

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
UNIDADE ACADÊMICA CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA –
PRODUÇÃO VEGETAL



CARLOS HENRIQUE CAVALCANTE DA SILVA

Caracterização e manejo da mancha branca (*Phaeoramularia manihotis* (F. Stevens & Solheim) MB Ellis) na cultura Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz).

RIO LARGO – AL

2014

CARLOS HENRIQUE CAVALCANTE DA SILVA

Caracterização e manejo da mancha branca (*Phaeoramularia manihotis* (F. Stevens & Solheim) MB Ellis) em Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, do Centro de Ciências agrárias, da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Edna Peixoto da Rocha Amorim

RIO LARGO – AL

2014

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Maria Auxiliadora G. da Cunha

S586c Silva, Carlos Henrique Cavalcante da Silva.
Caracterização e manejo da mancha branca (*Phaeoramularia manihotis* (F. Stevens & Solheim) MB Ellis) na cultura mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) / Carlos Henrique Cavalcante da Silva. – 2014.
56 f. : il.

Orientadora: Edna Peixoto da Rocha Amorim.
Dissertação (Mestrado em Agronomia : Produção Vegetal) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2014.

Bibliografia: f. 45-56.

1. Fungo. 2. Mandioca. 3. Controle alternativo. I. Título.

CDU: 633.493

TERMO DE APROVAÇÃO

CARLOS HENRIQUE CAVALCANTE DA SILVA

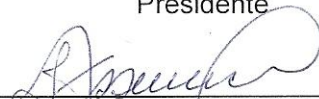
(Matrícula 12130108)

“Caracterização e manejo da mancha branca (*Phaeoramularia manihotis* (F. Stevens & Solheim) MB Ellis) na cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)”

Dissertação apresentada e avaliada pela banca examinadora em vinte e nove de maio de 2014, como parte dos requisitos para obtenção de Mestre em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal do Programa de Pós-Graduação em Agronomia “Produção Vegetal” da Unidade Acadêmica Centro de Ciências Agrárias da UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS.



Prof^a. Dr^a. EDNA PEIXOTO DA ROCHA AMORIM
Presidente



Prof^a. Dr^a. IRAILDES PEREIRA ASSUNÇÃO
Membro



Prof. Dr. CICERO LUIZ CALAZANS DE LIMA
Membro



Dr^a. EDLENE MARIA DA SILVA MORAES SANTOS
Membro

RIO LARGO – AL

2014

À meus avôs **Cícero Claudino da Silva** e **Luzinete Cavalcante da Silva** (In memorian) pelo exemplo de vida; minhas irmãs **Christianne Kelly Cavalcante da Silva** e **Chirlei Cristine Cavalcante da Silva**; e minha namorada **Julielly Medeiros Guedes**, pelo incentivo e companheirismo.

Ofereço

À minha orientadora, **Edna Peixoto da Rocha Amorim**, por ter me acolhido como orientando, por todo apoio durante o curso, por ser um exemplo de profissional e pelo seu caráter exemplar.

Homenagem

Aos meus Pais, José Aldo da Silva e Cristina Marcia Cavalcante da Silva pelo exemplo de honestidade, dedicação, apoio e incentivo em todos os momentos de minha vida.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me concedido a vida em meio à pessoas maravilhosas;

À Universidade Federal de Alagoas, junto ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Agronomia (Produção Vegetal) pela qualificação da minha formação profissional e dedicação ao ensino;

À Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa de estudos;

À Prof^ª. Dr. Edna Peixoto da Rocha Amorim, pela orientação, dedicação, apoio, confiança depositada, amizade e ensinamentos fundamentais para minha formação profissional;

À Prof^ª. Maria de Fátima Silva Muniz, pelo suporte, ensinamentos e amizade;

Aos membros da banca Prof^º. Dr. Júlio Alves Cardoso Filho, Prof^º. Dr. Cícero Luiz Calazans de Lima e Dr^ª. Edlene Maria da Silva Moraes Santos;

À minha família, pela união, pelo amor e pelos inúmeros exemplos de vida presentes nela;

À minha mãe, pela qual tenho imensa admiração, que esteve sempre ao meu lado me educando, me dando amor, carinho e batalhando pela conquista dos meus sonhos.

À minha namorada Julielly Medeiros Guedes, por está sempre ao meu lado me apoiando, compreendendo e dando constantes provas de amor e dedicada afeição;

Meus Sogros Marcelo Vieira e Rosalva Vieira, e cunhados, Diogo Izaias e Marcelo Vitor pela compreensão e apoio.

Aos colegas do Laboratório de Fitopatologia, por toda ajuda, auxílio e por todos os momentos felizes que me proporcionaram.

Aos meus colegas e amigos da Pós-graduação por todo esse tempo de amizade, companheirismo, e pelos momentos de alegria que pude compartilhar, pela certeza de ter conquistado não só colegas e sim amigos de verdade.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta na realização desse trabalho e para minha formação no curso e que por ventura não tenham sido citados, mas que merecem meu reconhecimento, respeito e admiração, pois são parte integrante para que o que era sonho enfim se transformasse em realidade;

RESUMO

A mancha branca (*Phaeoramularia manihotis*) provoca perdas significativas na cultura da mandioca, quando associada a outras manchas foliares. Este fungo pode apresentar variabilidade morfo-fisiológica dependendo das condições ambientais. As medidas de controle da doença são muito escassas e limitadas. A falta de produtos registrados vem tornando o uso de métodos alternativos uma opção cada vez mais viável. O objetivo deste trabalho foi caracterizar morfo-fisiologicamente *P. manihotis* e avaliar a eficiência de produtos naturais no controle da doença. Na avaliação do crescimento micelial foram utilizados os meios de cultura BDA, LCA, CA, ADA, V8 e FDM. Para avaliar a esporulação, foram utilizados os meios de cultura V8, BDA e CA, selecionados previamente, nas condições de escuro contínuo, claro contínuo, e luz alternada (12 horas), incubando o isolado por 25 dias. Utilizou-se DIC com nove tratamentos, em arranjo fatorial 3 x 3 com 5 repetições. A determinação de peso seco foi realizada através do cultivo de discos de micélio em meios de cultura líquidos (BD, CC e V8), seguidos da filtração e da secagem da massa micelial a 60°C por 48 horas com 3 tratamentos e 8 repetições. Para a instalação do experimento “in vitro”, discos de BDA, contendo micélio do fungo foram transferidos para placas de Petri com meio BDA contendo os produtos naturais (manipueira, óleo de hortelã, extratos de alho, melão de São Caetano e Ecolife®), o fungo *Trichoderma* sp. e o fungicida mancozeb. Como testemunha foi utilizada placa contendo meio BDA com disco de inóculo do patógeno e avaliada a porcentagem do crescimento micelial do patógeno após 7 dias de incubação. Em casa de vegetação pulverizou-se folhas de mandioca CV rosinha com os mesmos produtos naturais testados “in vitro”. E após dois dias inoculou-se com um disco de BDA, contendo micélio do fungo. 16 dias após determinou-se a severidade da doença. Foram utilizados DIC com oito tratamentos e quatro repetições. Os meios de cultura apresentaram diferença significativa em relação ao crescimento do referido fungo, sendo o meio V8 o que proporcionou maior crescimento micelial. Os meios de cultura não foram capazes de produzir estruturas reprodutivas de *P. manihotis*, nas condições estudadas. Em relação ao peso seco, o meio V8 foi o que favoreceu uma maior quantidade de massa micelial de *P. manihotis*. As características culturais do isolado de *P. manihotis* variaram de acordo com o substrato empregado, mas em geral as colônias apresentaram micélio que variou de flocoso, cotonoso e ralo; com bordos regulares à irregulares; crescimento radial com ramificações, sem ramificações e uniforme; coloração de esbranquiçada à translúcida e ausência de crescimento micelial sob o meio de cultura ou produção de conídios. “In vitro” todos os tratamentos, exceto o melão de São Caetano, foram capazes de inibir o crescimento micelial do fungo, sendo que o Ecolife®, o fungicida mancozeb e hortelã-pimenta promoveram uma inibição de 100%. O fungicida mancozeb apresentou atividade fungistática. “In vivo” o tratamento com *Trichoderma* sp., foi o único a diferir da testemunha, sendo capaz de inibir a formação da lesão nas folhas de mandioca, porém não apresentou diferença significativa dos tratamentos com melão de São Caetano, Mancozeb, Manipueira, Hortelã-pimenta e extrato de alho, os quais apresentaram lesão nas folhas. O Ecolife® foi fitotóxico às folhas de mandioca.

Palavras-chave: fungo, mandioca, controle alternativo

ABSTRACT

The white spot (*Phaeoramularia manihotis*) causes significant loss of cassava, when associated with other leaf spots. This pathogen can present morpho-physiological variability depending on environmental conditions. The measures to control the disease are very scarce and limited. The lack of registered products is making the use of alternative methods an increasingly viable option. The objective of this study was to characterize the morpho-physiologically *P. manihotis* and evaluate the efficiency of natural products for disease control. In the evaluation of mycelial growth means of PDA, LCA, CA, ADA, V8 and FDM culture were used. To assess sporulation media V8, PDA and CA the conditions of continuous darkness, continuous light and alternating light (12 hours), incubating isolated for 25 days. The determination of dry weight was performed by growing mycelial discs in liquid culture media (PD, CC and V8), followed by filtering and drying the mycelial mass at 60 ° C for 48 hours. Disks containing mycelia were transferred to Petri dishes with PDA medium containing natural products (cassava, spearmint oil, extracts of garlic, melon and São Caetano Ecolife ®), *Trichoderma* sp. and mancozeb. Was used as control plates containing PDA medium with inoculum of the pathogen disk and evaluated the percentage of the pathogen mycelial growth after 7 days of incubation. In greenhouse-sprayed if cassava leaves CV rosinha with the same natural products tested "in vitro". And after two days was inoculated with a PDA disc containing the mycelium of the fungus. 16 days after it was determined the severity of the disease. The culture media showed significant differences in relation to the growth of this fungus, and the V8 which means greater mycelial growth. The culture media were not able to produce spores of *P. manihotis*. V8 medium was which favors a greater amount of mycelium of *P. manihotis*. The cultural characteristics of the isolate of *P. manihotis* varied according to the substrate used, but in general the colonies showed that mycelium ranged from flaky, cottonoso and drain; with regular to irregular edges; radial growth of branches without ramifications and uniform; whitish translucent coloration, and no mycelial growth in the culture medium or production of conidia. All treatments except the melon Sao Caetano, were able to inhibit the mycelial growth of the fungus, and Ecolife ®, mancozeb and peppermint promoted an inhibition of 100%. *Trichoderma* sp. was the only witness to differ, being able to inhibit lesion formation in cassava leaves, but no significant difference of the melon Sao Caetano, mancozeb, cassava juice, mint-pepper and garlic extract. Ecolife ® was toxic to cassava leaves.

Keywords: fungus, cassava, alternative control

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Folhas de mandioca submetidas ao teste de patogenicidade de <i>Phaeoramularia manihotis</i> (A: folha inoculada; B: testemunha).....	21
Figura 2:	Erlenmeyres contendo meios líquidos V8, BD e CC respectivamente, com três discos de micélio de <i>Phaeoramularia manihotis</i>	24
Figura 3:	Colônia (A) e Conídios (B) de <i>Phaeoramularia manihotis</i> em meio BDA, isolados de folhas de mandioca.....	27
Figura 4:	Folhas de mandioca com sintomas da mancha branca (<i>Phaeoramularia manihotis</i>), após inoculação com o isolado.....	28
Figura 5:	Inibição do crescimento micelial de <i>Phaeoramularia manihotis</i> “in vitro” na presença manipueira (40%), Ecolife® (20%), testemunha, extrato de alho (20%), extrato de melão de São Caetano (20%), <i>Trichoderma</i> sp. (10^8 conídios.mL ⁻¹), fungicida mancozeb (2,0 g/L ⁻¹) e óleo de hortelã (0,1%).....	35
Figura 6:	Avaliação do efeito fungicida “in vitro” do óleo de hortelã-pimenta, Ecolife® e fungicida Mancozeb.....	38
Figura 7:	Efeito de produtos naturais, <i>Trichoderma</i> sp. e fungicida sobre a severidade da mancha branca da mandioca (<i>Phaeoramularia manihotis</i>).....	39
Figura 8:	Efeito de extratos vegetais, óleo essencial, <i>Trichoderma</i> sp., Ecolife® e fungicida sobre a severidade da mancha branca da mandioca (<i>Phaeoramularia manihotis</i>).....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Médias de crescimento micelial de <i>Phaeoramularia manihotis</i> em diferentes meios de cultura após sete dias de inoculação.....	29
Tabela 2:	Caracterização cultural de <i>Phaeoramularia manihotis</i> em meios de V8, BDA e CA.....	32
Tabela 3:	Médias para influência dos meios de cultura líquidos no crescimento de <i>Phaeoramularia manihotis</i> , aos sete dias de incubação.....	33
Tabela 4:	Porcentagem de inibição de crescimento micelial de <i>Phaeoramularia manihotis</i>	34

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1- Aspectos gerais da cultura da mandioca	13
2.2- Importância da mandioca	14
2.3- Mancha Branca em mandioca	16
2.4- Manejo da Mancha Branca da Mandioca	17
2.5- Importância da Caracterização Morfofisiológica	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1- Isolamento e teste de patogenicidade de <i>Phaeoramularia manihotis</i>	22
3.2- Identificação do fungo	23
3.3- Obtenção dos produtos alternativos	24
3.4- Caracterização morfo-fisiológica de <i>Phaeoramularia manihotis</i>	24
3.4.1- Influência dos meios de cultura sobre o crescimento micelial de <i>Phaeoramularia manihotis</i>	24
3.4.2- Caracterização cultural de <i>Phaeoramularia manihotis</i>	25
3.4.3- Influência de meios de culturas e regimes de luz sobre a esporulação de <i>Phaeoramularia manihotis</i>	25
3.4.4- Influência dos meios de cultura sobre a produção de massa micelial de <i>Phaeoramularia manihotis</i>	26
3.5- Avaliação “in vitro” dos produtos naturais sobre o crescimento micelial de <i>Phaeoramularia manihotis</i>	27
3.6- Avaliação do efeito fungicida	28
3.7- Avaliação “in vivo” de produtos naturais no controle da mancha branca em mandioca (<i>Phaeoramularia manihotis</i>)	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1- Identificação do isolado	29
4.2- Teste de patogenicidade e reisolamento de <i>Phaeoramularia manihotis</i>	30
4.3- Caracterização morfo-fisiológica de <i>Phaeoramularia manihotis</i>	30
4.3.1- Influência dos meios de cultura sobre o crescimento micelial de <i>Phaeoramularia manihotis</i>	30
4.3.2- Influência de meios de cultura e regimes de luz sobre a esporulação de <i>Phaeoramularia manihotis</i>	32

4.3.3- Características culturais de <i>Phaeoramularia manihotis</i>	34
4.3.4- Influência de meios de cultura líquido no crescimento micelial de <i>Phaeoramularia manihotis</i>	35
4.4- Avaliação “in vitro” de produtos naturais sobre o crescimento micelial de <i>Phaeoramularia manihotis</i>	36
4.5- Avaliação do efeito fungicida	39
4.6- Avaliação de produtos naturais sobre a intensidade da mancha branca da mandioca (<i>Phaeoramularia manihotis</i>)	40
5. CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS	45

1. INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é cultivada em mais de 90 países tropicais e subtropicais (CONCEIÇÃO, 1987). O Brasil, segundo maior produtor, possui aproximadamente 13% da produção mundial, ficando atrás apenas da Nigéria (FAO, 2000; LORENZI, 2003; CONAB, 2012).

