

JANAINA LANA ALVES

**FUNGOS PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE
Miconia calvenscens COM ESPECIAL REFERÊNCIA A
*Coccodiella miconiae***

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fitopatologia, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2008**

JANAINA LANA ALVES

FUNGOS PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE
***Miconia calvenscens* COM ESPECIAL REFERÊNCIA A**
Coccodiella miconiae

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fitopatologia, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de Abril de 2008.

Prof. Fabrício de Ávila Rodrigues
(Co-Orientador)

Prof. Olinto Liparini Pereira
(Co-Orientador)

Prof^a. Maria Catarina M. Kasuya

Dr. Dartanhã José Soares

Prof. Robert Weingart Barreto
(Orientador)

A DEUS

Aos meus pais, Marisa e Geraldo

Aos meus irmãos, Geraldo Jr. e Gerson

Ao Edílson,

Pelo amor que nos une

Dedico !!!

*“Não passam de traidoras as nossas dúvidas,
que às vezes nos privam do que seria nosso
se não tivéssemos o receio de tentar ”*

shakespeare

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar presente em todos os momentos da minha vida.

Ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela bolsa concedida durante o curso.

Ao professor Robert Weingart Barreto, pela orientação, ensinamentos transmitidos (pessoais e profissionais), pelo respeito e paciência durante todos estes anos.

Aos professores Fabrício de Ávila Rodrigues, Olinto Liparini Pereira e Onkar Dev Dhingra, pela colaboração, críticas e excelentes sugestões.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos e amizade e também aos mestres que contribuíram para a minha educação até aqui.

Aos amigos e colegas da Clínica de Doenças de Plantas, pelo convívio, amizade, colaborações e momentos de alegria vividos, no trabalho ou nas festas. Aos funcionários Célio, Henrique, Zé Orlando e Oswaldo (Pô), pelos serviços prestados, e pela gentileza com que sempre me trataram.

Aos meus pais Marisa e Geraldo, pelo amor e carinho.

Aos meus irmãos Geraldo Jr. e Gerson, pelo carinho, apoio, amizade e companheirismo.

Ao meu esposo Edilson, pelo amor, carinho, incentivo e paciência.

A todos os meus amigos de Viçosa, da graduação, do Mestrado ou aqueles que hoje estão espalhados pelo mundo.

A todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para o êxito desta pesquisa.

MUITO OBRIGADA!!!

BIOGRAFIA

JANAINA LANA ALVES, filha de Marisa de Paula Lana da Silva e Geraldo José da Silva, nascida em 04 de dezembro de 1980, Viçosa, Minas Gerais.

Em 2001 foi aprovada pela Universidade Federal de Viçosa (UFV) iniciando o curso Agronomia. No mesmo ano, conheceu a Clínica de Doenças de Plantas onde estagiou por seis meses sob orientação do Técnico Ademir e do Prof. Onkar Dev Dhingra.

Em 2002 iniciou o estágio na Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), Viçosa sob orientação da Dr^a Cleide, onde foi bolsista do CNPq por dois anos.

Em 2004, retornou a Clínica de Doenças de Plantas, onde foi Bolsista de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq) por dois anos, sob a orientação do Prof. Robert W. Barreto.

Em maio de 2006, graduou-se em Agronomia pela UFV. Neste mesmo mês e ano, iniciou o mestrado em Fitopatologia, na mesma Universidade, sob orientação do Prof. Robert Weingart Barreto. Em abril de 2008 defendeu a tese de mestrado.

Sumário

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	7
Adições à microbiota de <i>Miconia calvenscens</i> (Melastomataceae)	11
RESUMO	13
INTRODUÇÃO	13
MATERIAL E MÉTODOS	15
RESULTADOS	16
DISCUSSÃO	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
ILUSTRAÇÕES	32
Biologia e obtenção de inóculo de <i>Coccidiella miconiae</i>, agente de controle biológico para <i>Miconia calvenscens</i>	39
RESUMO	39
INTRODUÇÃO	40
MATERIAL E MÉTODOS	44
RESULTADOS	52
DISCUSSÃO	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
CONCLUSÕES GERAIS	64

RESUMO

ALVES, Janaina Lana, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Abril de 2008.

