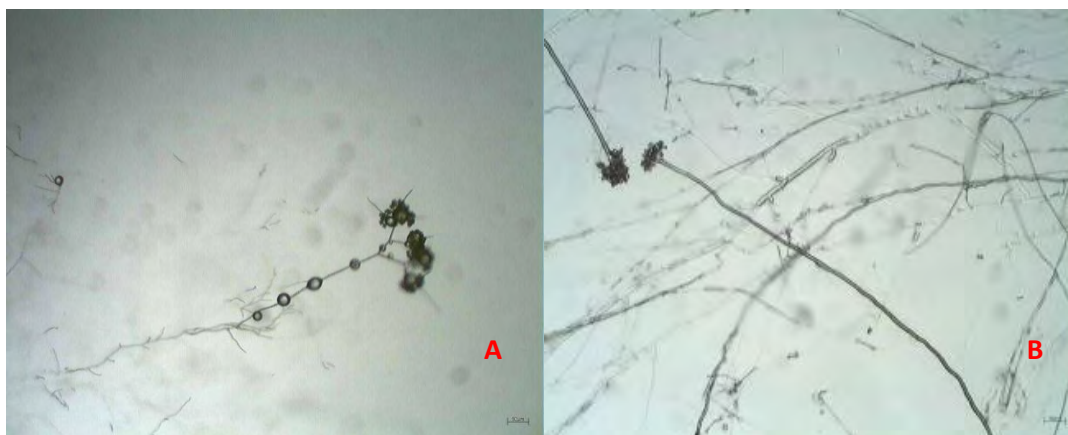


Figura 10. A: Conidióforo de *A. ricini*; B: Conidióforo de *B. cinerea*. Barra = (50  $\mu$ m).

### 6.5 Caracterização enzimática

Poucos são os estudos envolvendo quais são as enzimas extracelulares produzidas por *A. ricini*. O que se sabe a respeito é que o fungo não penetra no fruto através da cutícula ou estômatos. Para isso, o mesmo utiliza-se de enzimas hidrolíticas, como as pécnicas e celulolíticas (THOMAS; ORELLANA, 1963).

Para que um patógeno consiga infectar uma planta, é necessário que o mesmo consiga penetrar e colonizar os tecidos do hospedeiro, retirar os nutrientes necessários para sua sobrevivência, bem como neutralizar as reações de defesa da planta, utilizando-se, para isso, de enzimas, toxinas e hormônios (PASCHOLATI, 1995). Dessa forma, as enzimas estão entre as substâncias relacionadas à patogênese. De acordo com Bocchese et al. (2003), a análise da produção enzimática de fungos, em meio de cultura sólido, torna-se um método simples e rápido para constatar variantes genéticas em uma população, pela presença ou ausência de enzimas específicas.

Para a enzima carboximetil–celulase (CMCase), observou-se que a maioria dos isolados de mamoneira (*A. ricini*) produziram essa enzima, sendo que apenas um (30) não a produziu o que também foi observado para os isolados de *B. cinerea* (Tabela 11). Ruegger e Tauk-Tornisiel (2004) também relataram a não formação de halo em linhagens do gênero *Trichoderma*. A mesma situação é descrita por Bortolazzo (2011), que trabalhando com o isolado *T. reesei* QM 9414, não observou a formação do halo de hidrólise.

Quanto aos isolados 31 e 34 de *B. cinerea*, a não produção da enzima celulase pode estar relacionada as seguintes hipóteses: 1) falha da metodologia utilizada; 2) o patógeno só produza a enzima em contato com o hospedeiro; 3) aos dois isolados terem sido testados na temperatura de 25°C; e 4) eles, realmente, não são produtores dessa enzima.

De acordo com Kapat et al (1998), apesar da celulose ser o maior componente da parede celular da planta, nenhum estudo detalhou o papel da celulase sintetizada *in vitro* em *B. cinerea* nos processos de patogênese, apesar do estudo ter relatado alta atividade de CMCase nos estágios iniciais de infecção, que ajudaria o patógeno a conseguir acesso às camadas mais internas do hospedeiro.

Todos os isolados de *A. ricini* produziram a enzima lipase e houve diferenças estatísticas entre eles, com exceção novamente do isolado 31 que não produziu a enzima citada, talvez devido aos mesmos problemas relatados anteriormente. Os isolados 2 e 24 apresentaram a maior área da coroa circular com os valores absolutos de 19,16 mm<sup>2</sup> e 18,20 mm<sup>2</sup>, respectivamente, mas não diferindo estatisticamente dos isolados 1,7,13,16,17,18,21,22,25,26,29. Assis et al. (2010) trabalhando com isolados de *C. gloeosporioides* em frutos de manga, também verificaram atividade da enzima lipase em todos os isolados testados, porém com baixa intensidade, apresentando valor médio do halo de 7,50 mm. Firmino (2011), trabalhando com isolados de *Ceratocystis* sp. que causa murcha em eucalipto, observou que eles não produzem a enzima. Bueno et al. (2009), trabalhando com isolados de *Fusarium solani*, causador da prodridão do colo em maracujazeiro obtiveram variações na produção da enzima.

As espécies fúngicas maiores produtoras de lipase pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizomucor*, *Rhizopus* e *Thermomyces* (OLIVEIRA, 2000). E de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, *A. ricini*, também é uma espécie fungica produtora de lipase.

A importância da lipase pode estar relacionada com a modificação das ceras e cutícula, e na adesão do conídio na superfície da planta (COMMÉNIL et al., 1997 e 1998). As lipases têm grande importância fisiológica, uma vez que hidrolisam óleos e gorduras em ácidos graxos livres, monoglicérides e diglicérides, essenciais aos processos metabólicos, como o transporte dos ácidos graxos e sua oxidação e síntese de glicérides e fosfolipídios (REED, 1975).



A enzima pectinase foi a que apresentou os maiores valores de área da coroa circular e a que mais apresentou diferenças estatísticas entre os isolados testados. Isto indica que a produção dessa enzima é importante para o sucesso do patógeno em colonizar o tecido do hospedeiro. Os isolados 2 e 4 foram os que tiveram os melhores resultados, com áreas da coroa circular de 49,12 mm<sup>2</sup> e 48,38 mm<sup>2</sup> respectivamente. Os resultados encontrados neste trabalho não surpreendem, pois as enzimas que atacam substâncias pécicas na parede celular da planta provavelmente desempenham um papel importante na patogenicidade (CLARK; LORBEER, 1976; COLE et al., 1998; COLLMER; KEEN, 1986). *B. cinerea* possui uma série de enzimas que degradam a parede celular (EDPC), incluindo pectina liase (MOVAHEDI; HEALE, 1990), pectina metilesterase (REIGNAULT et al., 1994; VALLETE-COLLET et al., 2003), exo e endo-poligalacturonase (JOHNSTON; WILLIAMSON, 1992) e celulase (BARKAI-GOLAN et al., 1988).

Ramos et al. (2010) obtiveram os seguintes resultados quando trabalharam com o isolado BAFC 3097 de *Colletotrichum truncatum*, analisando enzimas pectinolíticas: como poligalacturonase (PG) (1,08 U/mL), Polimetilgalacturonase (PMG) (1,05 U/mL) e pectina liase (PL) (1,56 U/mL), durante o período de 7-10 dias. Nesse mesmo trabalho foi percebido que a atividade máxima da PG e PMG precediam o dia máximo de crescimento do patógeno. A atividade máxima de PL era simultânea ou após o pico de crescimento. Outros trabalhos também tiveram resultados semelhantes como em *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (MARTÍNEZ et al., 1991) e *Botrytis cinerea* (MARTÍNEZ et al., 1988). Esses resultados indicam que algumas isoformas de endoPG atuam de forma biotrófica, sem causar extensiva maceração ao tecido, enquanto outras formas isoenzimáticas predominam na fase necrotrófica, como é o caso da pectina liase.

Para a enzima protease, os isolados 13 e 27 foram os que mais produziram, com valores de 24,04 mm<sup>2</sup> e 25,76 mm<sup>2</sup>, seguidos dos isolados 24 (18,49 mm<sup>2</sup>) e 30 (19,09 mm<sup>2</sup>). De acordo com Valueva e Mosolov, (2004), muitos microrganismos fitopatogênicos produzem proteases extracelulares ativas que, em conjunto com outras enzimas tais como poligalacturonases, pectoliasas e xilanases, exercem um importante papel na patogênese, pois podem atuar na hidrólise de proteínas da membrana e da parede celular de plantas hospedeiras, facilitando a penetração e a infecção.

Tabela 11. Enzimas extracelulares produzidas por isolados de *A. ricni* e de *B. cinerea* em meios específicos, em condições de ensaio *in vitro*. Botucatu-SP, 2012.

Isolados	Enzimas			
	Celulase	Lipase	Pectinase	Protease
Área da coroa circular (mm <sup>2</sup> )				
1	12,88 b <sup>1</sup>	16,65 a	34,72 d	8,93 e
2	14,86 b	19,16 a	49,12 a	11,32 d
3	8,12 d	13,83 b	38,44 c	8,20 e
4	17,02 a	12,83 b	48,38 a	14,08 c
5	11,65 c	13,87 b	36,14 c	15,00 c
6	8,10 d	13,44 b	43,19 b	11,70 d
7	13,25 b	15,24 a	35,76 c	10,04 e
8	7,36 d	11,92 c	37,99 c	9,16 e
9	13,75 b	14,43 b	32,49 d	11,93 d
10	11,39 c	12,10 c	40,08 b	9,21 e
11	9,00 d	14,01 b	41,40 b	11,56 d
12	11,83 c	13,70 b	31,44 d	8,47 e
13	12,52 b	16,42 a	13,01 f	24,04 a
14	13,80 b	11,85 c	32,49 d	11,18 d
15	17,06 a	10,38 c	42,74 b	10,76 e
16	17,27 a	14,62 a	46,16 a	12,16 d
17	14,26 b	15,61 a	29,43 d	11,17 d
18	17,26 a	16,92 a	34,28 d	12,55 d
19	10,29 c	13,88 b	32,94 d	9,81 e
21	15,33 a	15,37 a	15,30 f	10,56 e
22	11,79 c	15,31 a	32,33 d	9,38 e
23	13,54 b	10,96 c	37,70 c	9,49 e
24	12,89 b	18,20 a	33,53 d	18,49 b
25	16,15 a	16,43 a	39,91 b	13,16 d
26	15,57 a	15,84 a	31,44 d	9,10 e
27	13,02 b	13,01 b	43,11 b	25,76 a
28	13,27 b	14,37 b	36,95 c	10,36 e
29	11,30 c	15,99 a	42,45 b	10,00 e
30	0,00 e	14,01 b	34,27 d	19,09 b
31	0,00 e	0,00 d	13,61 f	13,20 d
34	0,00 e	10,24 c	42,97 b	15,31 c
Testemunha	0,00 e	0,00 d	0,00 g	0,00 f
CV%	15,54			

<sup>1</sup>Médias seguidas de letra igual na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott- Knott à 5% de probabilidade