Apesar de sua raiz possuir um baixo valor nutricional, em muitas regiões pobres do Brasil a planta da mandioca é a principal fonte de proteínas na alimentação (CARVALHO; KATO, 1987). Na região do nordeste brasileiro *M. esculenta* é o principal alimento para 60 milhões de pessoas (NASSAR, 2006).

O Estado de Alagoas possui uma área plantada de 20.915 hectares com uma produção média de 15,5 toneladas por hectare (IBGE, 2012), abaixo da média nacional de 26,1 t/ha (SILVA; ANDRADE, 2011, FRAIFE FILHO; BAHIA, 2012). Esse fato está associado principalmente por conta do baixo uso de tecnologias, como a não utilização de insumos, manejo inadequado e emprego de variedades suscetíveis a doenças (MATTOS; GOMES, 2000).

Entre as doenças que afetam a cultura da mandioca a mancha branca (*Phaeoramularia manihotis*) é uma das principais. Sua importância é decorrente da sua incidência, que independe das condições climáticas e épocas do ano (MASSOLA; BEDENDO, 1997b). Seu ataque pode provocar desfolha da cultura (SANTOS et al, 2003).

A identificação desse fungo sempre foi realizada basicamente pela morfologia de suas estruturas macro e microscópicas (TORTORA et al., 2009). No entanto alguns fatores como a composição do substrato e idade da cultura podem afetar a morfologia dos conídios, interferindo na definição precisa da posição taxonômica dos isolados, originando relatos convergentes (ORREGO FUENTE et al., 1996).

As medidas de controle para mancha branca são muito escassas e limitadas, se restringindo a utilização de variedades resistentes e manejo cultural, visando à redução das perdas (KIMATI et al., 1997), porém a eficiência dessas técnicas se limita a partir do momento em que o patógeno encontra condições favoráveis (LOZANO, 1989). Como não há registro de fungicidas controladores desse patógeno para a cultura e pelos seus efeitos como acúmulo de substâncias nocivas no solo e água e consequente contaminação do homem e

ambiente (TALAMINI; STADNIK, 2004), o uso de controles alternativos, como extratos, óleos vegetais e biocontroladores, vem se tornando uma opção cada vez mais viável em aspectos econômicos e ambientais (BETTIOL, 1991).

Resultados promissores obtidos em trabalhos desenvolvidos com extratos e óleos essenciais de plantas, tem resultado em potenciais controladores fitopatogênicos, tanto com ação fungitóxica direta, inibindo crescimento e esporulação de fungos, quanto pela indução de fitoalexinas, indicando compostos elicitores (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000). Dentre esses extratos e óleos de plantas, estão espécies como hortelã pimenta (*Mentha piperita*), Ecolife® (produto a base de biomassa cítrica), a manipueira (extrato líquido das raízes de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)) e os extratos de alho (*Allium sativum* L.) e melão de São Caetano (*Momordica charantia* L.). E os controladores biológicos como *Trichoderma* spp. possuem a capacidade de produzir antibióticos (DENIS; WEBSTER, 1971).

Porém, o comportamento desses produtos alternativos, variam muito em relação aos distintos gêneros ou até mesmo espécies testadas.

Desta maneira o objetivo do presente trabalho foi caracterizar morfo-fisiologicamente o agente etiológico causador da mancha branca da mandioca e avaliar os efeitos de produtos naturais e indutores de resistência sobre a severidade da doença.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Aspectos gerais da cultura da mandioca

O gênero *Manihot* apresenta 98 espécies, onde a única cultivada é a *Manihot esculenta* Crantz (mandioca) por suas raízes ricas em carboidratos, fora ela apenas mais uma espécie possui importância econômica, *M. glaziovii*, utilizada na produção de látex e em trabalhos de resistência genética ao vírus do mosaico (NASSAR et al., 1986; HERSHEY, 1992).

A *M. esculenta* é uma planta perene, arbustiva, pertencente à família das Euforbiáceas. Sua raiz, rica em fécula, é a parte mais importante usada na alimentação humana e animal e como principal fonte de carboidratos para milhões de pessoas ou como matéria prima para diversas indústrias (FRAIFE FILHO; BAHIA, 2012). Sua origem é sul-americana, provavelmente do Brasil, e seu cultivo ocorre desde a antiguidade pelos povos nativos desse continente (SILVA; ANDRADE, 2011, SILVA et al., 2001).

O ácido cianídrico (HCN), de acordo com sua concentração, é o responsável pela classificação das cultivares de mandioca (PEREIRA et al., 1977). As cultivares com concentração do HCN abaixo de 100mg.kg^{-1} são denominadas: mansas, de mesa, macaxeira ou aipim, as quais são destinadas para consumo *in natura*; já as que apresentam concentrações mais altas que a citada são denominadas como: brava ou industrial, que são utilizadas para transformação na indústria (ALVES et al., 2009).

No Brasil foram catalogadas mais de quatro mil variedades, sendo as mais recomendadas para a região Nordeste: Formosa, Mani Branca, Arari, BRS Guaíra, BRS Mulatinha, BRS Dourada, BRS gema de ovo, Crioula, Amansa burro e Rosinha. (EMBRAPA, 2014).

Seu ciclo natural pode chegar a cerca de 36 meses dependendo da variedade, mas comercialmente esse período é reduzido para 12 a 18 meses. Suas condições climáticas ideais são: faixa ótima de temperatura entre $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $27\text{ }^{\circ}\text{C}$, podendo se estabelecer em ambientes com temperaturas entre $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $38\text{ }^{\circ}\text{C}$; 1000 a 1500 mm/ano, mas produz em regiões tropicais com 4000 mm/ano e regiões semi-áridas com precipitação entre 500 e 700 mm/ano; altitudes de 600 a 800 metros acima do nível do mar; período de luz de 12 horas/dia (SILVA; ANDRADE, 2011).

Apesar de Nassar (2006) citar que a mandioca é apontada por diversos pesquisadores, como a cultura de maior eficiência biológica como produtora de energia e a de melhor adaptação a solos deficientes em nutrientes, os solos arenosos e de textura média, bem drenados, profundos, descompactados e com pH em torno de 5,5 a 6,5 são os mais adequados ao desenvolvimento da cultura, segundo Alves et al. (2009).

A propagação nos sistemas de cultivo brasileiro ocorre através de ramos com 5 a 7 gemas, 20cm de comprimento e 2cm de diâmetro, com idade entre 10 a 12 meses (EMBRAPA, 2014). São plantadas normalmente no início das estações chuvosas para favorecer uma boa brotação, enraizamento e produtividade. O espaçamento vai depender da variedade, fertilidade do solo e sistema de cultivo, apresentando para fileira simples: 1,00 x 0,6 m a 1,00 x 1,00 m e fileiras duplas: 2,00 x 0,60 x 0,60 m ou 2,00 x 0,80 x 0,80 m, este último permitindo rotação de culturas (ALVES et al., 2009).

A região Nordeste tradicionalmente caracteriza-se pelo sistema de policultivo, ou seja, mistura de mandioca com outras espécies alimentares de ciclo curto, principalmente feijão, milho e amendoim. (FRAIFE; BAHIA, 2012). O plantio escalonado na região, abastece o mercado, sendo comum encontrar a cultura implantada durante todas as épocas do ano (SILVA; ANDRADE, 2011).

2.2- Importância da mandioca

No trabalho escrito por Sousa (1851), citado por Galera (2008) já há relatos sobre a existência de duas “castas” distintas de mandioca no século XVI, as com *peçonha*, utilizadas para produção de farinha e entre outros produtos processados e os *aipins*, consumidos assados, cozidos e como bebidas.

Nassar (2006) cita dados da FAO, que indicam a mandioca como a principal cultura de subsistência tropical no mundo e a quarta mais importante na produção de alimentos, onde os consumidores retiram cerca de 70% das calorias diárias. Além disso, esse autor cita também que a mandioca é destaque, dentre as outras culturas, em vários estudos científicos, por

possuir a mais alta produtividade de calorías, maior eficiência biológica e melhor adaptação a solos com deficiência nutricional.

A mandioca desempenha uma elevada importância social como principal fonte de carboidratos para mais de 700 milhões de pessoas, essencialmente nos países em desenvolvimento. Adicionalmente, a exploração do amido (denominado fécula) principalmente pelo setor industrial, e o emprego da mandioca na alimentação animal ressaltam o valor econômico da cultura (SILVA; ANDRADE, 2011). Estima-se que no Brasil, nas fases de produção primária e no processamento de farinha e fécula, são gerados um milhão de empregos e uma receita bruta anual de 2,5 bilhões de dólares; a produção que é transformada em farinha e fécula gera receitas equivalentes a 600 milhões de dólares (SOUZA; FIALHO, 2003).

A área plantada no mundo é de cerca de 18,7 milhões de hectares com uma produção de 250,75 milhões de toneladas, onde o Brasil possui aproximadamente dois milhões de hectares plantados e uma produção de 26,1 milhões de toneladas (SILVA; ANDRADE, 2011, FRAIRE FILHO; BAHIA, 2010), ficando atrás apenas da Nigéria com uma produção de 39 milhões de toneladas e a frente da Tailândia com 21,9 milhões de toneladas (CONAB, 2012).

A mandioca encontra-se presente em todo o território nacional. A região Nordeste destaca-se com aproximadamente 50% da área plantada e 34,7% da produção nacional, porém com rendimento médio de apenas 10,6 t/ha; as demais regiões participam com 25,9% (Norte), 23,0% (Sul), 10,4% (Sudeste) e 6,0% (Centro-Oeste). As maiores produtividades, com média de 20 toneladas de raízes/ha, estão nos estados de São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul (SILVA; ANDRADE, 2011; SOUZA; FIALHO, 2003).

Em Alagoas a área de cultivo principal fica localizada no agreste em 14 municípios (Arapiraca, Campo Grande, Craíbas, Coité do Nóia, Feira Grande, Girau do Ponciano, Igaci, Junqueiro, Lagoa da Canoa, Limoeiro de Anadia, Palmeira dos Índios, São Sebastião, Olho D'Água Grande e Taquarana) com uma área de cerca de 20 mil hectares, distribuídas entre 30 mil famílias, que produzem anualmente 325 mil toneladas. A produtividade alcança 18 t/ha. A produção é destinada para o próprio Estado e para estados vizinhos como Sergipe e Pernambuco, tanto *in natura* como processadas (SEBRAE, 2008).

Por ser consumido normalmente *in natura*, o cultivo do aipim é conduzido, em geral sem uso de insumos, sob manejo inadequado e com utilização de cultivares suscetível a doenças (MATTOS; GOMES, 2000). Este fato torna a cultura sujeita a diversas doenças e entre essas destacam-se as causadoras de manchas foliares como mancha parda (*Cercosporidium henningsii*), mancha parda grande (*Cercospora vicosae*) (TERI et al., 1978) e mancha branca (*Phaeoramularia manihotis*) (SILVA; ANDRADE, 2011).

2.3- Mancha Branca em mandioca

A cercosporiose da mandioca ocorre com grande frequência na cultura, causando lesões nas folhas, sob a forma de manchas necróticas, diminuindo a área fotossintética da planta (SOUZA; FIALHO, 2003).

A mancha branca (*Phaeoramularia manihotis* (F. Stevens & Solheim) MB Ellis), anteriormente denominada *Cercospora caribaea* (SOUZA; FIALHO, 2003; KIMATI et al., 1997), foi, segundo Solheim e Stevens (1931), constatada na Guiana Inglesa, no continente Sul-americano. Em 1911 foi constatada na Cuba (CARDIN, 1911). Essa espécie pertence ao filo *Ascomycota*, ordem *Capnodiales*, Família *Mycosphaerellaceae*, Gênero *Phaeoramularia* (MASSOLA JR; KRUGNER, 2011).

O agente causal da mancha branca possui uma grande capacidade de adaptação a diversas condições climáticas, sendo possível detectar a doença em ampla distribuição geográfica e em qualquer época do ano, sendo as condições mais favoráveis ao seu aparecimento, estações chuvosas (alta umidade) e temperaturas mais amenas como nas baixadas e litoral brasileiro. Podem também ocorrer em menor intensidade em temperaturas mais altas (MASSOLA JR; BEDENDO, 1997b; AYESU-OFEEI; ANTWI- BOASIAKO, 1996; SILVA et al., 1988; SILVA; ANDRADE, 2011).

O fungo coloniza, preferencialmente, as folhas mais velhas das plantas, causando manchas de coloração que variam do branco ao pardacento, com bordos bem definidos e avermelhados, formato circulares a angulares e com tamanho entre 1 a 7 mm de diâmetro, a lesão fica profunda em ambos os lados da folha. Folhas muito atacadas tornam-se amarelas e caem precocemente (ALVAREZ; LLANO, 2002; SILVA; ANDRADE, 2011).

Duas das características da mancha branca que difere das outras cercosporioses da mandioca (*C. henningsii* e *C. vicosae*) são seus sintomas e as estruturas reprodutivas: na lesão são formados conidióforos fasciculados soltos, de cor pardo-amarelados e largura uniforme, não são ramificados, geniculados, septados, tortuosos e bastante longos, geralmente 3-5 a 50-200 μ . Seus conídios são hialinos, ovalados a cilíndricos, com pontas arredondas, podendo ter de 1 a 6 septos, retas ou semicurvas com tamanho de 4 a 8 x 20 a 90 μ . Sua penetração ocorre pelas cavidades estomáticas, e a colonização nos espaços intercelulares. O ciclo se repete em toda estação chuvosa devido à dispersão através do vento e pingos de chuva. Sua sobrevivência em períodos desfavoráveis ocorre nos tecidos velhos de folhas infectadas. (VIÈGAS, 1941; POWELL, 1972).