FUNGOS PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE *Miconia calvenscens* COM ESPECIAL REFERÊNCIA A *Coccodiella miconiae*. Orientador: Robert Weingart Barreto. Co-Orientadores: Fabrício de Ávila Rodrigues e Olinto Liparini Pereira.

Os trabalhos aqui apresentados representam uma contribuição adicional no esforço visando o controle biológico de *Miconia calvenscens* (Melastomataceae), um arbusto ou pequena árvore nativa dos neotrópicos (inclusive o Brasil) e que se tornou uma das mais agressivas invasoras de ecossistemas florestais em ilhas do Pacífico. Os estudos aqui apresentaram duas frentes: 1) ampliação da descrição da micobiota patogênica associada a *M. calvenscens* e 2) investigação complementar sobre a manipulação de *Coccodiella miconiae*, um fungo reconhecido como apresentando um grande potencial para utilização como agente de controle biológico para *M. calvenscens*. A partir de 1995, foram feitos levantamentos sistemáticos de fungos fitopatogênicos associados a *Miconia calvenscens* em busca de potenciais agentes de biocontrole a serem introduzidos em ilhas do Arquipélago Havaiano. Estes levantamentos cobriram áreas selecionadas no Brasil, Costa Rica e Equador e foi encontrada uma diversidade considerável de fungos fitopatogênicos além de fitopatógenos não fúngicos tais como um fitoplasma e dois nematóides fitopatogênicos. Em publicação recente, os seguintes fungos desta micobiota foram descritos: *Coccodiella miconiae*, *Glomerella cingulata* (= *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *miconiae*), *Guignardia miconiae*, *Korunomyces prostratus* e *Pseudocercospora tamonae*. Dentre estes, *G. miconiae* e *K. prostratus* eram novos para a ciência. No presente trabalho, são adicionalmente descritos: *Hyalosphaera miconiae*, *Hyalosphaera* sp. nov., *Lembosia melastomatum*, *Microsphaeropsis clidemiae*, *Microsphaeropsis* sp. nov., *Myrothecium* sp. nov. e *Phyllachora* sp. nov. O único destes fungos a ter sido efetivamente introduzido no Havaí (e posteriormente na Polinésia Francesa) foi *C. gloeosporioides* f. sp. *miconiae*. Embora este fungo tenha se estabelecido onde foi introduzido, o seu impacto sobre as populações da planta foi limitado e considera-se hoje necessária a introdução de novos agentes,

sejam eles patógenos ou artrópodes (insetos). Dentre os fungos com possibilidade de utilização no biocontrole desta planta invasora, *C. miconiae* tem sido reconhecido como promissor, por causar uma doença severa à planta em condições naturais, mesmo que freqüentemente sob ataque severo de micoparasitas. No entanto, em trabalho anterior ficou claro que *C. miconiae* tem características que dificultam muito a sua manipulação para uso no controle biológico. Trata-se de um parasito biotrófico que se apresentou difícil de ser preservado e inoculado. Repetidas iniciativas de inocular artificialmente plantas sadias de *M. calvenscens* falharam em etapa anterior do trabalho. O conhecimento disponível acerca desse fungo é ainda muito escasso e a elucidação de aspectos da biologia de *C. miconiae* poderia ser extremamente útil para a utilização desta espécie como agente de controle biológico além de contribuir para um melhor entendimento sobre este gênero de fungos. O presente estudo envolveu a realização de testes para determinar: 1) o melhor método de obtenção de ascósporos viáveis, inclusive com o teste de diversos métodos para se tentar quebrar uma possível dormência dos ascósporos; 2) o efeito da temperatura e do fotoperíodo sobre a germinação de ascósporos; 3) a verificação da viabilidade de ascósporos quando submetidos a lavagens sucessivas, diluições seriadas, ou mantidos em óleo mineral, diferentes concentrações de manitol; 4) a verificação do melhor método de preservação de folhas infectadas e 5) a determinação do método mais adequado de inoculação. Concluiu-se que a liberação de ascósporos a partir dos estromas foi eficiente quando estromas foram mantidos em suspensão e agitados por 3 a 4 h e que o inóculo assim obtido era infectivo quando utilizado imediatamente após sua obtenção. A germinação de ascósporos foi favorecida pela incubação a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 h. A utilização destes métodos mencionados acima, confirmou que a água não compromete a viabilidade dos ascósporos. A herborização por dois dias foi o melhor método de preservação de ascósporos dentre os avaliados. Estes resultados são fundamentais para o estabelecimento de um protocolo que permita finalmente a manipulação e eventual introdução de *C. miconiae* como agente de controle biológico no Pacífico.