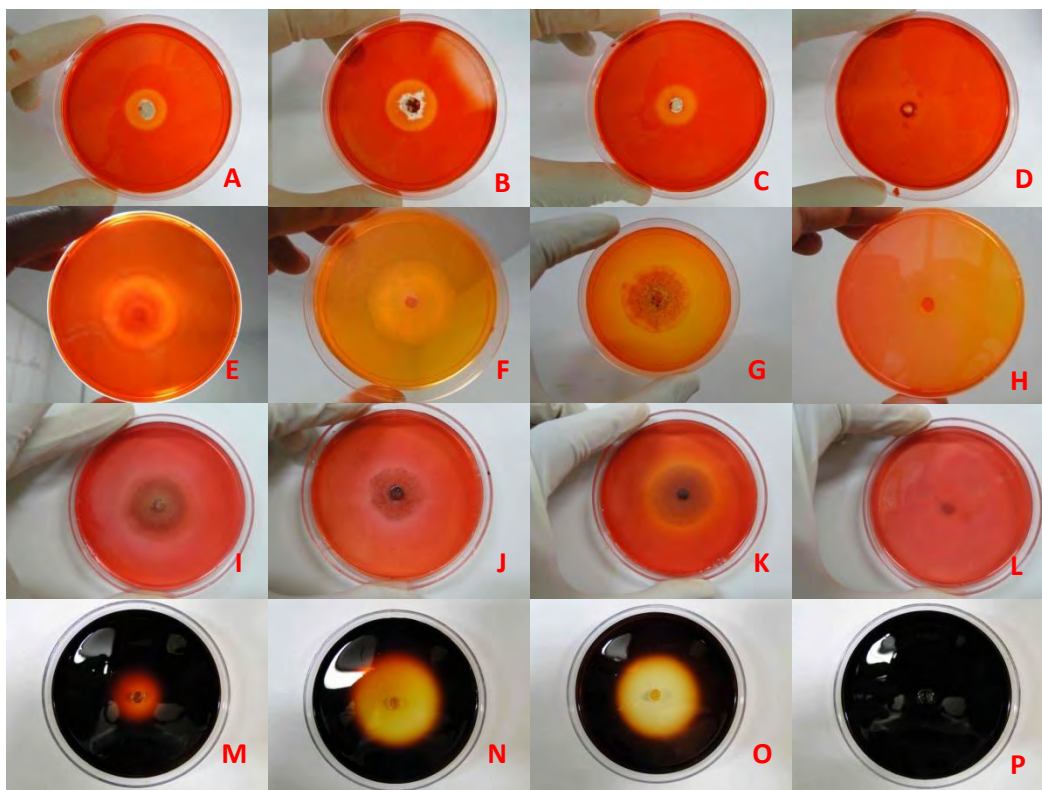


Figura 11. Teste enzimático com formação de halo ao redor da área de crescimento micelial de isolados de *A. ricini* das enzimas celulase (A, B, C) e (D) testemunha; lipase (E, F, G) e testemunha (H); protease (I, J, K,) e testemunha (L); pectinase (M, N,O) e testemunha (P).

### 6.6 Caracterização molecular dos isolados

Com base no sequenciamento da regiões ITS do rDNA das amostras coletadas, 13 isolados foram identificados como *A. ricini* e dois isolados foram identificados como *B. cinerea*, sendo que estes resultados corroboram com os obtidos nas análises morfológicas e culturais, onde estes isolados demonstraram estruturas características de seus gêneros.

Análises filogenéticas dos DNA dos isolados trabalhados permitiram distinguir de forma clara os isolados pertencentes a espécies *A. ricini* dos isolados identificados como *B. cinerea*, os quais formaram grupos bem distintos, como pode ser visto na figura 12. Este fato confirma a reclassificação de alguns fungos do gênero *Botrytis* para o gênero *Amphobotrys* proposta por Hennebert (1973).

Dentro do grupo formado por espécies do gênero *Botrytis* é possível observar o enquadramento dos isolados 31 e 34 obtidos de *Euphorbia pulcherrima* e *Eucaliptus grandis*, respectivamente, os quais se agruparam próximos das espécies de *Botrytis cinerea* e *Botrytionia fuckeliana* (forma perfeita de *Botrytis cinerea*), ambas isoladas de plantas de uva (RWAHNIH et al., 2011) (Tabela 12). A proximidade entre espécies deste fungo independente do hospedeiro já é relatada na literatura. Staats, Van Baarlen e Van Kan (2005), ao estudarem a evolução de mais de 22 espécies de *Botrytis*, chegaram à conclusão de que, até o momento, não há nenhuma evidência da especiação de espécies *Botrytis* e seus hospedeiros. Segundo alguns autores, a explicação para esta falta de especificidade está no fato de diferentes espécies de plantas crescerem e ocuparem o mesmo habitat, possibilitando, deste modo, a adaptação do fungo a diferentes hospedeiros (ROY 2001; NIKOH; FUKATSU, 2000). Este fato explica o que foi observado no teste de patogenicidade, o qual apontou que os isolados 31 e 34, de *B. cinerea* apesar de não terem sido isolados de mamona, foram capazes de colonizar e causar doença em plantas desta espécie.

Em relação ao grupo formado pelo gênero *Amphobotrys*, é possível observar uma distância genética significativa (bootstrap igual a 99%) entre os isolados estudados de *A. ricini* do isolado deste mesmo fungo oriundo da China (327422168), indicando uma possível diversidade genética deste fungo conforme o local da coleta. Esta diversidade genética ligada ao local de origem é também observada entre os isolados trabalhados, pois como pode ser visto na figura 11, os isolados provenientes de Botucatu (ISO-1, 4), Bariri (ISO-6, 7) e São Manuel (ISO-10, 11), formaram um clado separado dos isolados coletados de outras regiões. É importante ressaltar que estas cidades são relativamente próximas, podendo este ser o motivo da proximidade dos isolados provindos delas. Uma outra hipótese dessa baixa variabilidade é devido ao fato de *A. ricini* se reproduzir de forma assexuada, não havendo relatos a respeito da forma sexuada do patógeno no Brasil, pois o mesmo precisa de condições climáticas específicas. Essa característica aliada a dispersão dos conídios do patógeno pelo vento (migração gênica), (GARRIDO; SONEGO, 2005; MILANI et al., 2005) reforçam o fato do agrupamento dos isolados provindos destas cidades tão próximas.

Ainda dentro do grupo formado pelo gênero *Amphobotrys* nota-se a formação de sub-grupos formados pelos isolados provenientes das seguintes cidades:

Campina Grande-PB (ISO- 16, 17); Lavras- MG (ISO-19); Primavera do Leste- MT (ISO- 22); Vicentinópolis distrito de Santo Antônio de Aracanguá-SP (ISO- 24, 27) e Nova Canãa Paulista – SP (ISO- 29), apontando que pode haver uma certa variabilidade genética entre esses isolados, visto que estes não formaram clados distintos entre si. Bezerra (2007), ao tentar selecionar marcadores do tipo RAPD para análise de variabilidade genética de *A. ricini*, encontrou alguns marcadores que indicam polimorfismo entre isolados coletados em diferentes cidades, porem o outro aponta baixa variabilidade genética entre os isolados coletados deste fungo, diferente do que foi obtido no presente trabalho. Isso pode ser explicado pelas diferentes técnicas usadas. A técnica de RAPD, apesar de ter sido muito usada, vem sendo deixada de lado, visto que esta tem como principal limitação o baixo conteúdo de informação genéticas detectadas, pois na maioria dos casos, somente um alelo é detectado. Além disso esta técnica não trabalha com uma região do DNA específica e, sim, com o princípio de amplificação ao acaso, diferente da técnica de PCR, usada neste trabalho, na qual sabe-se exatamente onde o primer irá se alinhar (BORÉM e CAIXETA, 2009).

Apesar das regiões ITS serem muito utilizadas para taxonomia de fungos (GERBI, 1985) e terem sido muito eficientes na identificação dos isolados utilizados neste trabalho, genes como o da  $\beta$ -tubulina e da  $\alpha$ -elongase podem ser utilizados para complementar os trabalhos filogenéticos e evolutivos entre as espécies de *A. ricini* e de *B. cinerea*, visando a obter mais informações sobre o patógeno para futuros programas de melhoramento para a cultura da mamoneira.

Tabela 12. Isolados usados para montagem da árvore filogenética.

<b>Espécie</b>	<b>Origem</b>	<b>Identificação no Genbank</b>
<i>Amphobotrytis ricini</i>	China	GI327422168
<i>Botrytis cinerea</i>	Itália	AJ716294
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	Califórnia	HM849615
<i>Botrytis anthophila</i>	Holanda	AJ716305
<i>Botrytis sphaerosperma</i>	Reino Unido	AJ716293
<i>Botrytis porri</i>	-	AJ716292
<i>Botrytis calthae</i>	U.S.A	AJ745671
<i>Botrytis aclada</i>	-	AJ745665
<i>Botrytis polyblastis</i>	Reino Unido	AJ716291
<i>Botrytis convoluta</i>	Holanda	AJ716304
<i>Botrytis tulipae</i>	Holanda	AJ716293
<i>Botrytis tulipae</i>	Holanda	AM235313
<i>Monilinia fructigena</i>	China	UE520073

( - ) não disponível

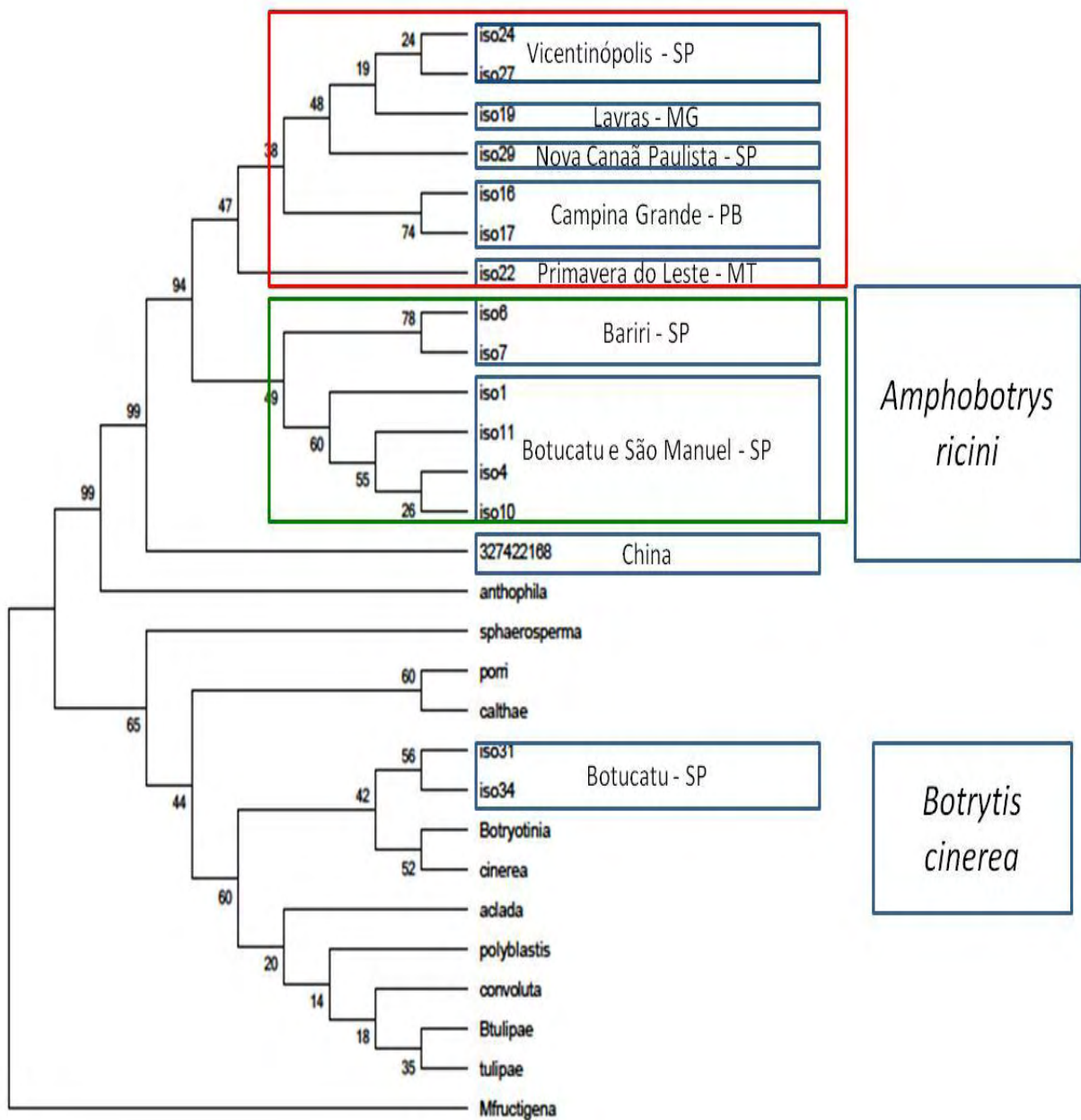


Figura 12. Dendrograma gerado por “Neighborg-Joining” ilustrando a homologia nas sequências de nucleotídeos das regiões ITS1, ITS2 de 13 isolados de *A. ricini*, causador do mofo cinzento da mamoneira e dois isolados de *Botrytis cinerea* (ISO-31 e ISO-34).