Apesar de não haver muitos trabalhos quantificando perdas à cultura, sabe-se que alta incidência do patógeno pode provocar desfolha ou queda na produção das raízes, quando associadas com outras cercosporioses (CARVALHO et al., 2012a; MASSOLA JÚNIOR; BEDENDO, 1997a).

2.4- Manejo da Mancha Branca da Mandioca

Desde a mais remota antiguidade, as doenças de plantas causam problemas para os sistemas agrícolas. Isso é agravado cada vez mais com o progresso da agricultura, que acaba gerando um desequilíbrio biológico (MICHEREFF, 2001).

De acordo com esse mesmo autor, o controle químico de plantas é o meio mais eficiente para garantir uma boa produtividade e qualidade de produção, porém o uso de agroquímicos trás consequências negativas para o meio ambiente, como intoxicação, erosão e contaminação dos solos, das águas e alimentos (CAMATTI-SARTORE et al., 2011). No caso das manchas foliares da mandioca, o controle químico, apesar de eficiente, não é economicamente viável (MIURA; MONTEIRO, 1997). Até então poucas medidas de controle têm sido recomendadas, como uso de variedades resistentes, a diminuição da densidade de plantio e a eliminação de espécies nativas de mandioca, e também a eliminação de possíveis hospedeiros alternativos da doença (MASSOLA JÚNIOR; BEDENDO, 2005).

O fato de haver poucas medidas de controle se dá pela pequena importância econômica dada aos prejuízos ocasionados por *P. manihotis*. No entanto, o aumento da incidência dessa doença tem levado à procura de métodos alternativos de controle, tais como,

uso de biofungicidas, extratos vegetais e óleos essenciais. E como o mercado consumidor atual exige a utilização de produtos naturais para controle de doenças de plantas, visando à saúde ambiental, a utilização do controle alternativo vem ganhando cada vez mais importância (FERRAZ, 1992; PRIMAVESI, 1997; VERZIGNASSI et al., 2003; STAUFFER et al., 2000). Os resultados alcançados nessa linha de pesquisa têm-se mostrado promissores para uma utilização prática no controle de fitopatógenos em diversas culturas (FRANCO; BETTIOL, 2000; BENATO et al., 2002).

Culturas e produtos a base de plantas como alho (*Allium sativum* L.), melão de São Caetano (*Momordica charantia* L.), Ecolife® (biomassa cítrica), manipueira e hortelã (*Mentha piperica* L), possuem fenóis, quinonas, saponinas, flavonoides e terpenóides em quantidades suficientes para repelir insetos e prevenir doenças de plantas (SILVA JUNIOR; VIZZOTO, 1996; FURTADO, 2006).

A Manipueira é um subproduto gerado do processo de prensagem das raízes da mandioca na fabricação da farinha. Esse líquido leitoso de coloração amarelo-claro contém derivados cianogênicos (Linamarina e linamarase) e sais minerais (CEREDA, 2001; WOSIACKI; CEREDA, 2002; SEBRAE, 2014).

Esses resíduos da prensagem normalmente são lançados ao meio ambiente, principalmente em rios e açudes, provocando intoxicação ao homem e morte de peixes e outros animais, como também contaminação de solos. Esses prejuízos podem ser evitados através do uso como fertilizantes naturais, já que a manipueira é rica em nitrogênio, fósforo e, principalmente, em potássio, e também como defensivos agrícolas, uma vez que esse extrato apresenta-se como pesticida agrícola natural, agindo como nematicida, inseticida e fungicida (FRANCO, 1986; FRANCO, 1990; SENA; PONTE 1982; PONTE, 2000; SEBRAE, 2014; SILVA, 2003).

O Ecolife® é um produto a base de biomassa cítrica, com formulação aquosa e heterogenia, composto por bioflavonóides cítricos (Vitamina P), ácido ascórbico (Vitamina C), fitoalexinas cítricas, ácido láctico, ácido cítrico, polifenóis, glicerina vegetal e ácidos orgânicos diluídos, o que o torna efetivo como protetor em culturas como pepino, cacaueteiro e cafeeiro (CAVALCANTI et al., 2006)

Segundo Rosa et al (2007) essas substâncias promovem um equilíbrio metabólico nas funções das plantas, o que auxilia na prevenção de doenças. Várias pesquisas vêm testando os

efeitos fungicidas do Ecolife[®] tanto “in vivo” quanto “in vitro” em diversas culturas (BARGUIL et al., 2005; VILAS-BÔAS et al., 2004).

O alho é rico em compostos com enxofre, que são metabolitos secundários derivados de aminoácidos, o qual exercem atividade antimicrobiana e toxicidade a nematoides, insetos e fungos, e também são capazes de inibirem enzimas (HEINZMANN, 2002). Os seus efeitos inibitórios no desenvolvimento sobre fungos é reconhecido mundialmente (STAUFFER et., 2000).

Por essas e outras propriedades o alho já vinha sendo utilizado na medicina humana, como controle de doenças parasitárias tanto bacterianas (*Helicobacter pylori*), como fúngicas (*Candida albicans*) (O’GARA et al., 2000; LEMAR et al., 2005), e também como indutor de quebra de dormência em videira (KUBOTA; MIYAMUKI, 1992).

O melão de São Caetano (*M. charantia*) pertence à família Cucurbitaceae. É uma trepadeira utilizada medicinalmente e muito popular em países em desenvolvimento como o Brasil. Seu fruto possui forma oblonga parecendo um pepino pequeno, junto de suas folhas e raízes são utilizados para o alívio de cólicas, como cicatrizantes, contra parasitas internos e ectoparasitas. Alguns estudos fitoquímicos de seus componentes botânicos apresentaram 50 novos compostos biologicamente ativos como glicosídeos cucurbitins e cucurbitane (CHEN et al., 2008)

O hortelã-pimenta (*M. pepirita*) é uma planta aromática da família Lamiaceae. Seu óleo extraído possui grandes concentrações de flavonoides e mentol e é utilizado como aditivo alimentar, produtos de higiene bucal e em ramos farmacêuticos, possuem ações antimicrobianas, espasmolíticas, antifúngicas e antibacterianas (SIMÕES; SPITZER, 2000; MARTINS, 1998).

Outro método utilizado é o controle biológico, ou seja, a utilização de microrganismos antagonistas para o controle de doenças de plantas. Esse para substituir o controle químico, vai depender da disponibilidade e efetividade dos agentes de controle, pois são poucos os produtos disponíveis no mercado para esse tipo de uso (SILVA et al., 2008).

As espécies de *Trichoderma*, fungos filamentosos, são inofensivos ao homem e animais, e são bastante persistentes em solos e plantas (FARIA et al., 2003). Além de possuírem a capacidade de sobreviver em condições adversas e inibir populações de patógenos em condições de solos diferentes (VINALE et al., 2008). Seus métodos de ação

contra fungos fitopatogênicos são através da competição por espaço e nutrientes, antibiose, inativação de enzimas do patógeno, indução de resistência e microparasitismo (MELO, 1998). O *Trichoderma* pode penetrar as paredes celulares das hifas dos hospedeiros, através da ação de enzimas como quitinases, glucanases e proteases (ZEILINGER; OMANN, 2007).

Esse biocontrolador tem sido utilizado em várias pesquisas visando reduzir a população de patógenos de plantas, sendo o agente de controle biológico mais utilizado no Brasil e em alguns outros países da América Latina (LOPES, 2009; MAY-DE-MIO et al., 2001; MORANDI; BETTIOL, 2009) na forma de bioprotetores (microbiolização de sementes), biofertilizantes e inoculadores de solo (HARMAN, 2004; FARIA et al., 2003; LUDWIG et al., 2009).

2.5- Importância da Caracterização Morfofisiológica

A caracterização morfofisiológica de um agente patogênico é fundamental para o conhecimento de sua biologia. Só dessa maneira é possível estabelecer estratégias de controle do mesmo, sendo importante conhecer a variabilidade genotípicas das populações do patógeno, o que pode determinar o potencial de adaptação do organismo às condições adversas (BROWN, 1998).

Dessa forma é fundamental o conhecimento de características fisiológicas e morfológicas do fungo, tais como observações macroscópicas das colônias: verso e reverso (alterado ou inalterado), pigmentação (presença ou ausência, cor do pigmento, difuso, restrito à colônia), superfície (lisa, fissurada, rugosa), bordas (regulares, irregulares, radiadas), textura ou consistência, velocidade de crescimento, topografia (plana, convexa, umbilicada, pregueada, cerebriforme), aspecto (brilhante, opaco, seco, úmido) e diâmetro da colônia. E também o comportamento nutricional, através da utilização de meios de cultura diferentes, testando a eficiência do crescimento micelial, esporulação e peso seco de fitopatógenos (DHINGRA; SINCLAIR, 1995).

Geralmente a classificação taxonômica das espécies fitopatogênicas, é realizada através das características morfológicas dos conídios (tamanho e número de septos) e pelo formato das vesículas terminais (ORREGO FUENTE et al., 1996). Porém o formato das vesículas pode variar de acordo com o substrato utilizado e idade da cultura, o que torna esse

método não confiável para estudos taxonômicos (HUNTER; ZUMPETTA 1975; HUNTER; BARNETT, 1978; ORREGO FUENTE et al., 1996).

Um dos métodos para testar cultivares de plantas resistentes a determinados fungos fitopatogênicos é através da produção massal e inoculação de seus esporos em ambientes artificiais controlados (HANADA et al., 2002), porém há uma dificuldade muito grande em se conseguir isolados esporulantes ou padronizar condições ideais para esporulação (CRUZ et al., 2009). A esporulação e crescimento micelial de fitopatógenos vão depender da composição do meio de cultura, da temperatura e luminosidade (DHINGRA; SINCLAIR, 1995). Mas nem sempre as condições que influenciam o crescimento micelial vão influenciar a esporulação, pois a luz exerce um efeito direto sobre o fungo, induzindo ou inibindo a formação de estruturas reprodutivas (NOZAKI et al., 2004). A composição do meio, alguns mais ricos em carboidratos complexos, segundo esses autores são menos adequados para formação de hifas vegetativas e mais adequados à produção de esporos. As células reprodutivas envolvidas no processo de diferenciação, que é a esporulação, são afetadas por modificações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas (CASTRO; COELHO, 2000)

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia e casa de vegetação do Centro de Ciências Agrárias (CECA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), localizado no município de Rio Largo-AL, durante o período de setembro de 2012 a março de 2014.

3.1 Isolamento e teste de patogenicidade de *Phaeoramularia manihotis*

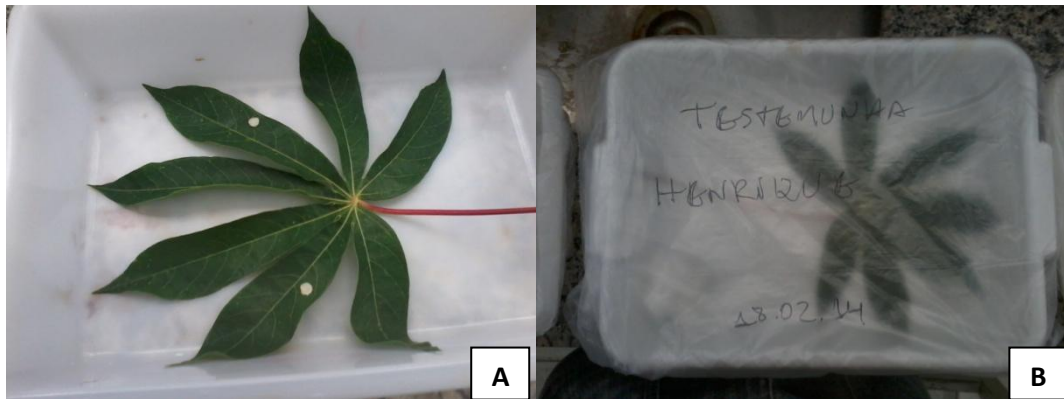
O isolado foi obtido a partir de folhas com sintomas característicos da doença, coletadas em áreas de produção em regiões do Estado (Arapiraca e Feira Grande). Após lavagem dos tecidos com água e sabão, foram efetuados pequenos cortes na região de transição da lesão e procedeu-se a desinfestação superficial em álcool 70% durante 30 segundos e em hipoclorito de sódio a 1,5% por um minuto, sendo em seguida lavados por duas vezes consecutivas em água destilada esterilizada (ADE). O material foi plaqueado em meio BDA (batata-dextrose-ágar), com o auxílio de uma pinça flambada. As placas foram vedadas com papel filme. Após sete dias de incubação, em condições controladas ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas), as colônias que apresentaram crescimento micelial padrão de *P. manihotis* e sem contaminação visual, foram mantidas visando estudos posteriores.

Foram retirados discos das margens de colônias jovens do isolado em meio de cultura e colocado em frasco de vidro contendo ADE, sendo armazenado à temperatura ambiente (CASTELLANI, 1967) e em tubo de ensaio contendo meio BDA inclinado que foram armazenados a 4°C em geladeira.

Na avaliação da patogenicidade, foram utilizadas folhas de mandioca sadias, coletadas em áreas de plantio do Estado e desinfetadas superficialmente com água e sabão. Pequenos discos de micélio com 5mm de diâmetro do isolado foram retirados de colônias puras e depositados sobre as folhas (cv. Rosinha), previamente desinfetadas e feridas com uma agulha, em dois pontos equidistantes. Para o tratamento controle (testemunha) foram utilizados discos de ágar sem o inóculo, depositados na superfície foliar. A folha inoculada e a testemunha foram mantidas em câmara úmida, por cinco dias, cobrindo-se as bandejas com sacos plásticos, internamente umedecidos com ADE (Figura 1). As folhas que apresentaram

sintoma típico da doença foram utilizadas para reisolamento do patógeno em placas de Petri contendo meio BDA, sob temperatura ambiente.

Figura 1- Folhas de mandioca submetidas ao teste de patogenicidade de *Phaeoramularia manihotis* (A: folha inoculada; B: testemunha).



Fonte: Autor, 2014.

3.2 Identificação do fungo

A identificação do isolado foi realizada por meio de observações macroscópicas e microscópicas.