ABSTRACT

ALVES, Janaina Lana, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, April 2008. **FUNGI FOR THE BIOLOGICAL CONTROL OF *Miconia calvenscens* WITH PARTICULAR REFERENCE TO *Coccodiella miconiae*.** Adviser: Robert Weingart Barreto. Co-Advisers: Fabrício de Ávila Rodrigues e Olinto Liparini Pereira.

This work represents an additional contribution towards the biological control of *Miconia calvenscens* (Melastomataceae), a shrub or small tree native from the Neotropics (including from Brazil) which became one of the most ecosystem invaders in the Pacific Islands. Two areas were covered in this work: 1) a complementary description of the pathogenic mycobiota associated to *M. calvenscens*, and 2) a complementary investigation on the manipulation of *Coccodiella miconiae* – a fungus recognized as having a great potential for utilization as a classical biocontrol agent to be used against *M. calvenscens*. Since 1995, a systematic survey of fungal pathogens associated with *M. calvenscens* have been performed in search of potential classical biocontrol agents to be introduced into Hawaii. These surveys covered selected areas in Brazil, Costa Rica and Ecuador. A significant diversity of fungi was found associated with this host besides non-fungal pathogens such as a phytoplasma and two nematodes. In a recent publication the following fungi were described in association with miconia: *Coccodiella miconiae*, *Glomerella cingulata* (= *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *miconiae*), *Guignardia miconiae*, *Korunomyces prostratus* and *Pseudocercospora tamonae*. Two of these represented new taxa: *G. miconiae* and *K. prostratus*. In the present work the following species are additionally described: *Hyalosphaera miconiae*, *Hyalosphaera* sp. nov., *Lembosia melastomatum*, *Microsphaeropsis clidemiae*, *Microsphaeropsis* sp. nov., *Myrothecium* sp. nov and *Phyllachora* sp. nov. The sole fungal species that was actually introduced into Hawaii (and later in French Polynesia) was *C. gloeosporioides* f. sp. *miconiae*. Although this fungus has successfully established after its introduction, its impact on the plant populations was limited and it is now

regarded necessary the introduction of additional biocontrol agents (either pathogens of arthropods) in order to reach an adequate level of control of miconia. Among the fungi regarded as promising for that purpose is *C. miconiae*. It causes a severe disease on miconia (yellow pustule disease) in natural conditions despite being often severely challenged by a range of mycoparasites. Unfortunately an earlier work showed that *C. miconiae* is very difficult to manipulate under controlled conditions making its use in classical biological control difficult. It is a biotrophic parasite that is hard to preserve and inoculate. Repeated attempts to inoculate healthy plants of *M. calvescens* with spores collected from the fruiting structures of *C. miconiae* failed to result in infection. A lack of knowledge on the biology of *C. miconiae* was regarded as the likely cause of such failures and the elucidation of critical aspects of the fungal biology might result in overcoming such difficulties besides allowing for a better understanding about the genus *Coccidiella*. The study involved a series of tests aimed at determining: 1) the best method for obtaining viable ascospores, including a series of tests aimed at breaking a conjectured spore dormancy; 2) the effect of temperature and light regime on ascospore germination; 3) the viability of ascospores after a series of washing in water, increasing spore dilutions, maintenance in mineral oil, or exposed to increasing concentrations of manitol; 4) the best among a series of methods of preservation of infected leaves and 5) the best method of inoculation of plants. It was concluded that the most effective way of obtaining viable spores was through the suspension of stromata in water under agitation for 3-4 hours. The inoculum obtained as such was infective when used immediately after release from the stromata. Ascospore germination was favored by incubation at 25 °C, under a daily 12 hours light regime. This combination of results clearly demonstrated that an initial conjecture that exposition of ascospores to water might damage them was false. Subjecting infected miconia leaves to drying in a plant press for two days was the best method for inoculum preservation among these that were tested. These results are critical for the establishment of a protocol that will finally allow the manipulation and eventually the introduction of *C. miconiae* as a classical biocontrol agent in the Pacific.