### 6.7 Controle *in vitro* do crescimento micelial de *Amphobotrys ricini* utilizando diferentes fungicidas e controles alternativos

As tabelas 13 e 14 demonstram, respectivamente, a porcentagem de inibição de crescimento micelial (PIC's) do fungo frente aos fungicidas testados e a dose efetiva média (ED<sub>50</sub>), nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 µL/L sobre o isolado ISO- 24 de *A. ricini*.

Na concentração de 1 µL/L, os fungicidas azoxistrobina + epoxiconazol, piraclostrobina + epoxiconazol, procloraz e tebuconazol apresentaram inibição total do crescimento micelial do isolado.

Caldari Junior (1998), trabalhando com azoxistrobina, sobre *B. cinerea* fungicida do grupo das estrobirulinas, encontrou valores de ED<sub>50</sub> variando de 0,1 µL/L até 1000 µL/L. Partindo dessa observação, o autor relata que o composto não tem nenhuma ou pouca influência no crescimento micelial do fungo *in vitro* em seu trabalho.

Chagas (2009) estudando o patossistema mamoneira *versus A. ricini* encontrou valores de ED<sub>50</sub> para azoxistrobina maiores que 50 µL/L, confirmando a baixa ação do composto.

Provavelmente, o atual resultado encontrado neste trabalho possa vir do fato do ingrediente ativo azoxistrobina formar um composto com o ingrediente ativo epoxiconazol, dessa maneira controlando melhor o patógeno. Portanto, a azoxistrobina deve estar combinada com epoxiconazol para ser eficiente sobre *A. ricini*.

Na concentração de 10 µL/L, o único fungicida que apresentou baixa porcentagem de inibição de crescimento (PIC) do fungo *A. ricini* foi o iprodione, quando comparado com os demais (75%). O mesmo não foi constatado por Chagas (2009), quando o mesmo testou o fungicida, no controle do crescimento micelial de um diferente isolado de *A. ricini* obtendo 100% de inibição, em todas as concentrações avaliadas.

Na concentração de 100 µL/L, nenhum dos fungicidas diferiram estatisticamente entre si, apesar do tratamento difenoconazol, procimidone e iprodione, apresentarem valores inferiores a 100% de inibição. Caldari Junior (1998) verificou extrema sensibilidade de isolados de *B. cinerea* quando trabalhou com o fungicida difenoconazol, mas em contra partida alguns isolados cresceram no meio com 100 e/ou 1000 ppm do fungicida.



De acordo com Kimura (1999), fungicidas pertencentes ao grupo dos DMI's (inibidores de reação de demetilação), como os triazóis, podem vir a selecionar linhagens resistentes, quando as condições ambientais forem favoráveis, como, por exemplo, em sistemas de produção altamente intensivo. Stehmann e De Waard (1996) também advertem sobre o uso de fungicidas do grupo dos triazóis no controle de mofo-cinza no campo, que pode ficar limitado devido à seleção de mutantes resistentes.

Todos os fungicidas testados apresentaram, na concentração de 1000  $\mu\text{L/L}$ , total inibição no crescimento micelial do isolado. Quanto a dose efetiva mediana ( $ED_{50}$ ), todos os fungicidas testados tiveram o valor  $< 1 \mu\text{L/L}$  (Tabelas 13 e 14). Os mesmos resultados de  $ED_{50}$  foram obtidos por Kimura (1999) e Ghini (1996), trabalhando com isolados de *B. cinerea*, porém ambos tiveram valores de CMI (concentração mínima inibitória) acima de 1000 ppm e 100 ppm, respectivamente, indicando uma provável adaptação do patógeno à pressão de seleção dos fungicidas.

Tavares e Souza (2005) obtiveram resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho, com os fungicidas procloraz, tebuconazol e propiconazol com  $ED_{50}$  menor que  $1\mu\text{L/L}$ , sendo eficientes no controle *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*, causador da antracnose do mamoneiro.

No presente trabalho, o fungicida procimidone apresentou diferenças na porcentagem de inibição de crescimento micelial quando foi analisado entre as quatro concentrações testadas. Na concentração de 100  $\mu\text{L/L}$ , a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) foi de 92,75% e na de 10  $\mu\text{L/L}$ , a PIC foi de 100,00%, indicando uma alteração da sensibilidade ao fungicida. Dos fungicidas testados, os que apresentaram 100% de inibição em todas as concentrações testadas foram azoxistrobina + epoxiconazol, piraclostrobina + epoxiconazol, procloraz e tebuconazol (Tabelas 13 e 14).

A figura 13 apresenta o comportamento do crescimento micelial de *A. ricini* sob a influência de diferentes concentrações de fungicidas.

Vale ressaltar que diferenças de ação de fungicidas sobre um mesmo fungo deve-se a falta de padronização sobre um mesmo isolado, pois a população do fungo apresenta grande variabilidade, conforme dados das caracterizações morfo-culturais e molecular.

Tabela 13. Porcentagem de inibição de crescimento micelial (PICs) de *A. ricini* (ISO- 24) em diferentes concentrações de fungicidas. Botucatu-SP, 2012

Tratamentos	Concentração (µL/L)			
	1	10	100	1000
	(PIC%)			
Azoxistrobina + Epoxiconazol	100,00 Aa <sup>1</sup>	100,00 Aa	100,00 Aa	100,00 Aa
Difenoconazol	88,17 Bb	100,00 Aa	99,03 Aa	100,00 Aa
Iprodione	69,68 Bc	75,00 Bb	97,1 Aa	100,00 Aa
Piraclostrobina + Epoxiconazol	100,00 Aa	100,00 Aa	100,00 Aa	100,00 Aa
Procimidone	84,66 Cb	100,00 Aa	92,75 Ba	100,00 Aa
Procloraz	100,00 Aa	100,00 Aa	100,00 Aa	100,00 Aa
Propiconazol	98,55 Aa	100,00 Aa	100,00 Aa	100,00 Aa
Tebuconazol	100,00 Aa	100,00 Aa	100,00 Aa	100,00 Aa
Trifloxistrobina + Tebuconazol	99,28 Aa	100,00 Aa	100,00 Aa	100,00 Aa
CV%	6,27			

<sup>1</sup>Média seguida de letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott- Knott à 5% de probabilidade

Tabela 14. Dose efetiva mediana (ED<sub>50</sub>) de vários fungicidas relativos à inibição de crescimento micelial de isolado de *A. ricini* (ISO-24), Botucatu-SP, 2012.

Tratamentos	ED <sub>50</sub> dos Fungicidas (µL/L)
Azoxistrobina + Epocixonazol*	< 1
Difenoconzol	< 1
Iprodione	< 1
Piraclostrobina + Epoxiconazol*	< 1
Procimidone	< 1
Procloraz*	< 1
Propiconazol	< 1
Tebuconazol*	< 1
Trifloxistrobina + Tebuconazol	< 1

\*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<sub>50</sub>

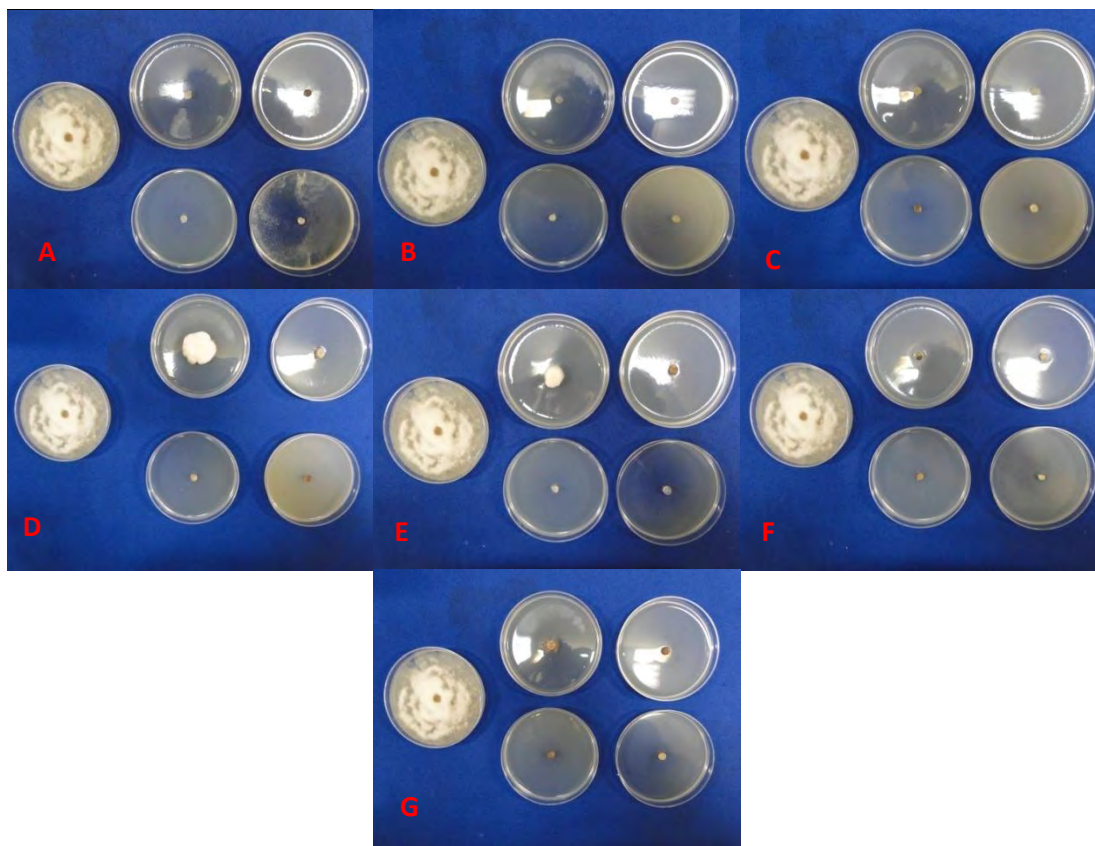


Figura 13. Comportamento dos fungicidas: Tebuconazol (A); Trifloxistrobina + Tebuconazol (B); Piraclostrobina + Epoxiconazol (C); Iprodione(D); Difenconazol (E); Procloraz (F) e Propiconazol (G), na inibição do crescimento micelial de *A. ricini* nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000  $\mu\text{L/L}$  mais testemunha, de cima para baixo e da esquerda para a direita.