Essas observações foram realizadas em colônias cultivadas a 28°C em meio BDA, em placas de Petri com nove dias. A mensuração do crescimento micelial foi realizada no sétimo dia de incubação, determinando-se o diâmetro das colônias com o auxílio de um paquímetro.

As observações microscópicas foram realizadas através de microcultivo (KERN; BLEVINS, 1999) em meio BDA a 28°C por até 14 dias. As lamínulas foram retiradas, colocadas sobre uma lâmina e coradas com lactofenol (aproximadamente 50 µL). Em seguida, os conídios foram visualizados ao microscópio (40X) e fotografados com câmera digital. A identificação da espécie foi baseada em chave dicotômica para espécies de *Cercospora* (ELLIS, 1976).

3.3 Obtenção de produtos alternativos

O óleo de hortelã-pimenta foi obtido em estabelecimento comercial de Maceió. O Ecolife® foi fornecido por Quinabra S.A., São José dos Campos - SP, Brasil ao Laboratório de Fitopatologia da UFAL.

Para obtenção dos extratos vegetais de alho e melão de São Caetano, foram coletados 10g de material vegetal e triturados em um liquidificador com 100mL de água destilada esterilizada (ADE). A solução foi filtrada em gaze wathman n°1, colocadas em erlenmeyers cobertos com papel alumínio, formando a solução padrão. Os extratos vegetais foram preparados no momento da aplicação.

A manipueira, um subproduto da farinha de mandioca (*Manihot esculenta*) foi obtido em uma casa de farinha do município de Messias (AL).

E o isolado de *Trichoderma* sp. foi obtido da coleção de microrganismos do laboratório de fitopatologia (CECA/UFAL).

3.4 Caracterização morfo-fisiológica de *Phaeoramularia manihotis*

3.4.1- Influência dos meios de cultura sobre o crescimento micelial de *Phaeoramularia manihotis*

Foram utilizados os seguintes meios de cultura: BDA (200g de batata, 20g de dextrose 17g de ágar, 1000mL ADE); LCA (200mL de leite de coco, 20g de dextrose, 17g de ágar, 800mL ADE); CA (200g de cenoura, 17g de ágar, 1000mL ADE); ADA (100g de aveia, 20g de dextrose, 17g de ágar, 1000mL ADE); V8 (200mL de suco de vegetais V8 “Campbell Soup Co.”, 17g de Agar, 3,2 g de CaCO₃ e 800mL de ADE); e FDM (100g de folhas de mandioca, 20g de dextrose, 17 de ágar, 1000mL ADE).

Das culturas puras de *P. manihotis*, com nove dias de cultivo, foram removidos discos de micélio com 5 mm de diâmetro e depositados no centro de cada placa de Petri, contendo os diferentes meios. Em seguida, as placas com patógeno foram incubadas à 25 ± 2°C e fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias.

A taxa de crescimento micelial (TCM) foi avaliada em intervalos de vinte e quatro horas, pela medição do diâmetro da colônia em dois sentidos diametralmente opostos, com o auxílio de uma régua milimetrada e cálculo da média por placa.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 6 tratamentos e 5 repetições sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

3.4.2- Caracterização cultural de *Phaeoramularia manihotis*

Para o estudo da diversidade macromorfológica das colônias do isolado, foram analisados o aspecto do micélio, forma dos bordos, coloração da colônia, reverso da colônia, presença ou ausência de micélio sob o meio de cultura e também presença ou ausência de conídios. Foram utilizados os meios de cultura V8, BDA, e CA, selecionados por apresentarem melhor crescimento micelial do fungo.

3.4.3- Influência de meios de cultura e regimes de luz sobre a esporulação de *Phaeoramularia manihotis*

Utilizou-se os meios de cultura V8, BDA e CA selecionados anteriormente por apresentarem melhor crescimento micelial. Discos de micélio com sete dias de cultivo foram depositados no centro de placas de Petri, contendo os meios selecionados. Em seguida, o micélio do patógeno foi incubado a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ nas condições de escuro contínuo, claro contínuo, e luz alternada (12 horas de claro e 12 horas de escuro). Aos vinte e cinco dias (períodos menores não foram suficientes para produção de esporos) da incubação foi avaliada a produção de conídios.

Para a determinação da produção de conídios, preparou-se uma suspensão de esporos, adicionando-se 20 mL de água destilada esterilizada em cada placa de Petri, para facilitar a remoção do micélio, mediante o uso de escova de cerdas macias. O material foi filtrado em duas camadas de gaze esterilizada, e a concentração determinada em câmara de Neubauer, com microscópio óptico, obtendo uma média de duas leituras para cada repetição dos tratamentos.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com nove tratamentos em arranjo fatorial 3 x 3, representado por três meios de cultura, três regimes de luz e 5 repetições.

3.4.4- Influência dos meios de cultura sobre a produção de massa micelial de *Phaeoramularia manihotis*

Para a determinação do peso seco, o isolado de *P. manihotis* foi cultivado em Erlenmeyers de 500mL, contendo 250mL dos meios de cultura líquidos V8, BD, CC (Caldo de Cenoura) mantidos com três agitações manuais diárias. Foram adicionados aos meios três discos de micélio com 5 mm de diâmetro retirados de culturas jovens de cada isolado e incubados por sete dias (Figura 2). Ao final do período de incubação, as culturas foram filtradas em tecidos de náilon e a massa micelial coletada foi depositada em caixas de papel alumínio, sendo secas em estufa a 60°C, durante 48 horas. Ao final deste período, determinou-se o peso da massa micelial de cada isolado, o qual foi expresso em gramas.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com 3 tratamentos (V8, BD e CC) e 8 repetições. As médias dos dados obtidos foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 2- Erlenmeyres contendo meios líquidos V8, BD e CC respectivamente, com três discos de micélio de *Phaeoramularia manihotis*.



Fonte: Autor, 2014.

3.5 Avaliação “in vitro” dos produtos naturais sobre o crescimento micelial de *Phaeoramularia manihotis*

Os produtos naturais (manipueira e Ecolife[®]), o óleo essencial de hortelã, extratos vegetais (alho e melão de São caetano), o fungo *Trichoderma* sp. e o fungicida mancozeb foram adicionados ao meio de cultura BDA, fundente (45-50 °C), que foi vertido em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, sendo usadas as seguintes combinações da concentração de produto/fungo, fungicida/fungo ou biocontrole/fungo: manipueira (40%); extrato de alho (20%); extrato de melão de São caetano (20%); óleo de hortelã (0,1%); Ecolife[®] (20%); fungo *Trichoderma* sp. (10^8 conídios.mL⁻¹); fungicida mancozeb (2,0g.L⁻¹) e para a testemunha, BDA. Todos os produtos, exceto *Trichoderma* sp. foram esterilizados em luz UV por 30 minutos antes de serem adicionados ao meio autoclavado, segundo metodologia descrita por Barguil et al. (2005).

No centro de cada placa foi depositado um disco de meio BDA, de 5 mm de diâmetro, contendo micélio jovem retirado das bordas de colônias do fungo. Após a incubação por sete dias à temperatura de 28°C e fotoperíodo de 12 horas, determinou-se o diâmetro médio das colônias tomado no reverso das placas de Petri, através da medição em dois sentidos opostos, e por comparação com o crescimento das colônias nas placas testemunhas, que receberam o meio de cultura sem o produto/fungicida/biocontrole. Foi calculada a percentagem de inibição do crescimento micelial (P.I.C.) segundo Edginton et al. (1971) :

$$PIC = \frac{\text{cresc. test.} - \text{cresc. trat.}}{\text{cresc. test.}} \times 100$$

Cresc. Test. = Crescimento micelial da testemunha;

Cresc. Trat. = Crescimento micelial do tratamento.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 8 tratamentos e quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.6 Avaliação do efeito fungicida

Para verificar o efeito fungicida do princípio ativo presente em cada produto testado, os discos de inoculo, a partir dos quais não houve crescimento micelial, foram transferidos, após sete dias para placas de Petri contendo BDA, sem a presença do agente inibidor. Após 96 horas, foi avaliado quanto à presença ou não de crescimento fúngico junto ao disco.

3.7 Avaliação “in vivo” de produtos naturais no controle da mancha branca em mandioca (*Phaeoramularia manihotis*)

Manivas de mandioca cv rosinha foram plantadas em vasos (5L) contendo substrato (solo + bioplant) esterilizado por autoclave (2h) e após desenvolvimento vegetativo (\pm 45 dias após o plantio) foram pulverizadas com os tratamentos: manipueira (40%); extrato de alho (20%); extrato de melão de São caetano (20%); óleo de hortelã (0,1%); Ecolife[®] (20%); fungo *Trichoderma* sp. (10^8 conídios mL⁻¹); fungicida mancozeb (2,0g.L⁻¹) e água (testemunha). Todos os produtos naturais, exceto *Trichoderma* sp. foram esterilizados em luz UV por 30 minutos antes de serem pulverizados. Para todas as soluções, foram utilizadas como solvente água destilada esterilizada e adicionadas espalhante adesivo Tween 20 (polioxyethylene sobitan mono-oleate, da marca Vetec), 0,1mL para cada 100mL de solução, antes das pulverizações.

Dois dias após o tratamento com os produtos, as plantas foram feridas com agulha (três furos próximos e superficiais) e inoculadas com discos de micélio do patógeno (5mm) sob o local lesionado da folha.

O experimento foi avaliado 16 dias (períodos menores não formaram lesão) após a inoculação do patógeno determinando-se a presença ou não de lesões características da doença e medindo o tamanho da lesão, quando presente.

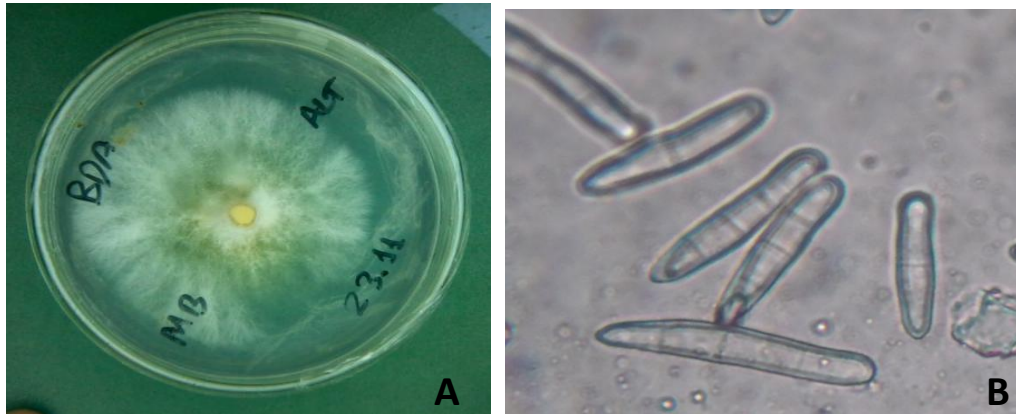
O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com oito tratamentos e quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação do isolado

O isolado formou colônias circulares de aspecto flocoso, com bordos irregulares, crescimento radial em ramificações, com coloração esbranquiçada apresentando pigmentação amarelada na parte central. Microscopicamente foram visualizados conídios hialinos, ovalados a cilíndricos, com pontas arredondadas, medindo $30\mu\text{m} \times 7\mu\text{m}$, contendo de 1 a 4 septos, retos ou semicurvados, característicos de *P. manihotis* (Figura 3).

Figura 3- Colônia (A) e Conídios (B) de *Phaeoramularia manihotis* em meio BDA, isolados de folhas de mandioca.



Fonte: Autor, 2014.

As medidas dos conídios observadas neste trabalho aproximaram-se dos valores observadas por Ellis (1976), para a espécie. Resultados semelhantes foram descritos por Morais et al. (2013).

4.2 Teste de patogenicidade e reisolamento de *Phaeoramularia manihotis*

As folhas inoculadas com o patógeno apresentaram os sintomas aos 5 dias após a inoculação. A testemunha permaneceu sadia. As manchas apresentaram coloração pardacenta com bordos bem definidos de coloração avermelhada, de formato circular (Figura 4).

Figura 4- Folhas de mandioca com sintomas da mancha branca (*Phaeoramularia manihotis*), após inoculação com o isolado.



Fonte: Autor, 2014.

4.3 Caracterização morfo-fisiológica de *Phaeoramularia manihotis*

4.3.1 Influência dos meios de cultura sobre o crescimento micelial de *Phaeoramularia manihotis*

Em relação ao crescimento micelial de *P. manihotis* nos diferentes meios de cultura, observou-se que houve diferenças significativas entre os meios estudados, com destaque para o meio V8 que proporcionou a melhor taxa de crescimento micelial. Os meios BDA, CA e FDM não diferiram entre si, mas diferiram dos meios ADA e LCA que apresentaram uma menor produção de micelio do patógeno (Tabela 1).

Tabela 1- Médias de crescimento micelial de *Phaeoramularia manihotis* em diferentes meios de cultura após sete dias de inoculação.

Meios de cultura	Crescimento micelial (cm)
V8	9,28 a
BDA	7,9 b
CA	6,74 b
FDM	6,73 b
ADA	5,46 c
LCA	4,74 c

CV% 9,45

*Médias de 5 repetições por tratamento. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Resultados semelhantes, em relação ao V8, foi obtido por Pereira et al. (2006), onde alguns isolados de *Lasiodiplodia theobromae* cresceram mais eficientemente nesse meio do que em outros meios como BDA, AVA E CA, meios esses também testados nesse trabalho com *P. manihotis*. Enquanto Lima (1996) trabalhando com *L. theobromae* também observou que os meios CA e BDA proporcionaram melhor crescimento micelial.

No trabalho de Bogo e Maffiolet (2008) oito de nove isolados de *Cryptosporiopsis perennans* apresentaram seu melhor crescimento em meio V8, com fotoperíodo de 12 horas.

A composição do meio de cultura é determinante para a qualidade do crescimento micelial (DHINGRA; SINCLAIR, 1995). Quando há altas concentrações de carboidratos o crescimento micelial é estimulado e podem não estimular a esporulação (MOORE-LANDECKER, 1972).

O rápido crescimento do fitopatógeno em meios de cultura se refere à uma adequação destes substratos às necessidades fisiológicas do fungo.

Lilly e Barnett (1951) concluíram que meios naturais e semissintéticos fornecem certas substâncias que estimulam o crescimento. Fatores como temperatura também são fundamentais para crescimento do fungo, sendo a temperatura ideal na maioria dos casos a de 25 a 28°C (RODRIGUEZ; YOUNG, 1984; STEPHAN; AL DIN, 1987).