INTRODUÇÃO GERAL

As invasões biológicas são hoje a segunda maior ameaça à biodiversidade, perdendo apenas para a destruição de habitats pela exploração direta do homem. As primeiras transferências de espécies vegetais de uma região do planeta para outra tiveram a finalidade de suprir necessidades agrícolas, florestais e outras de uso direto. A introdução de plantas agrícolas, florestais ou ornamentais vindas de outras regiões pode provocar impactos desastrosos sobre o ambiente e afetar atividades econômicas ali realizadas (Ziller, 2001).

A introdução dessas espécies está associada de modo significativo ao comércio de plantas ornamentais. O processo de invasão de um ecossistema por uma planta exótica (contaminação biológica) se dá quando qualquer espécie não natural de um ecossistema é nele introduzida e posteriormente se naturaliza, passando a se dispersar e a alterar o funcionamento do meio ambiente (Ziller, 2001).

Os maiores problemas provocados por causas naturais como cataclismos (furacões, erupções vulcânicas, etc) têm o seu impacto absorvido e minimizado com o tempo, porém, no caso dos processos de invasão, os problemas vão sendo agravados à medida que as espécies exóticas ocupam o espaço das nativas. As principais consequências da invasão são: alteração de propriedades ecológicas essenciais, ciclagem de nutrientes, baixa produtividade, comprometimento de cadeias tróficas, além da desestruturação da comunidade vegetal, das taxas de decomposição, dos processos evolutivos e relações entre plantas e polinizadores. Podem modificar o ciclo hidrológico e o regime de incêndios, levando à seleção das espécies e, em geral, ao empobrecimento do ecossistema e uma alteração permanente da paisagem natural. Há risco de se gerar híbridos com as espécies nativas, talvez com potencial invasor ainda maior (Kaiser, 2006).

Os impactos causados por invasões biológicas ainda não foram dimensionados e não estão sendo tratados adequadamente em muitos países, dentre eles, o Brasil. A situação em várias áreas invadidas e a falta de política de prevenção faz com que a contaminação biológica seja um importante agente de mudança global decorrente de ações humanas. É importante frisar que as mesmas espécies invadem diversos países e sua dominância tende a homogeneizar a flora (Ziller, 2001).

Certos ambientes parecem mais suscetíveis à invasão que outros. Ilhas oceânicas são frequentemente relatadas como sendo mais vulneráveis às invasões biológicas que ecossistemas continentais. Algumas hipóteses procuram esclarecer essas diferenças regionais, dentre elas encontram-se: menor diversidade biológica; presença de espécies invasoras livres de competidores, predadores e parasitas de sua área de origem; perturbação do ecossistema (exploração excessiva); práticas erradas de manejo (retirada de florestas, queimadas para preparo da terra, erosão e pastoreio excessivo). Todos esses fatores podem contribuir para a perda de diversidade natural e suscetibilidade do meio. Portanto, qualquer processo de invasão precisa ser avaliado de forma abrangente, levando em conta todas as variáveis que tenham algum tipo de influência ambiental (Baruch *et al.* 2000).

Os problemas causados por espécies exóticas afetam o ecossistema como um todo. Alteram características naturais de ilhas e a floresta nativa é substituída por uma população monotípica. Mudanças na composição da floresta podem levar as espécies endêmicas à extinção. Algumas hipóteses são mencionadas para explicar os processos de invasões biológicas em ambientes tropicais, e estão relacionadas a processos naturais ou então, são provocadas por ações humanas. Além disso, algumas plantas possuem características que as permitem obter sucesso em áreas onde foram introduzidas. Estas espécies exóticas são robustas (tolerância ao frio, por exemplo); possuem alta taxa de reprodução; o banco de sementes desenvolve rapidamente uma vez que a árvore pode alcançar cerca de 10 m e uma única árvore pode florescer e frutificar duas a três vezes por ano, com ampla longevidade no solo, o que frequentemente dificultam a erradicação destas plantas (Kaiser, 2006).