Como controle alternativo ao uso de fungicidas comerciais foram utilizados os seguintes tratamentos: extrato etanólico de melão-de-são-caetano (*Momordica charantia*) (folhas e caule); extrato etanólico de laranja (*Citrus sinensis*); extrato etanólico de nim (*Azadirachta indica*); extrato pirolenhoso; álcool 70% e hipoclorito de sódio a 2% (Tabela 15 e Figura 14).

O extrato etanólico do caule de *M. charantia* (melão-de-são-caetano) (1,66 cm) e o extrato pirolenhoso (1,58 cm) foram os que controlaram o crescimento micelial do isolado de *A. ricini*, quando comparados à testemunha (2,41 cm). Os demais tratamentos, na concentração 1000  $\mu\text{L/L}$ , apresentaram os seguintes controle: extrato de folhas de *M.*

*charantia* (2,78 cm), *A. indica* (3,8 cm), *C. sinensis* (2,98 cm), álcool 70% (2,55 cm) e hipoclorito de sódio 2% (3,08 cm).

Na concentração de 2000 µL/L, o extrato do caule de *M. charantia* e o extrato pirolenhoso mantiveram o efeito inibitório no controle do crescimento micelial do patógeno, apresentando valores de 0,5 cm e 0,61 cm, respectivamente. O tratamento a base de álcool a 70%, também, inibiu o desenvolvimento do fungo apresentando valor de 1,55 cm.

Os extratos de *M. charantia* (caule), o extrato pirolenhoso e álcool 70% foram os mais eficientes no controle do crescimento micelial do fungo, com os respectivos valores de 0,52 cm, 0,50 cm e 0,50 cm, na concentração de 3000 µL/L, quando comparados a testemunha.

Aos 4000 µL/L, os tratamentos que obtiveram o melhor resultado no controle do patógeno foram os a base de álcool 70%, hipoclorito de sódio a 2% e o extrato pirolenhoso, seguidos por *C. sinensis*, *M. charantia* (caule) e *M. charantia* (folhas).

Na concentração de 5000 µL/L, todos os tratamentos controlaram o crescimento micelial do patógeno, diferindo estatisticamente da testemunha, exceto o tratamento a base de *A. indica*.

Lima (2008), trabalhando com extrato hidroalcoólico de folhas de *M. charantia*, obteve controle da atividade das bactérias *Bacillus subtilis*, *Salmonella choleraesuis* e *Staphylococcus aureus*. Celloto (2008) obteve resultados positivos trabalhando com o extrato de *M. charantia* no controle de *C. gloeosporioides* em frutos de mamoneiro.

Vale ressaltar que para *M. charantia*, o princípio ativo eficaz para controlar *A. ricini*, encontra-se provavelmente no caule ao invés da folha.

Os resultados obtidos com o extrato de *A. indica* revelam alta variação no efeito inibitório, corroborando com o encontrado por Govindachari et al. (1998), que ainda diz que o efeito é dependente do patógeno alvo. Venturoso et al. (2011), trabalhando com *Fusarium solani*, observou maior crescimento do fungo em todos os dias de incubação, apresentando crescimento micelial de 13,6% superior em relação à testemunha, no meio de cultura suplementado com o extrato de *A. indica*.

O tratamento com o produto comercial a base de extrato pirolenhoso foi o que apresentou os melhores resultados em todas as concentrações testadas. Resultados

positivos também foram encontrados por Furtado et al. (2002), que constataram o efeito inibitório total do extrato pirolenhoso, na dose de 1 mL L<sup>-1</sup> *in vitro*, no crescimento micelial de *B. cinerea*, *Cylindrocladium clavatum* e *Rhizoctonia solani*, isolados de mudas de eucalipto (*Eucalyptus* sp.), e, também, inibiu a germinação dos conídios de *B. cinerea* na proporção de 2,2; 3,1 e 4,3% nas doses de 1, 4 e 6 mL L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Tabela 15. Crescimento micelial de *A. ricini* (ISO-24) sob a ação de diferentes controles alternativos. Botucatu-SP, 2012.

Tratamentos	Concentrações (µL/L)									
	1000		2000		3000		4000		5000	
	Diâmetro (cm)									
Alcool 70%	2,55	Cb <sup>1</sup>	1,55	Bb	0,50	Aa	0,53	Aa	0,78	Aa
Extrato de <i>Citrus sinensis</i>	2,98	Cc	2,79	Cd	1,76	Bc	1,06	Ab	0,77	Aa
Extrato de <i>Momordica charantia</i> (Caule)	1,66	Ba	0,5	Aa	0,52	Aa	1,39	Bb	0,67	Aa
Extrato de <i>Momordica Charantia</i> (Folhas)	2,78	Cc	2,77	Cd	1,28	Ab	2,29	Bc	1,40	Ab
Extrato de <i>Azadirachta indica</i>	3,80	Ed	0,69	Aa	3,29	De	2,88	Cd	2,24	Bc
Extrato Pirolenhoso	1,57	Ba	0,61	Aa	0,50	Aa	0,50	Aa	0,50	Aa
Hipoclorito de Sódio 2%	3,08	Dc	2,07	Cc	1,23	Bb	0,50	Aa	0,50	Aa
Testemunha	2,41	Ab	2,41	Ac	2,41	Ad	2,41	Ad	2,41	Ac
CV %	24,03									

<sup>1</sup>Média seguida de letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott- Knott à 5% de probabilidade.

Nas concentrações de 1000 uL/L e 2000uL/L, o diâmetro da colônia foi maior do que o da testemunha, para o tratamento a base de hipoclorito de sódio que não inibiu o crescimento micelial, que só ocorreu a partir da concentração de 3000 uL/L. Possivelmente, nessas concentrações o tratamento a base de hipoclorito de sódio a 2%, o sódio tenha favorecido o crescimento de *A. ricini*, pois se consideramos que as placas não estavam contaminadas na instalação dos experimento, não haviam fungos oportunistas que pudessem evidenciar a desinfestação com o cloro.

Tavares e Souza (2005) também trabalhando com hipoclorito de sódio (NaClO) no controle *in vitro* de *Colletotrichum gloesporioides* em mamoeiro obtiveram ED<sub>50</sub> de 381,85 ppm, isso demonstra insensibilidade do fungo ao desinfestante. A CMI foi superior a 1.000 ppm, mostrando resistência do patógeno ao NaClO. Neste mesmo trabalho, o hipoclorito de sódio foi classificado como fungicida pertencente ao grupo químico cloro. Mas

no presente trabalho, o autor preferiu agrupá-lo como um controle alternativo, para fins de análise de dados.

O que pode ser observado no presente trabalho é que alguns tratamentos apresentaram alterações na inibição do crescimento micelial do patógeno nas concentrações avaliadas em relação a testemunha, ou seja, não houve uma redução gradual no desenvolvimento do fungo, conforme aumentavam-se as concentrações. No entanto, no geral a tendência é sempre a diminuição no crescimento do fungo com o aumento das concentrações dos produtos (Figura 14). A mesma situação ocorreu com Venturoso et al. (2011) com o extrato de jabuticaba, cavalinha e melão-de-são-caetano no controle dos fungos *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Colletotrichum* sp., respectivamente. De acordo com o mesmo autor, isso ocorre devido à existência de compostos com atividades tanto antifúngicas quanto compostos que estimulam o crescimento dos fungos, e a quantidade e relação existente entre esses compostos pode resultar em momentos de maior ou menor inibição do patógeno.

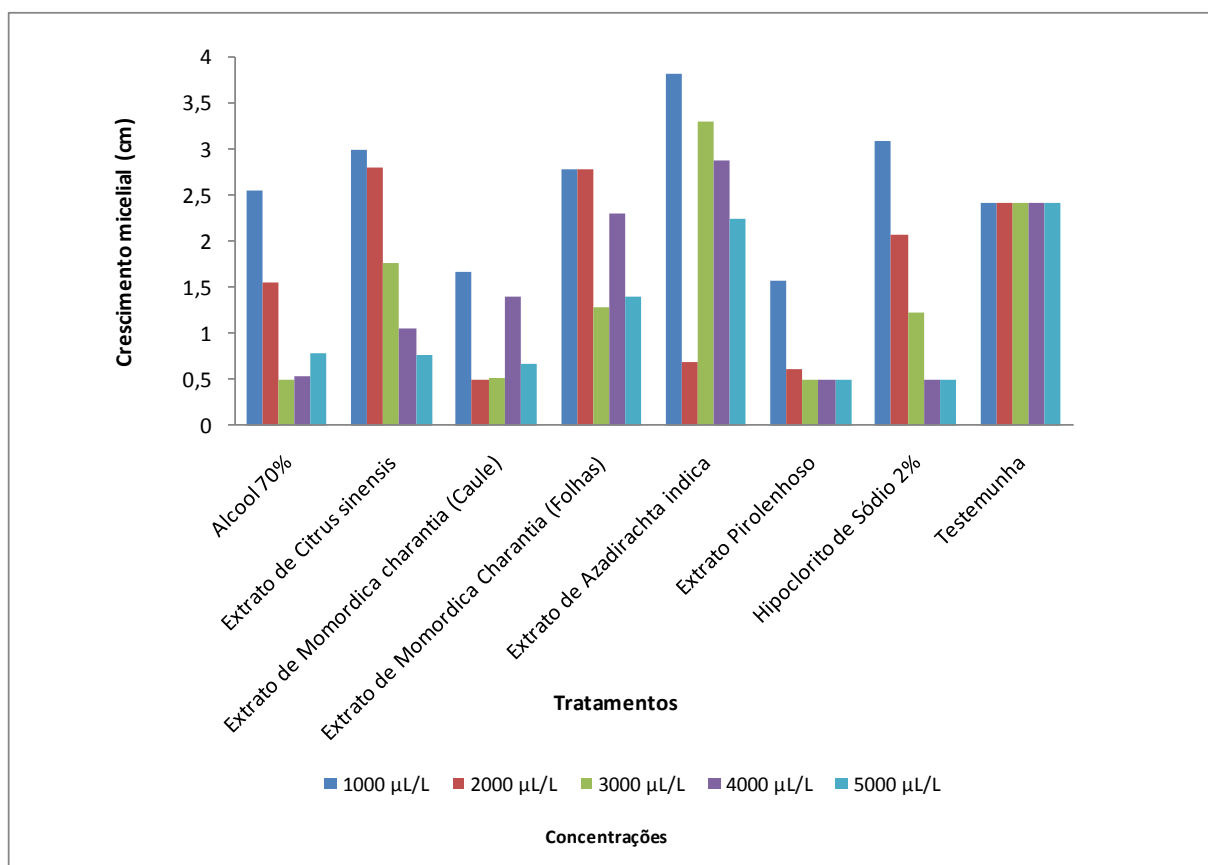


Figura 14. Efeito de diferentes produtos de controle alternativo na inibição do crescimento micelial de *A. ricini*.