O gênero de *Cercospora*, o qual anteriormente *P. manihotis* pertencia, possui crescimento lento e escassa esporulação em meios artificiais (DEL PELOSO et al., 1989). Como contraste a esse gênero, Menezes et al. (1997) observou um rápido crescimento de *L. theobromae* em meio BDA, onde em 48h toda superfície da placa de Petri havia sido coberta pelo micélio do patógeno.

4.3.2 Influência de meios de cultura e regimes de luz sobre a esporulação de *Phaeoramularia manihotis*

Não foi observado esporulação em nenhum dos tratamentos analisados com 25 dias, períodos menores foram testados, mas sem sucesso.

A esporulação do gênero *Cercospora* spp. em meio de cultura é difícil e muitos trabalhos com o objetivo de induzir a esporulação desses fungos *in vitro* não obtiveram êxito (NAGEL, 1934; KILPATRICK; JOHNSON, 1956; CALPOUZOS, 1954). Outros resultados obtidos foram muito oscilantes, pois as interações são múltiplas e pouco conhecidas (SILVA et al., 1988b).

Alguns trabalhos com a utilização do meio V8 obtiveram bons resultados com outras espécies do gênero, como o de Soares (2003) que obteve resultados de esporulação de *Cercospora coffeicola* de $1,7 \times 10^3$ conídios/cm² em regimes de luz alternada (12h) e luz contínua; e Cooperman e Jenkins, (1986), que encontraram junto do meio de decocto da cenoura-ágar, fotoperíodos de 12h de luz ou escuro contínuo, e temperatura de 24°C as melhores condições para produção de esporos de *C. asparagus* em cinco dias.

Em várias espécies do gênero houve produção de esporos entre quatro a sete dias em meio V8, pela técnica de semeadura de múltiplos pontos, enquanto que em meio BDA raramente eram produzidos conídios (EL-GHOLL et al., 1982). Melhores resultados foram obtidos sob irradiação de lâmpada fluorescente de luz negra (SUTO, 1985).

Em meio de CA, e fotoperíodo de 12h e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, *C. cruenta* produz esporos em 15 dias (CASTRO; COELHO 2000).

Os trabalhos envolvendo o gênero *Cercospora* não são conclusivos quanto às condições de esporulação, a maioria parece esporular melhor em meios contendo partes de

seus hospedeiros ou em V8-ágar, esses sob temperaturas entre 20 e 28°C no regime de luz alternada ou contínua (SOARES, 2003).

Alguns autores comprovam essa informação com os resultados acima e com trabalhos como de Silva et al. (1988b) que constatou a formação de esporos de *P. manihotis* em sete dias, através do meio de extrato de folha de mandioca-ágar-biotina + extrato de malte composto, com pH 5,5 e temperatura 22°C; e Matos (1976) que usou o extrato de folha de mandioca-ágar-tiamina, pH 5,5, fotoperíodo de 12h, temperatura de 24 e 28°C, para produzir esporos de *Cercosporidium henningsii* em sete dias.

Nagel (1934) fez uma observação em um estudo realizado com quatro espécies de *Cercospora* (*C. beticola*, *C. dubia*, *C. davissi* e *C. zebrina*), onde a repicagem de culturas esporulantes produziram esporos em abundância, enquanto que a transferência feita com micelios produziram somente hifas estéreis.

Através dessa observação de Nagel (1934), torna-se curiosa a hipótese levantada por Goode e Brown (1970), onde o fator que poderia determinar a esporulação poderia ser explicado pelo modelo genético da heterocariose, em que a ausência da produção de conídios em meio de cultura é causada pelo fato dos isolados serem homocarióticos para núcleos contendo genes vegetativos, e no caso de esporulações ocorrerem por poucas gerações nos fungos, é causada pela perda da viabilidade genética para esporular, decorrente do processo de repicagem.

O comportamento diferente em meios distintos também pode ser justificado pela variação na capacidade que os fungos possuem de utilização de diferentes substratos, tolerância a determinados valores e faixas de temperatura e pH, como da produção de toxinas ou outros metabolitos (MACHADO, 1980).

Diante dos resultados desse trabalho e considerando as observações feitas por diferentes pesquisadores, tornam-se necessários mais estudos com meios e condições especiais para se obter esporulação do isolado e para se elucidar o modelo genético da espécie.

4.3.3 Características culturais de *Phaeoramularia manihotis*

Houve variação nas características do isolado de *P. manihotis* em cada um dos substratos estudados, desde o aspecto do micélio que variou de flocoso, cotonoso e ralo; características dos bordos, regular à irregulares; tipo de crescimento, radial com ramificações, radial sem ramificações e uniforme; coloração, de esbranquiçada à translúcida; ausência de crescimento micelial sob o meio de cultura ou produção de conídios (Tabela 2).

Tabela 2- Caracterização cultural de *Phaeoramularia manihotis* em meios de V8, BDA e CA.

Substrato (Meio de cultura)	Características da colônia
V8	Colônia cotonosa; crescimento uniforme; superfície de contorno regular; coloração esbranquiçada; sem pigmentação; ausência de micélio sob o meio; ausência de esporulação.
BDA	Colônia flocosa; crescimento radial em ramificações; superfície de contorno irregular; coloração esbranquiçada; pigmentação amarelada na região central; ausência de micélio sob o meio; ausência de esporulação.
CA	Colônia rala; crescimento radial sem ramificações; superfície de contorno regular; coloração translúcida; sem pigmentação; ausência de micélio sob o meio; ausência de esporulação.

As diferenças das características morfológicas do isolado nos diferentes meios de cultura estão relacionadas com variáveis encontradas no cultivo *in vitro*, como composição do substrato, regime de luz, temperatura, pH e produção de toxinas ou metabolitos (MACHADO, 1980).

4.3.4- Influência de meios de cultura líquido no crescimento micelial de *Phaeoramularia manihotis*

No meio V8, *P. manihotis* apresentou a maior produção de massa micelial, no qual foi obtido, o maior peso seco. No meio BD o peso seco produzido foi muito pequeno, ainda mais se comparando com a produção em V8, mas mesmo assim, conseguiu diferenciar-se do meio CC o qual não foi capaz de produzir massa micelial (Tabela 3).

Tabela 3- Médias para influência dos meios de cultura líquidos no crescimento de *Phaeoramularia manihotis*, aos sete dias de incubação.

Meio de cultura	Peso seco (g)*
V8	0,415 a
BD	0,06 b
CC	0,0 c
CV% = 29,82	

*Médias de 8 repetições por tratamento. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey 1%.

Ávila e Pitelli (2004), trabalhando com *Cercospora piaropi*, notaram que o meio ETD (extrato de tomate + dextrose) em comparação com os meios V8 e BD, proporcionou maior produção de massa micelial. Já a massa micelial produzida no meio V8 foi intermediária, diferindo do meio BD pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Soper e Wad (1981) afirmaram que para que ocorra um bom desenvolvimento de fungos em meio de cultura é necessária à utilização de fontes de carbono e nitrogênio.

4.4 Avaliação “in vitro” de produtos naturais sobre o crescimento micelial de *Phaeoramularia manihotis*

Os efeitos de produtos alternativos sobre a inibição do crescimento micelial de *P. manihotis* podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4- Percentagem de inibição de crescimento micelial de *Phaeoramularia manihotis*.

TRATAMENTOS	PIC (%)
Ecolife® (20%)	100 a
Fungicida mancozeb (2,0g.L ⁻¹)	100 a
Óleo de hortelã (100 µL)	100 a
Manipueira (40%)	84,48 b
<i>Trichoderma</i> sp. (10 ⁸ con.mL ⁻¹)	79,58 b
Extrato de alho (20%)	62,75 c
Testemunha	0 d
Extrato de melão de São Caetano (20%)	-12 e

CV% 11,41

* Médias de 4 repetições por tratamento. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 1%.

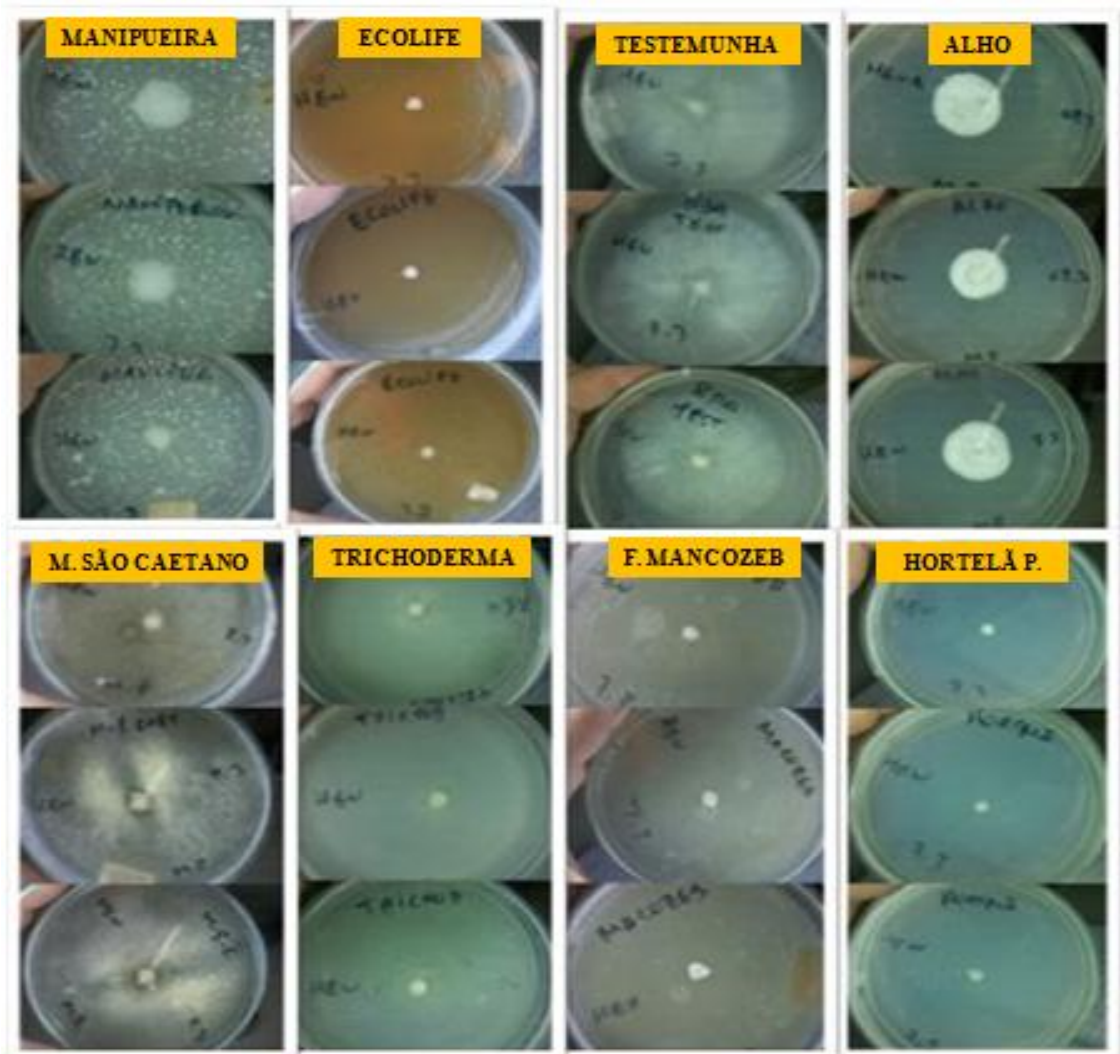
Todos os tratamentos diferiram significativamente da testemunha ($p < 0,01$), inibindo em maior ou menor grau o crescimento do fungo, exceto o extrato de melão de São Caetano que comportou-se como conducente, induzindo uma severidade de 12% a mais que a testemunha.

Os tratamentos com Ecolife®, fungicida Mancozeb e óleo de hortelã-pimenta inibiram em 100% o crescimento micelial de *P. manihotis*, não diferindo significativamente ($p < 0,01$) entre si. A manipueira e o fungo *Trichoderma* sp. não apresentaram diferenças significativas,

inibindo parcialmente o crescimento do fungo em 84,48 e 79,58% respectivamente, mas diferiram do extrato de alho, que apresentou 62,75% de inibição do crescimento micelial.

Os resultados obtidos de PIC (percentual de inibição de crescimento), sendo total ou parcial, revelam a existência de substâncias de ação antifúngica, para *P. manihotis*, nos produtos testados (Figura 5).

Figura 5- Inibição do crescimento micelial de *Phaeoramularia manihotis* “*in vitro*” na presença manipueira (40%), Ecolife® (20%), testemunha, extrato de alho (20%), extrato de melão de São Caetano (20%), *Trichoderma* sp. (10^8 conídios.mL⁻¹), fungicida mancozeb (2,0 g/L⁻¹) e óleo de hortelã (0,1%).



Fonte: Autor, 2014.

Pesquisas elaboradas com o intuito de se descobrir modos alternativos e menos agressivos ao meio ambiente, sobre o gênero *Phaeoramularia* e *Cercospora* são escassas, porém vários autores que utilizaram óleos essenciais, fungos antagonistas e extratos vegetais, obtiveram resultados similares ao deste trabalho: Soriano (2011) testando alguns óleos essenciais, extratos vegetais, e fungicida em *Phytophthora* sp. constatou inibição do crescimento micelial com manipueira, mancozeb + metalaxil, Ecolife[®] e óleo de pimenta-de-macaco (*Piper aduncum*), sendo esses nas concentrações de 20%, 2,5g/L, 1% e 1% respectivamente, capazes de inibir em 100% o crescimento micelial. O autor também observou o controle de *Trichoderma* sp. sobre *Phytophthora* sp., o qual inibiu o crescimento micelial e a produção de esporos através da produção de antibióticos e hiperparasitismo.

Barbosa (2011) verificou o efeito fungicida de alguns óleos, extrato de alho e fungicida (mancozeb) sobre *L. theobromae*, onde todos os tratamentos foram efetivos, sendo que o óleo de citronela e Ecolife[®] inibiram 100% o crescimento micelial com concentrações de 1%, e o extrato de alho e fungicida inibiram parcialmente em suas maiores concentrações 7,5% (92,41% de inibição) e 4,5g/L (91,94% de inibição) respectivamente.

Silva (2007) trabalhando com *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, encontrou uma inibição do crescimento micelial do fungo (70%) com o uso do extrato de alho na concentração de 20%. Ke-Qiang e Van Bruggen (2001) relataram a inibição de formação de colônia de *P. infestans* através da utilização do extrato de alho 1 ou 2%. Com 10% da concentração de extrato de alho, Venturoso et al. (2011) conseguiram um efeito fungistático em *Cercospora kikuchii*.