Diversas destas características podem ser reconhecidas para *Miconia calvenscens* (Schr. & Mart.) DC, a espécie estudada no presente trabalho. Uma árvore madura de *M. calvenscens* pode produzir 220 inflorescências com uma média de 1330 flores/inflorescência, produzindo 300 frutos e 195 sementes/fruto (Meyer, 1998). Observou-se a fenologia desta espécie em locais altamente invadidos e chegou-se à conclusão de que um indivíduo pode produzir cerca de três milhões de sementes por ano, com duas a três estações de florescimento, formando um extraordinário banco de sementes. As sementes podem permanecer viáveis cerca de quatro anos (Meyer e Malet, 1997). Esta planta ainda tem grande potencial para dispersão notavelmente pelo homem, pássaros (ex: *Zosterops lateralis*) e outros animais, pelo vento ou pela

água, o que permite explicar o sucesso da introdução e a extensão da invasão biológica desta planta em ilhas oceânicas tropicais (Meyer & Florence, 1996).

Invasões biológicas por plantas da família Melastomataceae são proeminentes em ilhas do Oceano Pacífico, envolvendo particularmente as espécies *Tibouchina herbacea* (DC.), *Clidemia hirta* (L.) D. Don e *M. calvenscens* (Meyer, 1998). Quando comparadas a um grande grupo de espécies nativas, essas espécies se sobressaem no que diz respeito à competição por água, captura de luz e nutrientes, e assim interferem no desenvolvimento das plantas nativas, o que é consistente com a sua rápida expansão (Baruch *et al.*, 2000).

Miconia calvenscens pertence ao maior gênero da família Melastomataceae, uma família que possui mais de 4.500 espécies distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais de todo o globo (Renner *et al.*, 2001). Um quarto das melastomataceas pertence ao gênero *Miconia* (Goldenberg, 2004). A área de origem de *M. calvenscens* vai do sul do México ao sul do Brasil e se expande também para o norte da Argentina (Meyer, 1994). Em áreas onde é nativa, *M. calvenscens* pode alcançar 3-4 m de altura, porém em áreas onde foi introduzida pode chegar a 15 m de altura. O ecossistema transforma-se completamente com o domínio dessa planta, devido ao intenso sombreamento provocado, que nenhuma espécie de planta nativa tolera. Entre 40 e 50 espécies, dentre as mais de 100 espécies endêmicas no Taiti podem estar próximas à extinção devido à invasão por *M. calvenscens*. Trata-se de uma árvore de folhagem muito vistosa, usada como ornamental. Em virtude disso foi introduzida em diversas partes do mundo. No Taití, *M. calvenscens* foi introduzida em 1937 e ocorre hoje em 70 % dos 1045 km² de ilha, sendo que em 25 % deste total esta espécie ocorre de forma densa, ou monotípica comprometendo severamente a sobrevivência das florestas nativas. No Havaí, foi introduzida por volta de 1960. Em 1990, *M. calvenscens* foi finalmente declarada uma espécie nociva na Polinésia Francesa (Gagne *et al.*, 1992). Desde 1992, está na lista das piores plantas invasoras nocivas no Havaí (Loope, 1997). Na Austrália, onde também foi introduzida, já se estabeleceu em ecossistemas nativos e é motivo de preocupação. A partir 1997, foram proibidos o seu cultivo e comercialização no estado de Queensland (Csurhes, 1997). Sem esforços de controle eficiente e conservação de plantas em extinção, *M. calvenscens* pode fazer o Taití e todas as ilhas altas da Polinésia Francesa tornarem-se desertos ecológicos (Meyer & Florence, 1996).

A expansão populacional de *M. calvenscens* já é motivo de preocupação das autoridades responsáveis pela manutenção das áreas de proteção, a ponto de ser considerada como uma das piores ameaças diretas à flora indígena do arquipélago e, atualmente está em processo de disseminação progressiva nas ilhas circunvizinhas de Moorea e Raiatea (Meyer, 1996). Há autores que consideram que, em praticamente todos os casos, as mudanças causadas por invasões dessa planta sejam irreversíveis (Kaiser *et al.*, 2005).