### **6.7.1 Controle *in vivo* do crescimento micelial de *Amphobotrys ricini* utilizando diferentes fungicidas e controles alternativos**

Nenhum dos tratamentos apresentou valores próximos a da testemunha não inoculada, mas alguns se mostraram promissores no controle de mofo cinzento. Entre eles destaca-se o propiconazol com nota média 2,67, piraclostrobina + epoxiconazol (2,83), trifloxistrobina + tebuconazol (3,17) e tebuconazol (3,33) (Tabela 16).

Resultados semelhantes foram obtidos por Sponholz et al. (2004) no controle de antracnose em frutos de banana, com os fungicidas propiconazol na concentração de 250 mg.L<sup>-1</sup> e procloraz em doses de 100, 125 e 250 mg.L<sup>-1</sup> foram os mais eficientes com 15 dias de armazenamento em relação à testemunha, e tebuconazol na concentração de 250 mg.L<sup>-1</sup> com 12 dias de armazenamento. Arduim (2009) obteve resultados positivos no controle de ferrugem da folha do trigo causado por *Puccinia triticina* Rob. ex. Desm com o fungicida epoxiconazol + piraclostrobina, na redução da AAPCD da doença, que ficou em torno de 85,47%. Quando o mesmo autor utilizou apenas fungicidas do grupo do triazóis sozinhos, sem mistura com fungicidas do grupo das estrobirulinas, os resultados não foram satisfatórios sobre a viabilidade dos esporos. De acordo com Pontzen e Scheinpflug (1989), os triazóis não agem na germinação, pelo fato de que nessa fase ainda não é requerida a síntese de esteróis.

O que pode ser observado neste trabalho é que todos os tratamentos com potencial efeito no controle do mofo cinzento pertencem ao grupo dos triazóis, (inibidores da biossíntese do ergosterol) e do grupo das estrobirulinas (inibidores da respiração na quinona externa)

Os estudos no presente trabalho são preliminares, sendo necessários mais estudos para determinar épocas mais adequadas de aplicação, concentração da aplicação e número de aplicações. Atualmente não há registro de nenhum fungicida para o controle do mofo cinzento junto ao ministério da agricultura. Estudos mais detalhados devem ser realizados para evitar futuros problemas de fitotoxidez.

Tabela 16. Controle de doença causada *A. ricini*, em cachos de genótipo (BRS Energia) de mamoneira, com fungicidas e produtos alternativos. Botucatu – SP, 2012.

Tratamentos	Cachos Doentes (Nota) <sup>2</sup>
piraclostrobina + epoxiconazol	2,83 b <sup>1</sup>
extrato pirolenhoso	4,67 c
tebuconazol	3,33 b
trifloxistrobina + tebuconazol	3,17 b
propiconazol	2,67 b
procloraz	4,17 c
testemunha inoculada	4,50 c
testemunha não inoculada	1,00 a

<sup>1</sup>Médias seguidas de letras iguais, na coluna, não diferem entre si, segundo o Teste T ao nível de 5% de probabilidade, da análise não-paramétrica de Friedman.

<sup>2</sup>Escala de notas, a saber: nota 1- ausência de sintomas; nota 2- aproximadamente 25% do cacho com sintomas; nota 3 – aproximadamente 50% do cacho com sintomas; nota 4 – aproximadamente 75% do cacho com sintomas e nota 5 – 100% do cacho com sintomas.

### 6.8 Avaliação de genótipos de mamoneira visando resistência ao mofo – cinzento em duas localidades diferentes

Os materiais não apresentaram diferenças estatísticas quando foi analisado o progresso da doença durante as três semanas. Dessa forma, os dados foram agrupados, onde foi possível comparar apenas o comportamento do genótipos dentro e entre os dois municípios.

No município de Botucatu, o genótipo que apresentou a menor severidade da doença foi o 360/1 com valor de 16,96%, seguido do material denominado IAC-80, cujo valor foi de 26,09%, e o pior material foi o genótipo 343 com 38,26%.

Os materiais IAC-80, 360/1 e 319 foram os que apresentaram os menores valores de severidade da doença, com os valores de 6,52%, 10,43% e 11,30%, respectivamente, quando foram avaliados no município de São Manuel.

Estatisticamente, quando foi comparado o comportamento dos genótipos entre os municípios, todos os genótipos avaliados apresentaram menor severidade da doença no município de São Manuel em relação a Botucatu, durante o mesmo período de avaliação provavelmente devido a influência ambiental (Tabela 17, Figura 15 e 16).



Outro dado importante foi o valor elevado do coeficiente de variação (CV%), cujo valor foi 92,27, isso ocorreu, provavelmente, pela baixa homogeneidade dos dados avaliados, cujos valores de severidade, variaram entre 0% até 100%.

O que surpreendeu neste trabalho foi que a cultivar IAC- 2028, que é descrita como moderadamente suscetível foi a que apresentou os maiores índices de severidade da doença, quando comparada com os outros materiais nas duas localidades.

Lima e Soares (1990), trabalhando com 15 genótipos de mamoneira em condições naturais de infecção de *A. ricini*, obtiveram os seguintes valores no índice da doença quando avaliou a cultivar Guarani, que apresentou os valores de 40,83% na primeira avaliação e 48,38% na segunda avaliação, os autores a classificaram como moderadamente resistente ao *A. ricini*.

Fernandes et al. (2006) obtiveram incidência de frutos infectados de 25% na cultivar AL Guarany e 48% na cultivar Guarany, o que comprometeu a produtividade das mesmas, sendo classificadas como suscetíveis. Já Rego Filho (2007), trabalhando com as cultivares AL Guarany e o híbrido Lyra, não observou diferença estatística entre os materiais que apresentaram incidência do mofo cinzento de 20,00% e 25,50% respectivamente. Estes resultados são próximos ao relatados no presente trabalho.

A maioria dos trabalhos de avaliação de genótipos visando resistência ao mofo-cinzento, apenas relatam diferenças em termos de incidência da doença e não severidade da doenças, possivelmente porque na época em que foram realizadas, os autores não dispunham de escalas diagramáticas para a avaliação, como a desenvolvida por Chagas et al. (2010), dessa maneira os trabalhos anteriores, deixavam a desejar em termos de acurácia e precisão nas quantificações do mofo- cinzento no campo.

No trabalho realizado por Costa et al. (2004) foram avaliadas três linhagens e cinco cultivares de mamoneira ao mofo-cinzento, a linhagem CNPAM 93-168 apresentou o menor índice da doença, sendo mais resistente que as cultivares Pernambucana, AL-Guarani, Mirante 10 e a linhagem CNPAM 89-78. Devido a esse comportamento, a linhagem CNPAM 93-168 foi selecionada para o programa de melhoramento genético da Embrapa Algodão.

O que pode ser constatado até o momento é que ainda são poucos os trabalhos realizados para a seleção de genótipos resistentes ao mofo cinzento, devido aos vários fatores discutidos ao longo deste trabalho, como por exemplo, genótipos que apresentam frutos com poucos acúleos são mais resistentes ao ataque do mofo cinzento em relação a aqueles com muitos acúleos, pois o excesso de acúleos aumenta o surgimento de um microclima favorável ao desenvolvimento do patógeno (LIMA; SOARES, 1990). O próprio patógeno utiliza-se de um mecanismo especializado de infecção, valendo-se da produção de enzimas hidrolíticas, tais como enzimas pectinas e celulolíticas (THOMAS; ORELLANA, 1963). Sem contar que a herança da resistência ainda não foi determinada, mas a indícios da herança ser do tipo poligênica (ORELLANA; THOMAS, 1962).

Os resultados obtidos neste trabalho são preliminares, devendo ser realizados mais estudos para melhor avaliar o comportamento desses materiais. Para isso são necessárias avaliações em outras localidades mais distantes; número maior de genótipos e repetições e avaliação das condições ambientais locais. A busca de genótipos de mamoneira que apresentem resistência ao mofo-cinzento torna-se necessária, devido às potencialidades do óleo de mamona na indústria.

Tabela 17. Severidade de mofo-cinzento em racemos de mamoneira, em duas localidades diferentes. Botucatu-SP, 2012.

Genótipos	Município	
	Botucatu	São Manuel
Severidade da Doença (%)		
343	38,26 Bc	16,09 Ab
319	29,13 Bb	11,30 Aa
360/2	28,26 Bb	14,78 Ab
360/1	16,96 Ba	10,43 Aa
IAC-80	26,09 Bb	6,52 Aa
IAC-2028	29,13 Bb	22,61 Ac
CV%	92,27	

Média seguida de letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott- Knott à 5% de probabilidade. Valores transformados em arc sen ( $\sqrt{x/100}$ ).



Figura 15. Comportamento de genótipos de *Ricinus communis* plantados no município de Botucatu – SP. A: genótipo 1 (343); B: genótipo 2 (319); C: genótipo 3 (360/2); D: genótipo 4 (360/1); E: genótipo 5 (IAC-80) e F: genótipo 6 (IAC-2028).



Figura 16. Comportamento de genótipos de *Ricinus communis* plantados no município de São Manuel- SP. A: genótipo 1 (343); B: genótipo 2 (319); C: genótipo 3 (360/2); D: genótipo 4 (360/1); E: genótipo 5 (IAC-80) e F: genótipo 6 (IAC-2028).

## 7. CONCLUSÕES

As características morfoecológicas analisadas confirmaram que 29 isolados pertencem a espécie *A. ricini* e dois a espécie *B. cinerea*;

Em laboratório, todos os isolados foram patogênicos a frutos de *Ricinus communis* L.;

As análises de microscopia eletrônica de varredura mostraram diferenças morfológicas interessantes entre os isolados de *A. ricini* e *B. cinerea*, como a presença de apressório neste último;

Os isolados de *A. ricini* foram capazes de produzir *in vitro* as enzimas celulase, pectinase, lipase e protease, tendo se destacado a enzima pectinase que produziu o halo de maior diâmetro e, provavelmente, desempenha papel importante na patogenicidade do fungo, mas para os isolados de *B. cinerea* não houve destaque para as enzimas celulase e lipase, mas a produção das enzimas pectinase e protease foi eficiente;

Tanto *A. ricini*, quanto *B. cinerea*, a enzima pectinase deve estar relacionada à patogênese dos fungos nas plantas.

A árvore filogenética com sequências das regiões ITS, tanto de material do GenBank, quanto com os isolados do trabalho, permitiram confirmar, novamente, os 13 isolados pertencentes a espécie *A. ricini* e dois a espécie *B. cinerea*;

Observou-se baixa variabilidade encontrada entre os isolados de *A. ricini* estudados, mesmo o de regiões distantes, mas com o isolado de *A. ricini* da China (nº 327422168), houve uma relação filogenética distante;

Quanto à inibição do crescimento micelial, os fungicidas pertencentes aos grupos químicos das estrobirulinas e triazóis apresentaram os melhores resultados em todas as concentrações testadas;

Quanto à inibição do crescimento micelial, os tratamentos alternativos com o extrato de *M. charantia* (melão de São Caetano (caule)) e o produto comercial à base de extrato Pirolenhoso foram os que apresentaram os resultados mais satisfatórios;

No ensaio *in vivo*, os fungicidas à base de estrobirulinas e triazóis apresentam resultados satisfatórios no controle da doença no campo, mas são necessários maiores estudos;

Na avaliação dos genótipos no campo, os resultados mostraram que o material 360/1 foi o que apresentou os menores índices de severidade, nos municípios de Botucatu e São Manuel.