Camatti-Sartori et al. (2011) encontrou em sua pesquisa com *Fusarium* sp e *Botrytis* sp. resultados como, inibição do crescimento micelial de 45,49% e 83,59% respectivamente, com diluição acética de 50%, de hortelã-pimenta. Faria et al. (2009) utilizando extratos hidroetanólico e aquoso de melão de São Caetano controlaram em 100% estruturas de resistência de *Sclerotium rolfsii*.

Segundo Lorenzi e Matos (2002) o hortelã-pimenta possui atividades antifúngicas, antibacterianas e também bons efeitos nematicidas, reduzindo o número de ovos e melhorando o desenvolvimento de plantas atacadas por várias espécies de nematóides. (GANAI et al., 1992; HASHIM et al., 1999; PANDEY; DWIVED, 2000). Alguns compostos desse óleo essencial, como limonene, o piperitone e o menthol (OKA et al., 2000; SANGAWN et al., 1990) podem ter influenciado na inibição do crescimento de *P. manihotis*.

Neste trabalho, a manipueira à 40% controlou o crescimento micelial de *P. manihotis* em 84,48%, diferente da pesquisa de Carvalho (2012b), onde a manipueira não foi capaz de inibir o crescimento micelial em *C. eragrostides*. A autoclavagem da manipueira utilizada em sua metodologia, pode ter modificado ou eliminado substâncias como glicosídeos cianogênicos, que podem ser responsáveis pelo efeito antifúngico. No caso do alho a produção da substância chamada alicina, formada na ação de rompimento de suas membranas, as quais são responsáveis pela defesa da planta, inativam os microrganismos com seus efeitos tóxicos (HEINZMANN, 2001), o que pode ter colaborado com a inibição. Já Denis e Webster (1971) afirmam que espécies de *Trichoderma* possuem a capacidade de produzir antibióticos, os quais alguns são capazes de inibir o crescimento micelial de fungos fitopatogênicos.

Apesar de ter havido crescimento micelial no meio de cultura tratado com *Trichoderma* sp. para o controle de *P. manihotis*, o fitopatógeno foi bem controlado com relação aos efeitos do *Trichoderma* sp.

O comportamento do melão de São Caetano (*M. charantia*) nesse trabalho foi negativo, diferente de trabalhos encontrados na literatura que relatam bons resultados antifúngicos no controle de *C. gloeosporioides* em mamão, *Cercosporidium personatum* em amendoim e com *Alternaria alternata*, *Fusarium solani* e *Macrophomina phaseolina* (CELOTO et al., 2008; SAXENA et al., 2002; BHUTTA et al., 1999).

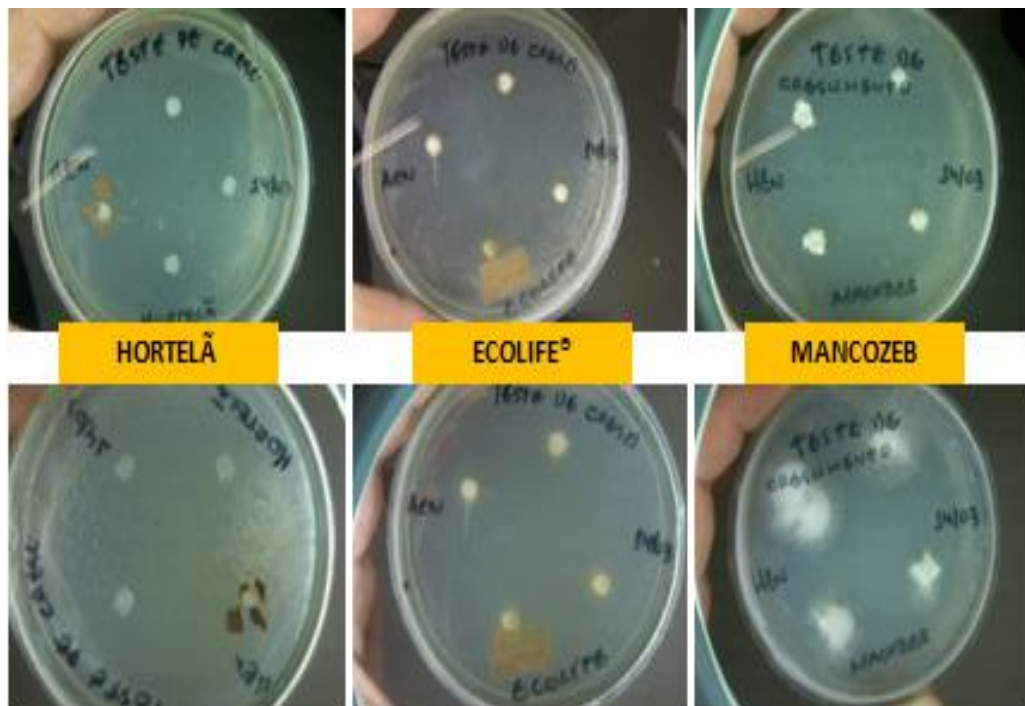
O controle de fitopatógenos através da utilização de extrato bruto ou óleos essenciais de plantas, como o Ecolife® e outros usados nessa pesquisa, tem demonstrado potencial, tanto pela sua ação fungitóxica direta, inibindo crescimento e germinação de esporos, quanto pela indução de fitoalexinas, indicando a presença de compostos elicitores (SCHWAN-ESTRADA, 2002). A ação dessas substâncias pode ser devida aos vários compostos biologicamente ativos do metabolismo primário e secundário das plantas (PLETSCH, 1998).

4.5 Avaliação do efeito fungicida

Na observação do efeito fungicida de *P. manihotis*, verificou-se que os discos de micélio, presentes anteriormente nos tratamentos Ecolife® (20%) e Hortelã-pimenta (100µL), em meios sem a presença dos tratamentos, apresentaram efeito fungicida, pois esses não apresentaram crescimento micelial em meio BDA. Já os discos do tratamento com fungicida mancozeb (2,0g/L) apresentou efeito fungistático, pois no meio BDA sem o tratamento

voltaram a se desenvolver (Figura 6). Os princípios ativos dos produtos testados podem apresentar efeito fungicida, efeito que torna o crescimento micelial e formação de estruturas reprodutivas do patógeno inviáveis, ou fungistático, onde as atividades dos fungos são apenas paralisadas, podendo ser retomadas na ausência do tratamento.

Figura 6- Avaliação do efeito fungicida “in vitro” do óleo de hortelã-pimenta, Ecolife® e fungicida Mancozeb.

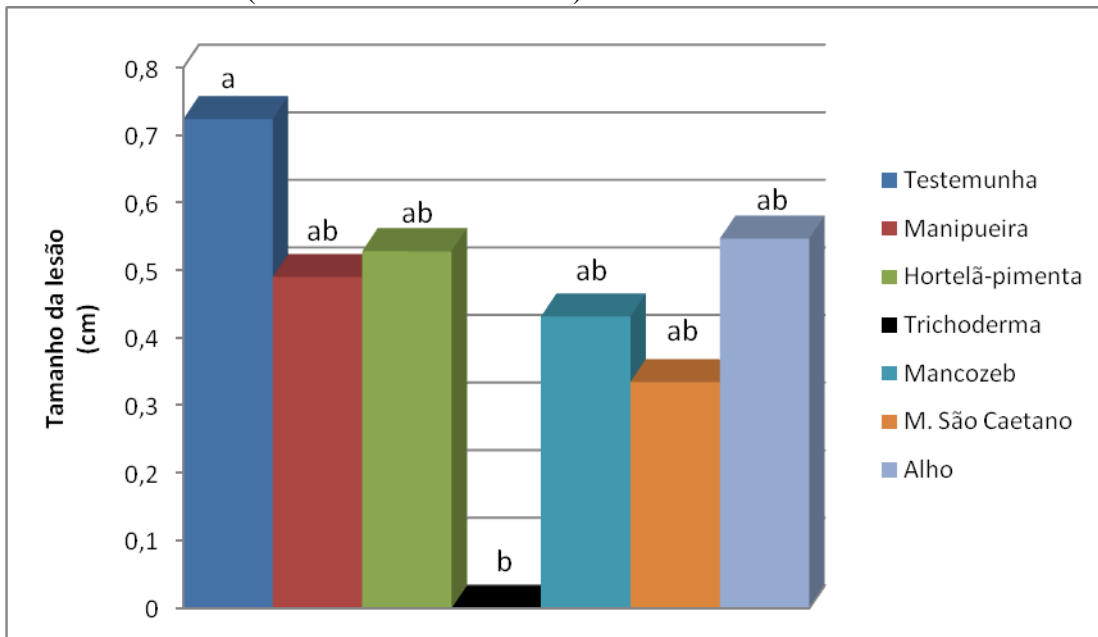


Fonte: Autor, 2014.

4.6 Avaliação de produtos naturais sobre a intensidade da mancha branca da mandioca (*Phaeoramularia manihotis*)

O tratamento com *Trichoderma* sp. foi o único a diferir da testemunha, sendo capaz de inibir a formação da lesão nas folhas de mandioca, porém não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) dos tratamentos com melão de São Caetano, mancozeb, manipueira, hortelã-pimenta e extrato de alho, os quais apresentaram lesão nas folhas. Nessa ordem citada acima, os tratamentos apresentaram a maior capacidade de impedir o crescimento da lesão. O restante dos tratamentos, apesar de não diferirem do melhor resultado (*Trichoderma* sp), também não diferiram da testemunha (Figura 7).

Figura 7 – Efeito de produtos naturais, *Trichoderma* sp. e fungicida sobre a severidade da mancha branca da mandioca (*Phaeoramularia manihotis*).

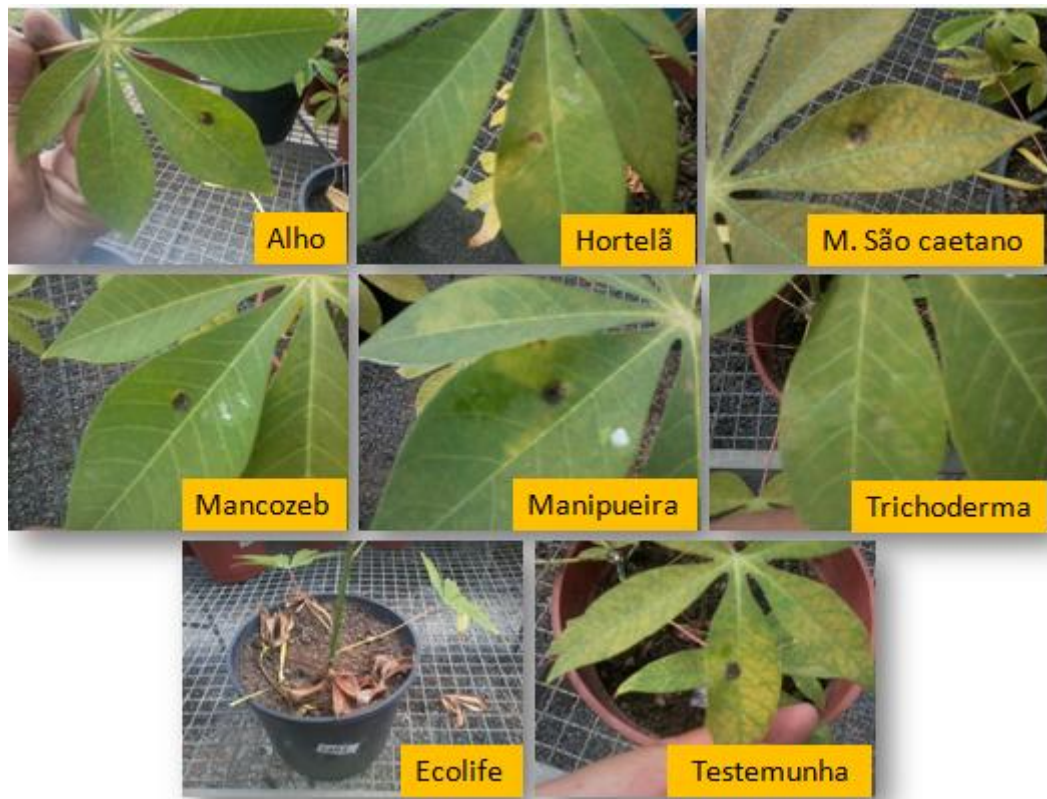


*Médias de 4 repetições por tratamento. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%, CV% 20,79.

O tratamento com Ecolife®, não está presente nas análises pelo fato de ter apresentando fitotoxidez à cultura da mandioca na dosagem testada (20%). As folhas tratadas com o produto começaram a apresentar necroses entre o 2° e 3° dia, do 4° ao 5° dia, as folhas entraram em processo de senescência e caíram (Figura 8). Esse fato não impossibilita testes com menores dosagens.

O melhor tratamento para utilização do controle *in vivo* foi o *Trichoderma* sp, pois, apesar de não diferir significativamente dos outros produtos testados, ele foi o único a inibir a formação da lesão da folha. Já os outros tratamentos, por não diferirem da testemunha (Figura 8), tornam-se inviáveis para controle da mancha branca da mandioca, nas dosagens testadas.

Figura 8- Efeito de extratos vegetais, óleo essencial, *Trichoderma* sp., Ecolife® e fungicida sobre a severidade da mancha branca da mandioca (*Phaeoramularia manihotis*).



Fonte: Autor, 2014.

Os resultados obtidos no tratamento *in vitro*, onde todos os tratamentos, exceto melão de São Caetano, apresentaram bons níveis de controle, principalmente o óleo de hortelã-pimenta, Ecolife® e o fungicida (mancozeb), que inibiram a produção de atividade do fungo, não se repetiram no ensaio *in vivo*, pelo contrário, todos os tratamentos, exceto o *Trichoderma* sp. não diferiram da testemunha. Já *Trichoderma* sp. foi eficiente nos dois experimentos, alcançando um bom percentual de inibição *in vitro* (79,58%) e inibição da formação de lesão *in vivo*.

Essa diferença de resultados nos experimentos pode ser influenciada por vários fatores distintos entre os ambientes artificiais e naturais: diferença entre substratos sintéticos e naturais (folha do hospedeiro), temperaturas, umidade e volatilização de substâncias, além da alta agressividade do método de inoculação empregado, devido à falta de esporulação do isolado de *P. manihotis*, etc. Portanto, necessário se faz aprofundar o estudo sobre esse patossistema, de forma a minimizar esse efeitos para que se possa fazer uso de produtos naturais no controle da mancha branca, tendo em vista os resultados alcançados por outros pesquisadores nessa linha de pesquisa.