Problemas como os causados pela invasão em larga escala de *M. calvenscens* exigem a busca de alternativas de controle visando minimizar ou impedir a sua disseminação a fim de diminuir os impactos provocados no meio ambiente (Baruch *et al.*, 2000). A alternativa amplamente demonstrada como eficiente para se mitigar o impacto de tais invasões é a implementação do controle biológico clássico. Infelizmente, o controle biológico é comumente considerado pelas autoridades como um “último recurso” quando ele obviamente deveria ser a primeira estratégia a ser considerada.

No caso de *M. calvenscens*, desde 1990, o governo do Havaí gastou milhões de dólares na batalha contra expansão desta planta com uma tentativa, na maior parte dos casos infrutífera, de erradicar a planta com métodos mecânicos e químicos. A retenção de sua distribuição especialmente nas ilhas do Havaí e Maui, e sua erradicação em Oahu e Kauai foi considerada em 2000 como uma meta ainda distante (Chimera *et al.*, 2000). Medeiros *et al.* (1997) relatam que em 1994, uma tentativa de controle químico para áreas de difícil acesso no Havaí foi realizada através de pulverização aérea com herbicida, mas sem sucesso. Informações recentes (T. Johnson, com. pess. 2008) dão conta de que a situação continua a mesma para o Havaí.

O controle biológico para o caso de invasões por *M. calvenscens* aparece como o método mais promissor (Meyer & Malet, 1997) e consiste no emprego de um organismo (predador, parasita ou patógeno), cujo objetivo é reduzir ou controlar a população de espécies indesejáveis (Watson, 1991). Trata-se de um método que não polui o ambiente, e os agentes são escolhidos por sua inabilidade de sobreviver e reproduzir em outra planta que não a planta-alvo, o que torna bastante seguro o seu uso (Harley & Forno, 1992).

Duas aproximações podem ser consideradas na estratégia de controle biológico de plantas invasoras com fitopatógenos: 1) Controle Biológico Clássico

(CBC) envolvendo a utilização de inimigos naturais encontrados no centro de origem da planta alvo (Schroeder, 1983); 2) Controle Biológico Inundativo (CBI) envolvendo a utilização de inimigos naturais (usualmente patógenos) que podem estar presentes na área onde a planta é problema, são produzidos em massa e aplicados na forma de bio-herbicidas, com procedimentos equivalentes aos usados para herbicidas químicos. No CBC, após o agente de controle biológico ter se estabelecido, alcança-se um equilíbrio dinâmico com os efeitos dessa interação mantendo a população da planta invasora numa densidade populacional abaixo de um nível em que possa causar danos econômicos ou ambientais (Schroeder, 1983; Julien, 1987). Por outro lado, para o CBI, é comum, e comercialmente desejável, que novas aplicações do produto sejam realizadas de tempos em tempos.

Vários exemplos de sucesso de controle de plantas invasoras exóticas utilizando fitopatógenos existem no Havaí. Dentre estes podem ser citados: o controle por *Fusarium oxysporum* Schltdl. da cactácea invasora *Opuntia ficus-indica* (L.) P. Mill (Julien, 1989) e o controle de *Ageratina riparia* (Regel) K por *Entyloma ageratinae* R.W. Barreto & H.C. Evans (Barreto & Evans, 1988).

Nos Estados Unidos, Austrália, África do Sul, Canadá e Nova Zelândia também há muitos exemplos de sucesso no controle biológico clássico de plantas invasoras. Há diversas revisões sobre este tema, sendo que para a utilização de fungos fitopatogênicos no controle biológico de plantas invasoras uma das revisões mais recentes é a de Evans *et al.* (2001).