As descobertas relatadas neste trabalho, mostram-se de grande importância para futuros trabalhos envolvendo a busca por matérias resistentes de mamoneira ao mofo-cinzento, auxiliando nos estudos desse patossistema.

Acredita-se que o presente trabalho trouxe grande contribuição para o patossistema mamoneira versus *A. ricini*. Recomenda-se “a priori” para Botucatu e São Manuel o plantio e do material 360/1, mas com aplicações preventivas nas épocas frias com os fungicidas à base de estrobirulinas e triazóis.

## 8. REFERÊNCIAS

- AGROFIT – Sistema de agrotóxicos fitossanitários.** 2012. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: dez. 2012.
- ARDUIM, G. da S. **Sensibilidade de raças de *Puccinia triticiana* a Fungicidas.** 2009. 91 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia)-Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Botucatu, 2009.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**, 4 ed. Porto Alegre: ARTMED, 2004. 1463 p.
- ALEXOPOULOS, C. J., MIMS, C.W., BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**, 4 ed. New York: JOHN WILEY AND SONS, 1995. 869 p.
- ASSIS, T. C. et al. Differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates by using total proteins and esterase electrophoretic patterns and extracellular enzymes production. **Summa Phytopathologica**, Botucatu , v. 36, n. 1, p. 140-144, 2010.
- AZEVEDO, D. M. P. de; BELTRÃO, N. E. de M. (Ed.). O agronegócio da mamona no Brasil. 2 ed. rev. amp. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2007. 506 p.
- BAAYEN, R. P. et al. Nonpathogenic Strains of the Citrus Black Spot Fungus, *Guignardia citricarpa*, Identified as a Cosmopolitan Endophyte of Woody Plants, *Guignardia mangiferae*, (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, p. 464-477, 2002.
- BAAYEN, R.P. Development and validation of a fast PCR-based detection method for

pathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 109, p. 503-513, 2003.

BACKHOUSE, D.; WILLETTS, H. J.; ADAM, P. Electrophoretic studies of *Botrytis* species. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 82, n.4, p. 625-630, 1984.

BARALDI, E. et al. Genetic diversity between *Botrytis cinerea* isolates from unstored and cold stored kiwi fruit. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.150, n.11/12, p. 629-635, 2002.

BARKAI-GOLAN, R.; LAVY MEIR, G.; KOPELIOVITCH, E. Pectolytic and cellulolytic activity of *Botrytis cinerea* Pers. related to infection of non-ripening tomato mutants. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 123, p. 174-183, 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).

BATISTA, F. A. S.; LIMA, E. F.; MOREIRA, J. A. N. de; AZEVEDO, D. M. P. de; PIRES, V. A.; VIEIRA, R. M.; SANTOS, J. W. dos. **Avaliação da resistência de genótipos de mamoneira *Ricinus communis* L. ao mofo cinzento causado por *Botrytis ricini* Godfrey**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 1998. 5 p. (Embrapa Algodão. Comunicado Técnico, 73).

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

BELTRÃO, N. E. de M.; LIMA, R. de L. S. de Aplicação do óleo de mamona como fonte de energia: biodiesel. In: AZEVEDO, D. M. P.; BELTRÃO, N. E. de M. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa. 2º ed., 2007. 506 p.

BEZERRA, C. S. **Estrutura genética e sensibilidade a fungicidas de *Amphobotrys ricini*, agente causal do mofo cinzento da mamoneira**. 2007. 43 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular)-Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

BOCCHESI, C.A.C. et al. Virulência, atividade enzimática e padrões de isoesterases de isolados de *Pyrenophora chaetomioides*, agente etiológico da mancha de grãos e folhas de aveia. **Fitopatologia Brasileira**, Viçosa, MG, v.28, p.11-16, 2003.

BONANTS, P. J. M. et al. Development and validation of a fast PCR-based detection method for pathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 109, p. 503-513, 2003.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2009. 532p.



- BORTOLAZZO, N.G. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências/Microbiologia Agrícola) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piraciaba, 2011.
- BUENO, C. J. et al. Produção de enzimas extracelulares por *Fusarium solani* de maracujazeiro amarelo. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa, MG, v. 34, n.5, p. 343-346, 2009.
- BURDON, J. J.; CHILVERS, G.A. Host density as a factor in plant disease ecology. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, 20, p. 143–166, 1982.
- BUTTNER, P. et al. Variations in ploidy among isolates of *Botrytis cinerea*: implications for genetic and molecular analyses. **Current Genetics**, New York, v.25, n.5, p. 445-450, 1994.
- CALDARI JÚNIOR, P. **Caracterização morfológica, esporulação e sensibilidade a fungicidas de isolados de *Botrytis cinerea* de flores e plantas ornamentais**. 1998. 51 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Fitopatologia)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.
- CAMPBELL, T.A. Inheritance of seedling resistance to gray mold in kenaf. **Crop Science**, Madison, v. 24, n. 4, p. 733-735, 1984.
- CARNEIRO, S. M. de T. P. G. Efeito de extratos de folhas e do óleo de nim sobre o oídio do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 29, n. 3, p. 262-265, 2003.
- CARTAXO, W. V. et al. **O cultivo da mamona no semi-árido brasileiro**, Circular Técnica 77. Campina Grande, 2004, p. 20.
- 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.
- CASTELLANOS, P. P.; BISHOP, C.; VILLALOBOS, M. J. P. Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. **Phytochemistry**, Oxford, v. 57, n. 1, p. 99-102, 2001.
- CELOTO, M.I.B. **Atividade antifúngica de extratos de melão-de-são-caetano**. 2005. 73 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Sistema de Produção)-Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2005.
- CELOTO, M. I. B. et al. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 30, n. 1, p. 1-5, 2008.
- CHAGAS, H.A. **Controle de mofo-cinzento (*Amphobotrys ricini*) da mamoneira (*Ricinus communis* L.) por métodos químico, biológico e com óleos essenciais**. 68f. Dissertação

(Mestrado em Agronomia /Agricultura)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

CHAGAS, H.A. et al. Escala diagramática para avaliação de mofo cinzento (*Amphobotrys ricini*) da mamoneira (*Ricinus communis* L.). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.36, n.2, p.164-167, 2010

CHATUVERDI, R. et al. Inheritance of resistance to Botrytis grey mould in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Legume Research**, New Delhi, v. 18, n. 1, p. 1-4, 1995.

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, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p. 89-120.

CLARK, C.A.; LORBEER, J.W. Comparative histopathology of *Botrytis squamosa* and *B. cinerea* on onion leaves. **Phytopathology**, St. Paul, v. 66, p.1279-1289, 1976.

COLE, L.; DEWEY, F.M.; HAWES, C.R. Immunocytochemical studies of the infection mechanisms of *Botrytis fabae*: II. Host cell wall breakdown. **New Phytologist**, Lancaster, v. 139, p. 611-622, 1998.

COLEY-SMITH, J.R.; VERHOEFF, K.; JARVIS, W.R. **The Biology of Botrytis.**, London, UK: Academic Press, 1980. 318 p.

COLLMER, A.; KEEN, N.T. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 383-409, 1986

COMMÉNIL, P.; BRUNET, L.; AUDRAN, J.C. The development of the grape berry cuticle in relation to susceptibility to bunch rot disease. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 48, p.1599-1607, 1997.

COMMÉNIL, P.; BELINGHERI, L.; DEHORTER, B. Antilipase antibodies prevent infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 52, p. 1-14, 1998.

COSTA, R.S.; SUASSUNA, T.M.F.; MILANI, M.; COSTA, M.N.; SUASSUNA, N.D. Avaliação de resistência de genótipos de mamoneira ao mofo cinzento (*Amphobotrys ricini*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 1., 2004, Campina Grande. **Energia e Sustentabilidade. Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004. 1 CD-ROM.

DI STASI, L. C. Química de produtos naturais: principais constituintes ativos. In: \_\_\_\_\_. **Plantas medicinais: arte e ciência**. [S.l.: s.n.], 1996. 111 p.

DICK, P.L., KERBER, E.R. Resistance of the race-specific type. In: ROEFLS, A.P., BUSHNELL, W.R. **The cereal rusts: diseases, distribution, epidemiology and control**. Orlando: Academic, v. 2, p. 469-500, 1985.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Basic Plant Pathology Methods**. 2<sup>nd</sup> ed. Florida: CRC Press. 1995. 450 p.

DOMINGUES, R. J.; de SOUZA, J.D.F.; TÖFOLI, J. G.; MATHEUS, D.R. Ação “in vitro” de extratos vegetais sobre *Colletotrichum acutatum*, *Alternaria solani* e *Sclerotium rolfsii*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 4, p. 643-649, out./dez., 2009.

DOSS, R.P.; POTTER, S.W.; CHASTAGNER, G.A. ; CHRISTIAN, J.K. Adhesion of non germinated *Botrytis cinerea* conidia to several substrata. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 59, p.1786-1791, 1993

DRUMMOND, O. A.; COELHO, S. J. Doenças da mamoneira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 7, n. 82, p. 38-43, 1981.

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

ELAD, Y.; WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, P. DELEN, N. *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems an introduction. In: ELAD, Y.; WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, P. DELEN, N. (eds). **Botrytis, Biology, Pathology and Controls**. Dordrecht: ed. Kluwer, 2004, pp. 1-8.

ELAD, Y.; WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, P. DELEN, N. (eds). **Botrytis, Biology, Pathology and Controls**. Dordrecht: ed. Kluwer, 2007, 412 p.

ELLIOT, M.E. Self-fertility in *Botryotinia porri*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 42. p. 1393-1395, 1964.

EMBRAPA- Empresa brasileira de pesquisa Agropecuaria. **Centro Nacional de Pesquisa Tecnológica em Informática para a Agricultura**. Disponível em [http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mamona/SistemaProducaoMamona/manejo\\_integrado.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mamona/SistemaProducaoMamona/manejo_integrado.htm). acesso em : 10 jul. 2012.

EMMETT, R. W.; PARBERY, D.G. Appressoria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 13, p. 147-167, 1975.

FARETRA, F., ANTONACCI, E.; POLLASTRO, S., 1988. Sexual behaviour and mating system of *Botryotinia fuckeliana*, teleomorph of *Botrytis cinerea*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 134, n. 9, p. 2543-2550, 1988.

FARR, D. F.; CASTLEBURY, L. A.; ROSSMAN, A. Y., Morphological and molecular characterization of *Phomopsis vaccinii* and additional isolates of *Phomopsis* from blueberry and cranberry in the eastern United States. **Mycologia**, New York, v. 94, n. 3, p. 494- 504, 2002.

FEGAN, M.; MANNERS, J. M; MACLEAN, D. J.; IRWIN; J. A. G.; SAMUELS, D.