Faria et al. (2009) avaliou a aplicação de extrato hidroetanólico e aquoso de melão de São Caetano para controle, tanto preventivo quanto curativo, de *Sclerotium rolfsii*. Ele conclui que o extrato hidroetanólico (50ml) aplicado de modo preventivo em volume de substrato de 300ml, tanto com seis ou três dias antes do plantio, são eficientes contra o fungo, pois apresentaram queda na severidade da doença em 74% e 55% de plantas sem sintomas da doença.

Soriano (2011) avaliou os efeitos de alguns óleos e extratos vegetais como óleo de pimenta-de-macaco, Manipueira e Ecolife sob a inibição de áreas lesionadas, provocada por *Phytophthora* no fruto de laranja pera. O óleo de pimenta-de-macaco (5%) apresentou áreas lesionadas de 8,57%, o Ecolife® (1%) áreas de 34,28% e a manipueira (20%) áreas com 42,86%. Furtado (2010) observou uma redução de 73% de áreas lesionadas em variedades de banana (maçã, prata, pacovan e cacau) atacadas por *C. gloeosporioides*, com a utilização do Ecolife®.

Silva (2007) avaliou o efeito de alguns óleos essenciais e extratos de planta, como também o Ecolife®, pulverizados em mudas de bananeira, visando o controle do mal do panamá (*Fusarium oxysporum*). Entre os tratamentos com os menores índices de doença, em mudas propagadas, estavam presentes o extrato de alho com 25% e Ecolife® com 8,33%.

No trabalho de Demant et al. (2006) foi avaliada a incidência de plantas de mamona com mofo cinzento (*A. ricini*) após tratamento com Trichodermil (produto a base de *Trichoderma* sp), onde a utilização do produto diminuiu em 60% a incidência da doença, área com plantas tratadas apresentaram 26,6% de incidência (12 de 45 plantas) e não tratadas 86,6% (39 de 45 plantas).

Morreto (2000) em testes de laboratório notou que, quanto maior o período de incubação a produção de metabolitos aumenta de forma gradual. Acredita-se que a quantidade de metabolitos produzidos nas 48 horas antecedentes a inoculação do *Trichoderma* sp, pode ter sido o fator capaz de produzir um efeito antifúngico sobre o agente causal de mancha branca, impedindo a formação de lesões na folha.

5. CONCLUSÕES

- 1- O meio V8 propiciou uma boa taxa de crescimento micelial de *Phaeoramularia manihotis*
- 2- Os meios V8, BDA e CA não foram capazes de induzir a esporulação de *P. manihotis* sob os regimes de alternância luz (12h/dia), ausência total de luz e luminosidade total (24h/dia), em temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.
- 3- A maior quantidade de massa micelial *P. manihotis* foi produzida no meio V8.
- 4- Os produtos naturais (Ecolife[®] e manipueira), o óleo de hortelã, o fungo *Trichoderma* sp., o extrato de alho e o fungicida mancozeb inibem o crescimento micelial de *P. manihotis*.
- 5- O Ecolife[®] e o óleo de hortelã-pimenta apresentam efeito fungicida, enquanto fungicida mancozeb apresenta atividade fungistática sobre o agente causal da mancha branca da mandioca.
- 6- O fungo *Trichoderma* sp. (10^8 conídios.mL⁻¹) foi capaz de inibir a formação de lesão nas folhas de mandioca cv rosinha inoculadas com disco de micélios de *P. manihotis*.
- 7- Os produtos naturais (manipueira e Ecolife[®]), o óleo essencial de hortelã, os extratos vegetais (alho e melão de São caetano) e o fungicida mancozeb, nas condições testadas, não controlam a mancha branca da mandioca.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ. E.; LLANO, G. **Enfermedades del cultivo de la yuca y métodos de control.** International Center for tropical agriculture (CIAT). Cali, Colômbia. cap. 8, p. 131-132, 2002.
- ALVES, M. C. S. et al. Recomendações técnicas para o cultivo da mandioca. **VI Circuito de tecnologias adaptadas para agricultura familiar.** Natal, 2009.
- AYESU-OFEELI, E. N.; ANTWI-BOASIAKO, C. Production of microconidia by *Cercospora henningsii* Allesch, cause of brown leaf spot of cassava (*Manihot esculenta*) and tree cassava. *Annals of Botany*, v.5, n.78, p.635-657, 1996.
- ÁVILA, Z. R.; PITELLI, R. A. Crescimento, esporulação e virulência do inóculo de *Cercospora piaropi*, agente de biocontrole do aguapé. *Fitopatologia Brasileira*, v. 29, p. 189-192, 2004.
- BARBOSA, L. F. **Controle da podridão peduncular da manga (*Lasioidiploidia treobromae* (PAT.) GRIFFON & MAUBL), utilizando extratos vegetais, óleos essenciais e hidroterapia.** Rio largo: UFAL, 2011, 57p. Dissertação (Mestrado em produção vegetal) – Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2011.
- BARGUIL, B. M. et al. Effect of extracts from citric biomass, rusted coffee leaves and coffee berry husks on *Phoma costarricensis* of coffee plants. **Fitopatologia Brasileira.** Brasília, v. 30, n.5, p. 535-537, 2005.
- BENATO, E. A. et al. **Avaliação de fungicidas e produtos alternativos no controle de podridões pós-colheita em maracujá-amarelo.** Summa Phytopathologica, Botucatu, v. 28, n.4, p. 299 - 304, 2002.
- BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas.** Jaguariúna: Embrapa-CNPDA, 388 p., 1991.
- BHUTTA, A. R.; BHATTI, M. H. R.; IFTIKHAR, A. **Effect of seed diffusates on growth on seed-borne fungi of sunflower.** Helia, v. 22, n. 31, p. 143-150, 1999.
- BOGO, A.; MAFFIOLET, M. A. Caracterização morfológica de isolados de *Cryptosporiopsis perennans* em diferentes meios de cultura. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 3, p. 248-251, 2008.
- BROWN, J. K. M. **Surveys of variation in pathogen population and their application to disease control.** In: Jones, G. ed. The epidemiology of plant diseases. Kluwer, Dordrecht. p.73-102, 1998.

CALPOUZOS, L. Controlled sporulation of *Cercospora musae* Zimm in pure culture. **Nature**, v. 173, p.1084-1085, 1954.

CAMATTI-SARTORI, V. et al. Avaliação *in vitro* de extratos vegetais para o controle de fungos patogênicos de flores. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 6, n. 2, p. 117 – 122, 2011.

CARDIN, P. **Insectos y enfermedades de la yuca en Cuba**. Bol. Est. Exp. Agr. Cuba v. 20, p. 1-28, 1911.

CARVALHO, R. A. et al. **Extratos de plantas medicinais como estratégia para o controle de doenças fúngicas do inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste**. Disponível em: 4 <www.emepa.org.br/anais/volume1/av107.pdf> . Acesso em: 15 ago. 2012a.

CARVALHO, V. D.; KATO, M. S. A. Potencial de utilização da parte aérea da mandioca. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.13, n.145, p.23- 28, 1987.

CARVALHO, V. N. et al. Reação de cultivares de mandioca à manchas foliares e ferrugem. Manaus, AM. **Tropical Plant Pathology**, v. 38 sup., 2012b.

CASTELLANI, A. **A Maintenance and Cultivation of the common pathogenic fungiof man in sterile distilled water**. Further researches. Jour. Trop. Med. Hyg. 70:181-184, 1967.

CASTRO, N. R; COELHO, S. B. Caracterização fisiológica de isolados de *Cercospora cruenta* em diferentes meios de cultura. **Summa Phytopathologica**, v. 26, p. 466-471, 2000.

CAVALCANTI, F. R. et al. Acibenzolar-S-Metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 4, p. 372-380, 2006.

CELOTO, M. I. B. et al. Atividade antifúngica de extratos de plantas a Colletotrichum gloeosporioides. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 30, n. 1, p. 1-5, 2008.

CHEN, J. et al. Trinorcucurbitane and cucurbitane triterpenoids from the roots of *Momordica charantia*. **Phytochemistry**, v.69, p.1043-1048, 2008.

CEREDA, M. P. Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. **Série culturas de tuberosas amiláceas latinoamericanas**. São Paulo. Fundação Cargill. 2001, 340 p.

CONCEIÇÃO, A. J. **A Mandioca**. São Paulo: Livraria Nobel S.A., p. 382, 1987.

COOPERMAN, C. J.; JENKINS, S. F. Conditions influencing growth and sporulation of *Cercospora asparagi* and *Cercospora* blight development in asparagus. **Phytopathology**, v. 76, p. 617-622, 1986.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Março 2012: **Câmara Setorial da Cadeia Produtiva de Mandioca e Derivados**. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Mandioca/25O/App_Conjuntura_Mandioca\(1\).pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Mandioca/25O/App_Conjuntura_Mandioca(1).pdf)> .Acessado em 20 fev. 2014.

CRUZ, M. F. A.; PRESTES, A. M.; MACIEL, J. L. N. Esporulação de *Pyricularia grisea* em diferentes meios de cultura e regimes de luz. **Ciência Rural**, v.39, p.1562-1564, 2009.

DEL PELOSO, M. C. et al. Esporulação de *Cercospora coffeicola* em diferentes meios de cultura. **Fitopatologia Brasileira**, v.14. p. 41-44, 1989.

DEMANT, C. A. R. et al. Controle de mofo cinzento com o uso de *Trichoderma*. In: **II Congresso Brasileiro de Mamona**. Salvador BA. Embrapa Algodão. CD-ROM, 2006.

DENIS, C. R.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-group os *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotics. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, p. 25-39, 1971.

DHINGRA, O. D; SINCLAIR, J. B. Basic Plant Pathology Methods. **Lewis Publishers**, Boca Raton, Florida. 1995.

EDGINGTON, L. V.; KHEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazoles compounds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 61, p. 42-44, 1971.

EL-GHOLL, N. E. et al. Growth and sporulation *in vitro* of *Cercospora apii*, *Cercospora arachidicola*, *Cercospora kikuchii*, and other species of *Cercospora*. **Canadian Journal of Botany**, v. 60, p. 862 – 868, 1982.

ELLIS, M. B. **More Dematiaceous hyphomycetes**. CMI Kew: p. 1-507. 1976

EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA. Perguntas e respostas: Mandioca. Cruz das Almas. Disponível em: <http://www.cnpmf.embrapa.br/index.php?p=perguntas_e_respostas-mandioca.php>. Aceso em: 20 fev. 2014.

FAO. **Noticias 2000**. Disponível em <[http:// www.FAO.org/Noticias/2000/000405-s.htm](http://www.FAO.org/Noticias/2000/000405-s.htm)>. Acesso em 22 jul. 2013.

FARIA, A. Y. K.; ALBUQUERQUE, M. C. F.; CASSETARI NETO, D. Qualidade fisiológica de sementes de algodoeiro submetidas a tratamentos químico e biológico. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 25, n. 1, p. 121-127, 2003.

FARIA F. A.; BUENO C. J.; PAPA M. F. S. Atividade fungitóxica de *Momordica charantia* L. no controle de *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 3, p. 383 – 389, 2009.

FERRAZ, L. C. C. B. Métodos alternativos de controle de fitonematóides. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 29, n. 172, p. 23-26, 1992.

FRAIFE FILHO G. A., BAHIA J. J. S. **Mandioca**. Ceplac-Cepec-BA. <http://www.ceplac.gov.br/radar/mandioca.htm> . Acessado em 16 de julho de 2012.

FRANCO, A. **Subsídios à utilização da manipueira como nematocida**. 1986. 53 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1986.

FRANCO, A. Dosagem de manipueira para tratamento de solo infestado por *Meloidogyne*: II. Segundo experimento. **Nematologia Brasileira**, v. 14, p. 25-32, 1990.

FRANCO, D. A.; BETTIOL, W. Controle de *Penicillium digitatum* em pós-colheita de citrus com produtos alternativos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n.4, p. 602 – 606, 2000.

FURTADO, D. C. **Controle alternativo de *Fusarium semitectum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia lunata* e *C. eragrostides* em inflorescências de *Tapeinochillus ananaceae***. Rio Largo, 2006. 89p. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Alagoas, 2006.

FURTADO, L. M. Utilização de Ecolife® e Acibenzolar-s-metil (ASM) no controle da antracnose da banana em pós-colheita. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n. 3, p. 237-239, 2010.

GALERA, J. M. S. V. **Estruturação genética do germoplasma de mandioca através de informações comparativas entre estudos biológicos e antropológicos**. Campinas: IAC, 84p., 2008. Dissertação (Mestrado em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia) – Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 2008.

GANAI, G. H.; KAUL, V. K.; CHHABRA, H. K. Nematicidal action of leaf extracts of neem, *Mentha* and *Parthenium* against *Ditylenchus myceliophagus*. **Plant Disease Research**, Ludhiana, v. 7, n. 2, p. 279–281, 1992.

GOODE, M. J.; BROWN, G. R. Detection and characterization of *Cercospora citrullina* isolates that sporulate readily in culture. **Phytopathology**, v. 60, p. 1502-1503, 1970.

HANADA, R. E.; GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R. Esporulação de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes meios de cultura. **Fitopatologia Brasileira**, n. 27, p. 170-173. 2002.

HARMAN, G. E. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature**, v. 2, p. 43-56, 2004.

HASHIM, E. F.; SEHAM, K. A. A.; KHEIR, A. A. Nematicidal activity of some labiateous plant extracts on *Meloidogyne incognita*. **Annals of Agricultural Science**, Cairo, v. 44, n. 1, p. 447-457, 1999.

HEINZMANN, B. M. **Compostos com enxofre**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Ed.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: UFRGS, p. 633-650, 2001.

HEINZMANN, B. N. Compostos com enxofre. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Organizado por Cláudia Maria Oliveira Simões *et al.* 4a ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora Universitária / UFRGS / Ed. da UFSC, 2002.

HERSHEY, C. H. Manihot esculenta diversity. In: INTERNATIONAL NETWORK FOR CASSAVA GENETIC RESOURCES, Cali, Proceedings. Rome: IBPGR, p. 111-134, 1992.

HUNTER, B. B.; ZUMPETTA, G. M. Differentiating species of *Cylindrocladium* by acrilamide gel eletroforesis. **Proceeding Annual Phytopathology Society**, St. Paul, p. 26, 1975.