O entomologista Robert Burkhart, do Departamento de Agricultura do Havaí (HDOA), planejou explorações em busca de inimigos de *M. calvescens* em áreas onde a planta é nativa, tais como Brasil, Costa Rica e Trinidad. A escolha dos locais foi baseada em vários fatores como: registros de herbários, facilidade de acesso, segurança e experiências passadas. Iniciado em 1993, com levantamentos realizados na Costa Rica, encontraram-se vários insetos, como exemplos *Euselasia chrysippe* (Bates) e *E. aurantiaca* (Godman & Salvin), alguns patógenos, um dos quais identificado como *Coccidiella miconiae* (Duby) Hino & Katumoto. De acordo com as descrições de R. Burkhart, duas doenças (mancha foliar causada por *C. miconiae* e um cancro de etiologia desconhecida), são responsáveis por grandes impactos sobre populações desta planta no campo. Portanto, em seu relatório recomenda que estas duas doenças observadas em *M. calvescens* devem ser investigadas com mais detalhes (University of Hawaii, Botany Department, 2008).

No Brasil, em dois locais do estado de Minas Gerais, foram realizados levantamentos adicionais aos já registrados por R. Burkhart (1995), em busca de agentes com potencial para controle biológico de *M. calvenscens*. Mais de 50 espécies de artrópodes foram encontradas associadas a esta planta. Dentre elas, destacaram-se *Atomacera petroa* Smith, atacando a superfície superior das folhas de *M. calvenscens* (Picanço *et al.*, 2005; Smith, 2006), *Ategumia* sp., *Diclidophlebia* sp., *Heliothrips* sp. (Picanço *et al.*, 2005), além de *Allorhogas* sp. e *Apion* sp., que foram observadas alimentando-se de flores, frutos e sementes (Badenes-Perez *et al.*, 2007).

Em 1997, foi concluída a avaliação e autorizada a introdução do fungo *Colletotrichum gloeosporoides* (Penz.) Penz. & Sacc. f. sp. *miconiae* Killgore, Sugiyama & Barreto, no Havaí (Killgore *et al.*, 1997). Este foi o primeiro agente de biocontrole introduzido no Havaí para o controle biológico de *M. calvenscens*. Tal isolado fúngico foi obtido no Brasil durante levantamentos efetuados no âmbito de um programa de cooperação entre a Universidade Federal de Viçosa e a University of Hawaii, iniciado em 1995. No Taiti, este fungo também foi introduzido com sucesso (Meyer *et al.*, 2007).

Além de *C. gloeosporoides* f. sp. *miconiae*, outros potenciais agentes foram obtidos, tais como o nematóide *Ditylenchus drepanocercus* (Goodey); uma outra espécie do gênero *Ditylenchus*, que está sendo descrita como nova para a ciência e sendo avaliada como muito promissora para a utilização no controle biológico de *M. calvenscens* Santin (2008) um fitoplasma de identidade desconhecida, e diversas espécies fúngicas Seixas (2002). Uma descrição parcial desta micobiota já foi publicada por Seixas *et al.* (2007) e as demais espécies fúngicas encontradas foram examinadas e sua descrição é apresentada na primeira parte desta dissertação. A segunda parte desta dissertação inclui um estudo voltado ao esclarecimento de aspectos da biologia do fungo *C. miconiae*, reconhecido como um dos fungos com maior potencial para utilização no controle biológico de *M. calvenscens*, mas, ao mesmo tempo, parasito biotrófico que mostrou-se de difícil manipulação desde os estádios iniciais dos trabalhos visando a sua avaliação. A intenção nesta segunda parte foi a de buscar o estabelecimento de um protocolo para a obtenção de ascósporos viáveis do fungo a serem utilizados de forma consistente como inóculo para reprodução da doença e o transporte deste inóculo desde o centro de origem da planta até as regiões onde *M. calvenscens* tornou-se uma invasora importante. A

maneira mais fácil seria levar plantas infectadas pelo fungo, mas vale lembrar que, outros microorganismos também estão associados a estas plantas e podem não ser específicos, ou seja, são capazes de sobreviver e reproduzir em outras plantas que não a planta-alvo, o que acarreta riscos para a região, ao invés de controlar *M. calvenscens* estaria introduzindo patógenos de espécies nativas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BADENES-PEREZ, F. R. & JOHNSON, T. Ecology, host specificity and impact of *Atomacera petroa* Smith (Hymenoptera: Argidae) on *Miconia calvenscens* DC. (Melastomataceae). *Biological Control* 43: 95–101. 2007.