- HOLDOM, G. AND LI, D. P. Random amplified polymorphic DNA markes reveal a high degree of genetic diversity in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Journal of General Microbiology**, London, v.139, p. 2075–2081,1993.
- 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).
- FIRMINO, A.C. **Caracterização de isolados de *Ceratocystis* sp ., avaliação de resistência clonal de eucalipto e sensibilidade deste fungo a diferentes fungicidas**. 2011. 110 f. Tese (Doutorado em Agricultura/Proteção de Plantas)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.
- FLOR, H. H. The complementary genic systems in flax and flax rust. **Advanced in Genetic**, New York, v. 8, p. 29-54, 1956.
- FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 9, p. 285-296, 1971.
- FORNAZIERI JUNIOR, A. **Mamona: uma rica fonte de óleo e de divisas**. São Paulo: Ícone, 1986. 72 p.
- FRANZENER, G.; MARTINEZ-FRANZENER, A. S.; STANGARLIN, J.R.; CZEPAK, M. P.; SCWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M. E. S. Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n.1, p.29-38, 2007.
- FRY, W. E. **Principles of plant disease management**. New York: Academic Press, 1982. 378 p.
- FURTADO, G.R.; PEREIRA, R.T.G.; ZANETTI, R.; SOUZA-SILVA, A. Efeito do ácido pirolenhoso *in vitro* sobre isolados de *Botrytis cinérea*, *Cylindrocladium clavatum* e *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, suplemento, v.27, p.112, 2002.
- GARRIDO, L.R; SONEGO, O.R. Podridão cinzenta da uva: Epidemiologia sintomatologia e controle. **Embrapa Uva e vinho**. n. 59. Bento Gonçalves, p. 8. 2005. (Circular técnica).
- GERBI, S. A. Evolution of ribossomal DNA. In: MCINTYRE, R.E. **Molecular evolutionary genetics**. New York : Plenum, 1985. p. 419-517.
- GHINI, R. Ocorrência de resistência a fungicidas em linhagens de *Botrytis cinerea*, no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, DF, v. 21, n.2, p. 285-288, jun. 1996.
- GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. 1.ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78 p.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. 2.ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2002. 78 p.

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.

GIECK, K. **Manual de Fórmulas Técnicas**. São Paulo: Hemus Livraria Editora Limitada. s/ ano, s/páginas.

GODFREY, G. H. Gray mold of castor bean. **Journal of Agriculture Research**, Washington, DC, v. 13, n. 9, p. 679 -715, 1923.

GOVINDACHARI, T.R. et al. Identification of antifungal compounds from the seed oil of *Azadirachta indica*. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v.26, n.2, p.109-116, 1998.

HADWIGER, L.A., CULLEY, D.E. Nonhost resistance genes and race-specific resistance. **Trends in Microbiology**, Amsterdam, v. 4, p. 136-141, 1993.

HANCOCK, J. G.; LORBEER, J. W. Pathogenesis of *Botrytis cinerea*, *B. squamosa*, and *B. alli* on onion leaves. **Phytopathology**, St. Paul, v. 53, p. 669-673, 1963.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, New York, v. 67, p. 597-607, 1975.

HENNEBERT, G.L. Botrytis and Botrytis-like genera. **Persoonia**, Leiden, v. 7, p. 183-204, 1973.

HILLIS, D.M.; DIXON, M.T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **Quartely Review of Biology**, Ithaca, v. 66, n. 4, p. 411- 453, 1991.

HOLCOMB, G.E.; JONES, J.P. ; WELLS, D.W. Blight of prostate spurge and cultivated *Poinsettia* caused by *Amphobotrys ricini*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 73, p. 74-75, 1989.

HOLCOMB, G.E. ; BROWN, W.L. Basal stem rot of cultivated *Poinsettia* caused by *Amphobotrys ricini*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 74, p. 828, 1990.

HONG, S. K. et al. Occurrence of Gray Mold in Castor Bean caused by *Botrytis cinerea* and *Amphobotrys ricini* in Korea. **The Plant Pathology Journal**, Suwon, v. 17 n.6, p. 357-360, 2001.

IAC- Instituto Agronomico de Campinas. **Centro de Grãos e Fibras**. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/areasdepesquisa/graos/mamona.php>>. Acesso em 26 ago. 2012.

**INFOPÉDIA -Estatística não-paramétrica.** 2012. Disponível em:  
< [http://www.infopedia.pt/\\$estatistica-nao-parametrica](http://www.infopedia.pt/$estatistica-nao-parametrica)>.. Acesso em dez. 2012.

JENNINGS, D.L. Inheritance of resistance to *Botrytis cinerea* and *Didymella applanata* in canes of *Rubus idaeus*, and relationships between these resistances. **Euphytica**, Wageningen, v. 32, n. 3, p. 805-901, 1983.

JARVIS, W. R. **Botryotinia and Botrytis species: Taxonomy, Physiology and Pathogenicity.** Monograph n. 15. A guide to the Literatura. Ottawa. Canada Department of Agriculture, 1977.

JOHNSTON, D.J; WILLIAMSON, B. Purification and characterization of four polygalacturonases from *Botrytis cinerea*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 96, p. 343-349, 1992.

KAPAT, A.; ZIMAND, Y.; ELAD, Y. Biosynthesis of pathogenicity hydrolytic enzymes by *Botrytis cinerea* during infection of bean leaves and in vitro. **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, p. 1017–1024, 1998.

KHACHATOURIANS, G. G. Production and use of biological pest control agents. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v.4, p.120-124, 1986.

KHAZAELI, P. et al. Morphological and molecular identification of *Botrytis cinerea* causal agent of gray in rose green houses in central regions of Iran. **International Journal of Agricultural Science and Research**, Tehran, v. 1, n.1, 2010.

KIIHL, T. A. M. **Obtenção e avaliação preliminar de novos híbridos de mamona (*Ricinus communis* L.).** 2006. 66 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Agricultura)-Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

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.

KIMATI, H. Controle químico. In: BERGAMIN FILHO (Ed.) **Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos.** 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, 919 p.

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

KUMAR, A.; REDDY, P.N.; RAO, T.G.N. Host range studies of *Botrytis ricini*, the causal agent of castor grey mold. **Indian Journal of Plant Protection**, New Delhi, v. 35, n. 1, p. 140-141, 2007

KWON, J-H.; et al. First report of *Botrytis cinerea* as a postharvest pathogen of blueberry in Korea. **Mycobiology**, Seoul, v. 39, n. 1, p. 52-53, 2011.

- LARA, A.C. da C. 2010. 73 f. **Expressão Sexual em linhagens de mamona (*Ricinus communis* L.)** Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.
- LIMA, E. F. ; SOARES, J. J. Resistência de cultivares da mamoneira ao mofo cinzento causado por *Botrytis ricini* **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 15 n. 1, p. 96-97, jan./fev. 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, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p. 191-212.
- LIMA, B.V. et al. Natural infection of *Acalypha hispida* and *Jatropha podagrica* inflorescences by *Amphobotrys ricini* in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes**, Rockhampton, v. 3, p. 5-7, 2008
- LIN, M.W.; WATSON, J.F.; BAGGETT, J.R. Inheritance of resistance to neck-rot disease incited by *Botrytis allii* in bulb onions. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 120, n. 2, p. 297-299, 1995.
- LORENZETTI, E. M. **Interação patógeno-Hospedeiro no patossistema capim limão-ferrugem das folhas e avaliação de ingredientes ativos naturais no controle da doença**. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Horticultura) - Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.
- MARTINELLI, J. A. **Induced resistance of barley (*Hordeum vulgare* L.) to powdery mildew (*Erysiphe graminis* DC.: Fr. f. sp. *hordei* Em. Marchal) its potential for crop protection**. 1990. 147 f. Tese (Ph. D.) Universidade de Cambridge, Cambridge, 1990.
- MARTINEZ, S. S. Composição do nim. In: MARTINEZ, S. S. **O nim – *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção**. Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná, 2002. p. 23-30.
- MARTÍNEZ, M. J.; MARTÍNEZ, R.; REYES, F. Effect of pectin on pectinases in autolysis of *Botrytis cinerea*. **Mycopathologia**. Den Haag, v. 102, n. 26, p. 37–43, 1988.
- MARTÍNEZ, M.J. et al. Pectic activities from *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*: purification and characterization of an exopolygalacturonase. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 50, p. 81-145, 1991.
- 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, p. 445-447.
- MATIELLO, R. R.; BARBIERI, R. L.; CARVALHO, F. I. F. de. Resistência das plantas a moléstias fúngicas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, p. 161-168, 1997.

- MAZZANI, B. Euforbiáceas oleaginosas: Tártago. In: MAZZANI, B. **Cultivo y mejoramiento de plantas oleaginosas**. Caracas, Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuárias, 1983. p. 277-360.
- MELLO, A. F. S.; LOURENÇO, S. A. de; AMORIM, L. Alternative products in the in vitro inhibition of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 2, p. 179-183, 2005.
- MELLO, A. F. S.; MACHADO, A. C. Z.; INOMOTO, M.M. Potencial de controle da erva-de-Santa-Maria sobre *Pratylenchus brachyurus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, n.5, p. 513-516, 2006.
- MENTEN, J. O. M.; MINUSSI, C. C.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. "in vitro". **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 1, n. 2, p. 57-66, 1976.
- MENZINGER, W. Zur Variabilität und Taxonomie Von Arten und Formen der Gattung *Botrytis* Mich. I. Untersuchungen zur kulturbedingten Variabilität morphologischer Eigenschaften von Formen der Gattung *Botrytis*. **Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg.** Berlin, v. 120, p. 141-178, 1996a.
- MENZINGER, W. Zur Variabilität und Taxonomie Von Arten und Formen der Gattung *Botrytis* Mich. II. Untersuchungen zur Variabilität des Kulturtyps unter Konstanten Kulturbedingungen. **Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg.** Berlin, v. 120, p. 179-196, 1996b.
- MILANI, M. et al. **Resistência da Mamoneira (*Ricinus communis* L.) ao Mofo Cinzento causado por *Amphobotrys ricini*.** Campina Grande, PB: 2005. 22 p. (Embrapa Algodão. Documentos 137).
- MIRZAEI, S. et al. Taxonomical studies on the genus *Botrytis* in Iran. **Journal of Agricultural Technology**, Bangkok, v. 3, n. 1, p. 65-76, 2007.
- MIRZAEI, S. et al. Identification of *Botrytis* spp. on Plants Grown in Iran. **Journal of Phytopathology**. Tehran, v. 156, p. 21-28, 2008.
- MORGAN, D.J. Numerical taxonomic studies of the genus *Botrytis* I. The *B. cinerea* complex. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 56, n.3, p. 319-325, 1971.
- MOVAHEDI, S.; HEALE, J. B. The roles of aspartic proteinase and endo-pectin lyase enzymes in the primary stages of infection and pathogenesis of various host tissues by different isolates of *Botrytis cinerea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 36, p.303-324, 1990.



- 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 Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.
- MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acid Research**, New York, v. 8, p. 4321-4326, 1980.
- NEERGAARD, P. **Seed pathology.** Londres: McMillan, 1979. 839 p.
- NEVES, B. P. da; OLIVEIRA, I. P. de; MOHN, J. C. **Cultivo e utilização do nim indiano.** Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2003, 12 p. (Circular Técnica 62).
- NIKOH, N.; FUKATSU, T.. Interkingdom host jumping underground: phylogenetic analysis of entomoparasitic fungi of the genus *Cordyceps*. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.17, p.629-638, 2000.
- NIKOLIC, D. Genetic variability of some important seedlings characters of the F1 generation at interspecies hybridization in grapevine. **Review of Research Work at the Faculty of Agriculture**, Belgrade, v. 42, n. 2, p. 117-128, 1997.
- OLIVEIRA, D. T. M. **Lipase extracelular de fungo filamentoso: Isolamento e caracterização parciais.** Belo Horizonte, 2000. 152 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos)-Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.
- OLIVEIRA, I. J. **Eficiência da seleção recorrente para redução da altura de plantas em mamoneira (*Ricinus communis* L.)** Botucatu, 43 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia /Agricultura)-Faculdade de Ciências Agrônomicas, 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**, St. Paul, v. 52, p. 533-538, 1962.
- PANDEY, A. K.; REDDY, M. S.; SURYANARAYANAN, T. S. ITS-RFLP and ITS sequence analysis of a foliar endophytic *Phyllosticta* from different tropical trees. **Mycological Research**, Cambridge, v.107, n.4, p.439-444, 2003.
- PARLEVLIT, J. E.; ZADOKS, J. C. The integrated concept of disease resistance; a new view including horizontal and vertical resistance in plants. **Euphytica**, Wageningen, v. 26, p. 5-21, 1977.
- PARLEVLIT, J. E. Present concepts in breeding for disease resistance. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.22, p.7-15, 1997. Suplemento.