HUNTER, B. B.; BARNETT, H. L. Growth and sporulation of species and isolates of *Cylindrocladium* in culture. **Mycologia**, Albuquerque, v. 70, p. 614-635, 1978.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Lavoura Temporária - 2012**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=al&tema=lavouratemporaria2012>>. Acesso em: 21 mar. 2014.

KE-QIANG, C.; VANBRUGGEN, A. H. C. Inhibitory efficacy of several plant extracts and plant products on *Phytophthora infestans*. **Journal of Agricultural University of Hebei**, v.24, p.108-116, 2001.

KERN, M. E.; BLEVINS, K. S. **Micologia médica**. 2. ed. São Paulo: Premier. p. 256, 1999.

KILPATRICK, R. A.; JOHNSON, H. W. Sporulation of *Cercospora* species on carrot leaf decoction agar. **Phytopathology**, v. 46, p. 180-181, 1956.

KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**, v.2, 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 472, 1997.

KUBOTA, N.; MIYAMUKI, M. Breaking bud dormancy in grapevines with garlic paste. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.117, n.6, p.898-901, 1992.

LEMAR, K.M. et al. Allyl alcohol and garlic (*Allium sativum*) extract produces oxidative in *Candida albicans*. **Microbiology**, Reading, v.151, p.3257-3265, 2005.

LILLY, V. G.; BARNETT, H. L. **Physiology of the fungi**. New Graw-Hill, 1951.

LIMA, J. A. S. **Caracterização patogênica, fisiológica, cultural e isoesterástica de isolados de *Botryodiplodia theobromae* Pat., agente causal da morte descendente da mangueira (*Mangifera indica* L.)**. (Dissertação de mestrado). Recife. Universidade federal Rural de Pernambuco, 1996.

LOPES, R. B. A indústria no controle biológico: produção e comercialização de microrganismos no Brasil In: Bettiol W, Morandi MAB (Eds.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Embrapa Meio Ambiente. p 15-28, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2002, 512p.

LORENZI, J. O. *Mandioca*. Campinas: CATI. (**Boletim Técnico**, 245), 2003, 116 p.

LOZANO, J.C. Outbreaks of cassava diseases and losses induced. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.14, n.1, p.7-14, 1989.

LUDWIG, J. et al. Microbiolização de sementes para o controle da mancha-parda e da escaldadura em arroz irrigado. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 34, n. 5, p. 322-328, 2009.

MACHADO, A. A. **Esporulação de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. E variabilidade do método de avaliação de esporos em estudos de seleção de germoplasma resistente**. (Dissertação de mestrado). Piracicaba. Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/USP, 1980.

MATOS, A. P. **Esporulação de *Cercospora henningsii* Allesch. em função de fatores físicos e nutricionais** (Tese de Mestrado). Viçosa/MG. UFV, 1976.

MASSOLA JR.; BEDENDO, J.P. Doenças da plantas cultivadas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres Ltda. p.501-510, 1997a.

MASSOLA JR, N. S.; BEDENDO, I. P. Doença da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 3 ed.vol. 2, p. 466-471 – São Paulo: Agronômica Ceres, 1997b.

MASSOLA, N. S.; KRUGNER, T. L. Fungos Fitopatogênicos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. Manual de fitopatologia. 4 ed. vol. 1, p. 183 – 184, São Paulo: **Agronômica Ceres**, 2011.

MARTINS, E. R. Estudos em *Ocimum selloi* Benth.: isoenzimas, morfologia e óleo essencial. In: MING, L. C. et al. (Coord.). **Plantas medicinais aromáticas e condimentares: avanços na pesquisa agronômica**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, v. 2, p. 97-125, 1998.

MATTOS, P.L.P.; GOMES, D.C. (Eds.) **O cultivo de mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2000, 122 p.

MAY-DE-MIO, L. L.; GHINI, R.; KIMATI, H. Solarização e *Trichoderma* para controle de *Phytophthora parasitica* em mudas de citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 22, n. 2, p. 395-409, 2001.

MELO, I. S. **Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos**. (Eds.) Controle biológico. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998.

MENEZES, M.; MUNIZ, M. F. S.; QUEIROZ, F. M. Podridão da haste do mamoeiro “Sunrise-solo” causada por *Botryodiplodia theobromae* no estado de Alagoas. **Summa Phytopathologica**, v. 23, p. 44-45, 1997.

MICHEREFF, S. J. **Fundamentos de fitopatologia**. Recife. Apostila, p. 8 e 134, 2001.

MIURA, L.; MONTEIRO, A.J. A. **Mandioca (*Manihot esculenta*): controle de doenças**. In: VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. *Controle de doenças de plantas*. Viçosa, UFV. p.791-820, 1997.

MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the fungi**. London. Prentice- Hall. 1972.

MORAIS, M. dos S. et al. Levantamento e avaliação da incidência das doenças da mandioca no estado da Paraíba. **Summa phytopathologica**, v. 39, n.3, 2013.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 7-14, 2009.

MORETTO, K. C. K. **Controle biológico da queda prematura dos frutos cítricos**. (Tese de Doutorado). Jaboticabal. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual de São Paulo, 2000.

NAGEL, C. M. Conidial production in species of *Cercospora* in pure culture. **Phytopathology**, v. 24, p. 1101-1110, 1934.

NASSAR, N. M. A. Mandioca: opção contra a fome - estudos e lições no Brasil e no mundo. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 231, p. 30-39, out. 2006.

NASSAR, N. M. A.; SILVA, J. R.; VIEIRA C. **Hibridação interespecífica entre mandioca e espécies silvestres de *Manihot***. Brasilia Journal of Brazilian Association for Advancement of Science, v. 38, p. 1050 – 1053, 1986.

NOZAKI, M. H.; CAMARGO, M. E.; BARRETO, M. Caracterização de *Diaporthe citri* em diferentes meios de cultura, condições de temperatura e luminosidade. **Fitopatologia Brasileira**, v.29 p. 429-432, 2004.

OKA, Y. et al. Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. **Nematology**, Leiden, v. 90, n. 7, p.710-715, 2000.

O’GARA, E. A.; D. J. HILL, D. J.; MASLINI, D. J. Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n.5, p. 2269–2273, 2000.

ORREGO FUENTE, A. L. et al. Análise comparativa de caracteres patogênicos e físicomorfológicos para identificação de espécies de *Cylindrocladium*. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 22, p. 127-133, 1996.

PANDEY, R.; DWIVEDI, B. K. Comparative study of different plant extracts for their nematicidal potential. **Current Nematology**, Allahabad, v. 11, n. 1/2, p. 39-43, 2000.

PEREIRA, A. L.; SILVA, G. S.; RIBEIRO, V. Q. Caracterização Fisiológica, Cultural e Patogênica de Diferentes Isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 572-578, 2006.

PEREIRA, A. S.; LORENZI, J. O.; ABRAMIDES, E. Competição de variedades de mandioca. Campinas: Instituto agrônomo. **Circular técnica**, v. 69, p. 7, 1977.

PLETSCH, M. Compostos naturais biologicamente ativos. A aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n.4, p.12-15, 1998.

PRIMAVESI, A. **Agroecologia**: Ecosfera, tecnosfera e agricultura. São Paulo: Nobel, p. 199, 1997.

PONTE, R. A., Use of the *manipueira* as agricultural input: defensive and fertilizer, In: CEREDA, M. P. (Ed.). Uso, manuseio e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. v. 4. São Paulo: Cargill Foundation, 2000. p. 80-95. Disponível em: <<http://www.raizes-ong.org.br>>. Acesso em: 14 out. 2013.

POWELL. P. W. The Cercospora leaf spot of cassava. **Tropical root and Tuber crops Newsletter**, v. 6, p. 10-14, 1972.

RODRIGUEZ, E. R.; YOUNG, R. J. Paecilomyces lilacinus as a biological control agent of Meloidogyne incognita. **Phytopathology**, v. 74, p. 758, 1984.

ROSA, R. C. T. et al. Efeito de indutores no controle de míldio em *Vitis labrusca*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 1, p. 68-73, 2007.

SANGAWN, N. K. et al. Nematicidal activity of some essential plant oils. **Pesticide Science**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 331– 335, 1990.

SANTOS, J. C. et al. **Avaliação econômica de sistemas de produção de farinha de mandioca na região do Vale do Juruá, Acre**. Rio Branco: Embrapa Acre, 2003. 44 p. (Embrapa Acre. Documentos, 80).

SANTOS, R. P. et al. Avaliação de cultivares de mandioca, para consumo in natura, quanto à resistência à mancha parda da folha. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.2, p.232-237, 2004.

SAXENA, A. R. et al. Investigation of antifungal activity in higher plants for in vitro control of Cercosporidium personatum, the casual organism of tikka disease of ground nut. **Neo Botanica**, v. 10, n. 1-2, p. 21-30, 2002.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. et al. **Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos**. Floresta, v.30, n.1 / 2, p.129-137, 2000.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Potencial de extratos e óleos essenciais de vegetais como indutores de resistência plantas medicinais. In: Reunião Brasileira sobre indução de resistência em plantas contra fitopatógenos, 1, 2002, São Pedro, SP. **Anais...** São Pedro: ESALQ/USP, p. 27-28, 2002.

SEBRAE. **Mandioca no agreste alagoano**. Alagoas, Março: 2008. Disponível em: <<http://agropecuariadepequenoporte.files.wordpress.com/2010/03/aplmandioca.pdf>>. Acesso em 21 fev. 2014.

SENA, E. S.; PONTE, J. J. A manipueira no controle da Meloidoginose da cenoura. **Publicação da Sociedade Brasileira de Nematologia**, Piracicaba, v. 06, p. 95 -98, 1982.

SILVA, F. F. **Impacto da aplicação de efluente de fecularia de mandioca em solo e na cultura do sorgo (*Sorghum bicolor*)**. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Maringá. p. 69, 2003.

SILVA H.; ANDRADE E. **Impacto potencial das mudanças climáticas sobre as doenças da mandioca no Brasil**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2011.

SILVA JÚNIOR, A. A.; VIZZOTTO, V. J. Plantas medicinais, aromáticas e fitoprotetoras. **Agropecuária Catarinense**, v. 9, n.1, p. 5-8, 1996.

SILVA, J. C. da. **Uso de óleos essenciais, extratos vegetais e indutores de resistência no controle alternativo do mal-do-Panamá da bananeira**. Rio Largo: UFAL, 2007, 67p. Dissertação (Mestrado em produção vegetal) – Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2007.

SILVA, K. S. et al. Atividade antagônica *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. ao fungo *Phytophthora citrophthora*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 749-754, 2008.

SILVA, M. F. et al. Influência de fatores climáticos e idade da planta na ocorrência de cercosporiose em mandioca. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.13, n.1, p.51-53, 1988a.

SILVA, M. F. et al. Cultivo e esporulação de *Cercospora caribea* e *C. henningsii*, agentes causais de manchas foliares em mandioca. **Fitopatologia Brasileira**, v. 13, p. 54 – 58, 1988b.

SILVA, M. J. da.; ROEL, A. R.; MENEZES, G. P. de. **APONTAMENTO DOS CURSOS: Cultivo da Mandioca e Derivados - Engorda de Frango Caipira**. Campo Grande – MS, p. 100, 2001.

SIMÕES, S. M. O.; SPTIZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, S. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Universidade Federal de Santa Catarina, p. 394-412, 2000.

SOARES, D. J. **Esporulação e germinação *in vitro* de conídios de *Cercospora coffeicola***. Viçosa: UFV, 2003, 31 p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2003.

SOLHEIM, W. G.; STEVENS, F. L. *Cercospora* studies. **II Some tropical *Cercosporae***. *Mycologia* v. 23, p. 365-405, 1931.

SOPER, R.S.; WAD, M.G. Production, formulation and application of fungi for insect control. In: PAPAVIDAS, G.C. (Ed.). **Biological control in crop production**. New York: Allanheld & Osmun Publ, p. 161-180, 1981.

SORIANO, W. T. **Avaliação de métodos alternativos no controle de *Phytophthora* sp em laranja pêra e limão cravo**. Rio Largo: UFAL, 2011. 68 p. Dissertação (mestrado em Agronomia: Produção e Proteção Vegetal) – Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2011.

SOUZA L.; FIALHO J. **Sistemas de Produção, 8**. Embrapa Mandioca e Fruticultura, versão eletrônica, jan. 2003.

STAUFFER, B. A.; ORREGO, F. A.; AQUINO, J. A. Selección de extractos vegetales com efecto fungicida y/c bactericida. **Revista Ciência y Tecnología: Dirección de investigaciones** – UMA, v. 1, n. 2, 2000.

STEPHAN, Z. N.; AL DIN, S. S. Influence of temperature and culture media on the growth of the fungus *Paecilomyces lilacinus*. **Revue de Nematologie**, v. 10, p. 494, 1987.

SUTO, Y. Sporulation of several cercosporae on culture media under the irradiation of a blacklight fluorescent lamp. **Journal of Japanese Forestry Society**, v. 67, p. 51-56, 1985.

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, p.45-62, 2004.

TERI, J.M.; THURSTON, H.D.; LOZANO, J.C. The *Cercospora* leaf diseases of cassava. CIAT. In: BREKELBAUM, T.; BELLOTI, A.; LOZANO, J.D. Proceedings of cassava protection workshop. **Annual Report**. p.101-116, 1978.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8 ed. Editora Artmed. Porto Alegre. 2009.

VENTUROSOS, L. R. et al. Inibição do crescimento *in vitro* de fitopatógenos sob diferentes concentrações de extratos de plantas medicinais. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.78, n.1, p.89-95, jan./mar., 2011.

VERZIGNASSI, J. R. et al. Efeito dos microrganismos eficazes no controle da mancha púrpura do alho (*Alternaria porri*). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.29, n.4, p.301 - 308, 2003.

VIÉGAS, A. P. Manchas das folhas da mandioca, produzidas por Cercosporas. **Bragantia: Boletim Técnico do instituto agrônômico do estado de São Paulo**, v. 1, n. 3. Campinas, 1941.

VINALE, F. et al. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 1-10, 2008.

VILAS-BOAS, C. H. et al. Efeito do Ecolife® no crescimento micelial de *Colletotrichum* sp. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v.30, supl., p.158-158, 2004. (Resumo).

WOSIACK, G.; CEREDA, M.P. Valorização de resíduos do processamento de mandioca. **Publicatio UEPG: Exact and soil sciences**. 2002. v. 8, p. 27-43

ZEILINGER, S; OMANN, M. *Trichoderma* Biocontrol: Signal Transduction Pathways Involved in Host Sensing and Mycoparasitism. **Gene Regulation and Systems Biology**, v. 1, p. 227-234, 2007.