- PASCHOLATI, S. F. Fitopatógenos: arsenal enzimático. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos** 3<sup>ra</sup> ed. São Paulo: .Agronômica Ceres, 1995, v. 1, p. 343-364.
- PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: Mecanismos de Resistência. 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. 417-453.
- PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L.V.; ROMEIRO, R. S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. Cap. 5, p. 125-138.
- PEARSON, R. C; GOHEEN, A. C.. **Compendium of Grape Diseases**. St. Paul, Minnesota, USA, APS Press. 93 pp. 1988.
- PEREIRA, W. V. **Caracterização e identificação molecular de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose da goiaba no Estado de São Paulo**. 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- PEZET, R.; PONT, V. Ultrastructural observations of pterostilbene fungitoxicity in dormant conidia of *Botrytis cinerea* Pers. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 129, p.19-30, 1990
- PIGNONI, E.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Severidade da antracnose em feijoeiro e pinta preta em tomateiro sob diferentes concentrações de óleo de nim em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 1, p. 68-72, 2005.
- PONTZEN, R.; SCHEINPFLUG, H. Effects of Triazole Fungicides on Sterol Biosynthesis During Spore Germination of *Botrytis cinerea*, *Venturia inaequalis* and *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*. **Netherland Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 95, Supplement 1, p. 151-160, 1989.
- POSER, G.L.; MENTZ, L.A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Org.).**Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004. p. 75-89.
- PRATA, F. da C. Mamona. In: PRATA, F. da C. **Principais culturas do Nordeste**. Fortaleza: Imprensa Universitária do Ceará, 1969. p. 139-152, v. 1.
- RAMOS, A. M.; GALLY, M.; GARCÍA, M.C.; LEVIN, L. Pectinolytic enzyme production by *Colletotrichum truncatum*, causal agente of soybean anthracnose. **Revista Iberoamericana de Micologia**, Barcelona, v.27 n.4, p. 186-190, 2010.
- REED, G. **Enzymes in food processing**. 2. ed. Wisconsin: Academic Press, 1975. 573p.
- 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.
- REIGNAULT, P. et al. Pectin methylesterase from *Botrytis cinerea*: Physiological, biochemical and immunochemical studies. **Microbiology**, Reading, v.140, p. 3249-3255, 1994
- REIS, G. M. **Variabilidade genética de cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de amendoim.** 2009. 41f. Dissertação (Mestrado em Ciências- Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- RIBEIRO FILHO, J. **Cultura da Mamoneira.** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1966. 75 p.
- ROBINSON, R. W.; DECKER-WALTERS, D. S. **Cucurbits.** New York: Cab International, 1997. 226 p.
- RODRIGUES, R. F. O.; OLIVEIRA, F.; FONSECA, A. M. As folhas de Palma Christi – *Ricinus communis* L. *Euphorbiaceae Jussieu*. Revisão de conhecimentos, **Revista Lecta**, Bragança Paulista, v. 20, n. 2, p. 183-194, jul./dez. 2002.
- RODRIGUES, K. F. et al. Characterization of *Guignardia mangiferae* isolated from tropical plants based on morphology, ISSR-PCR amplifications and ITS1-5.8S-ITS2 sequences, **Mycological Research**, Cambridge, v.108, p.45-52, 2004.
- ROSEWICH, U. L.; McDONALD, B. A. DNA fingerprinting in fungi. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New York, v. 5, p. 41-48, 1994.
- ROY, B. A.. Patterns of association between crucifers and their flower-mimic pathogens: Host jumps are more common than coevolution or cospeciation. **Evolution**, Lancaster, v. 55, p. 41–53, 2001
- RUEGGER, M. J. S.; TAU-K-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Jureia –Itatins. São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, p. 205-211, 2004.
- RYCKEBOER, J. et al. Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, n. 1, p. 127-137, 2003.
- RWAHNIH, M. Al. et al. Deep sequencing evidence from single grapevine plants reveals a virome dominated by mycoviruses **Archives of Virology**, Wien, v. 156, p. 397–403, 2011
- SAMUELS, G. J.; SEIFERT, K. A. The impact of molecular characters on systematics of filamentous ascomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 33, p. 37-67, 1995.

SANTOS, R. F. et al. 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. et al. Mamona, In: RAIJ B. van (Ed) **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**, Campinas: Instituto Agrônomo/ Fundação IAC, 1997. 285 p.

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

SAVY FILHO, A. **Mamona Tecnologia Agrícola**. Campinas : EMOPI, 2005. 105 p.

SAVY FILHO, A. et al. 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. et al. IAC-2028: nova cultivar de mamona. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.42, n.3, p.449-452, mar. 2007.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R. Extratos e óleos essenciais de plantas . medicinais na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 125-138.

SILVA, F. de A. S.; AZEVEDO, C. A. V. de. Versão do programa computacional Assisat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 4 ,n. 1, p. 71-78, 2002.

SILVA, M. B. et al. Ação antimicrobiana de extratos de plantas medicinais sobre espécies fitopatogênicas de fungos do gênero *Colletotrichum*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 3, p. 57-60,2008.

SOUZA, A. E. F.; ARAÚJO, E.; NASCIMENTO, L. C. Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 32, n.6, p. 465-471, 2007.

SPONHOLZ, C. et al. Efeito do tratamento hidrotérmico e químico de frutos de banana ‘Prata’ no controle da antracnose em pós-colheita. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 29, n. 5, p. 480-485. 2004.

STAATS, M.; VAN BAARLEN, P.; VAN KAN, J. A. L.. Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 22, n.2, p. 333–346, 2005.

STEHMANN, C.; de WAARD, M. A. Biological activity of triazole fungicides towards *Botrytis cinerea*. In: LYR, H.; RUSSELL, P. E.; SISLER, H. D. (eds) **Modern fungicides and antifungal compounds**. Andover: Intercept, 1996. cap. 15, p. 125-128.

STRINGARI, D.; GLIENKE, C.; FIGURA, G. Variabilidade genética e morfológica de isolados do fungo *Guignardia* spp.. procedentes de diversas regiões e hospedeiros. In: REUNIÃO DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 24., 2004, Gramado. **Anais...** Gramado, 2004. p. 218

STRINGARY, D. Sistemática e Diversidade Genética de Isolados de *Guignardia* spp.. E *Phyllosticta* sp. nos Estados do Paraná e São Paulo. 2009. 93 f. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

SUASSUNA, N.D. et al. Efeito de temperatura no crescimento e esporulação de *Amphobotrys ricini* (= *Botrytis ricini*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 28 (suplemento), p. 232-232, ago. 2004.

SUSSEL, A. A. B. **Epidemiologia do mofo-cinzeno (*Amphobotrys ricini* Buchw.) da mamoneira**. Lavras, 2008. 116 f. Dissertação (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia), UFLA, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

TALAMINI, V.; STADNIK, M. J. Extratos vegetais e de algas no controle de doenças de plantas. In: STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. (Ed.). **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis: CCA/UFSC, 2004. p. 45-62.

TAMURA, K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 9, p. 678-687, 1992.

TAVARES, G. M.; SOUZA, P. E. de Efeito de fungicidas no controle *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n.1, p. 52-59, jan/fev. 2005.

TÁVORA, F. J. A. F. **A Cultura da mamona**. Fortaleza: Empresa de Pesquisa Agropecuária do Ceará. 1982. 111p.

THOMAS, C.A.; ORELLANA, R.G. Biochemical tests indicative of reaction of castor bean to *Botrytis*. **Science**, Washington, DC, v. 139, p. 334-335, 1963.

TÖFOLI, J.G. et al. *Botrytis* sp. em espécies hortícolas: hospedeiros, sintomas e manejo. **Biológico**, São Paulo, v.73, n.1, p.11-20, jan./jun., 2011

TORRES, L. D.; ORTINERO, C. V.; MONSERATE, J. J. Crop wastes as potential sources of natural medicine, cosmetic products, pesticides, insecticides, and paper products. **PCARRD-Highlights-2001**, Los Banos, Laguna, p. 424-444, 2002.

- UENO, B. Manejo integrado de doença. In: SILVA, S. D. dos A.; CASAGRANDE JUNIOR, J.G.; SCIVITTARO, W. B. **A cultura da mamona no Rio Grande do Sul**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007. p. 61-67. (Embrapa Clima Temperado. Sistemas de Produção, 11).
- VALETTE-COLLET, O.; CIMERMAN, A.; REIGNAULT, P.; LEVIS, C.; BOCCARA, M. Disruption of *Botrytis cinerea* pectin methylesterase gene reduces virulence on several host plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. St. Paul, v. 16, p. 360-367, 2003
- VALUEVA, T. A.; MOSOLOV, V. V. Role of Inhibitors of Proteolytic Enzymes in Plant Defense against Phytopathogenic Microorganisms. **Biochemistry**, Moscow, v. 69, n. 11, p. 1305-1309, 2004.
- VAN DER PLANK, J.E. **Principles of Plant infection**. New York: Academic. 1975.
- VAN DER PLANK, J.E. **Host pathogen interaction in plant disease**. New York: Academic, 1982.
- VENTUROSO, L.R.; BACCHI, L.M.A.; GAVASSONI, W.L. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos . **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 37, n.1, p. 18-23, 2011.
- VIGO-SCHULTZ, S.C. **Avaliação da indução de resistência no controle do cretamento bacteriano comum do feijão vagem**. 2008. 84 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrômicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2008.
- VOS, P. R. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, p. 4407-4414, 1995.
- WHELISH, J.; McCLELLAND, M. *Fingerprinting* genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 24, p.7213-7218, 1990.
- WHITE, T.J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A. et al. **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic, 1990. p.315-322.
- WHITNEY, N. G.; TABER, R. A. First report of *Amphobotrys ricini* infecting *Caperonia palustris* in the United States. **Plant Disease**, St. Paul, v. 70, n. 9, p. 892, 1986.
- WILSON, C. L. et al. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, n.2, p. 204-210, 1997.
- ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J. A. Resistência a doenças induzida pela nutrição mineral das plantas. In: FERNANDES, J. M.; PRESTES, A. M.; PICININI, E. C. (eds.). **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo: Embrapa-CNPT, 1993. v.1, p. 275-318.

ZANETTI, M. et al. Uso de subprodutos de carvão vegetal na formação do porta-enxerto limoeiro 'cravo' em ambiente protegido. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, n. 3. V. 25, p. 1-8, 2003.

ZANETTI, M. et al. Influência do extrato pirolenhoso na calda de pulverização sobre o teor foliar de nutrientes em Limoeiro 'Cravo'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 3, p. 529-533, 2004.

ZHANG, A. W. et al. Molecular identification and phylogenetic grouping of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* isolates from soybean. **Phytopathology**. St. Paul, v. 88, p. 1306 -1314, 1998.