BARRETO, R.W. & EVANS, H. Taxonomy of a fungus introduced into Hawaii for biological control of *Ageratina riparia* (Eupatorieae; Compositae), with observations on related weed pathogens *Transactions of the British Mycological Society*. 91(1): 81-97. 1988.

BARUCH, Z., PATTISON, R.R. & GOLDSTEIN, G. Responses to Light and Water Availability of Four Invasive Melastomataceae in the Hawaiian Islands. *International Journal of Plant Sciences*. 161: 107–118. 2000.

CHIMERA, C.G., MEDEIROS, A.C, LOOPE, L.L & HOBODY, R.H. Status of management and control efforts for the invasive alien tree *Miconia calvenscens* DC (Melastomataceae) in Hana, East Maui. 2000.

CSURHES, S. M. *Miconia calvenscens* DC (Melastomataceae), a potentiality invasive plant in Australia's tropical and sub-tropical rainforests. *Proceedings of the First Regional Conference on Miconia Control*. Papeete, Tahiti. 1997.

EVANS, H.C., GREAVES, M.P. & WATSON, A.K. Fungal biocontrol agents of weeds. In T.M. Butt, C. Jackson, N. Magan (eds) *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*: Wallingford, CABI Publishing. 169-192. 2001.

GAGNE, B.H., LOOPE, L.L., MEDEIROS, A.C. & ANDERSON, S.J. *Miconia calvenscens*: a threat to native forests in the Hawaiian Islands (Abstract). Pacific Science 46: 390-391. 1992.

GOLDENBERG, R. O gênero *Miconia* (Melastomataceae) no Estado do Paraná, Brasil. Acta Botanica Brasilica. 18(4): 927-947. 2004.

HARLEY, K.L.S. & FORNO, I.W. Biological control of weeds, a handbook for practitioners and students. Melbourne: Inkata Press. 1992.

JULIEN, M.H. Biological control of weeds: a world catalogue of agents and their target weeds. Ascot: CAB International Institute of Biological Control. 1987.

JULIEN, M.H. Biological control of weeds worldwide: trends, rates of success and the future. Biocontrol News and Information 10: 299-306. 1989.

KAISER, B.A. Economic impacts of non-indigenous species: *Miconia* and the Hawaiian economy. Euphytica 148: 135–150. 2006.

KAISER, B.A, BURNETT, K. & ROUMASSET, J. Control of Invasive Species: Lessons from *Miconia* in Hawaii. 2005.

KILLGORE, E.M., SUGIYAMA, L.S. & BARRETO, R.W. Prospective Biological Control of *Miconia Calvenscens* In Hawai'i With A Non-Indigenous Fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. f.sp. *Miconiae*. Proceedings of the First Regional Conference on *Miconia* Control. 1997.

LOOPE, L.L. *Miconia calvenscens* D.C. HNIS Report for *Miconia calvenscens*. A product of the Hawaiian Ecosystems at Risk Project, 8p. 1997.

MEDEIROS, A.C., LOOPE, L.L. & HOBODY, R.W. Interagency Efforts To Combat *Miconia calvenscens* On The Island Of Maui, Hawaii. Efforts Inter-Services Pour Combattre *Miconia calvenscens* Sur L'île De Maui, Hawaii. 1997.

MEYER, J.Y. Mecanismes d'invasion de *Miconia calvenscens* en Polynesie Francaise. Ph.D. thesis, l'Universite de Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, France. 1994.

MEYER, J.Y. Status of *Miconia calvenscens* (Melastomataceae), a dominant invasive tree in the Society Islands (French Polynesia). *Pacific Science* 50(1): 66-76. 1996.

MEYER, J.Y. Observations on the Reproductive Biology of *Miconia calvenscens* DC (Melastomataceae), an Alien Invasive Tree on the Island of Tahiti (South Pacific Ocean). 1998.

MEYER, J.Y. & FLORENCE, J. Tahiti's native flora endangered by the invasion of *Miconia calvenscens* (Melastomataceae). Unpublished ms. (appended to J.-Y. Meyer's Ph.D. thesis). 1996.

MEYER J.Y. & MALET, J.P. Study and management of the alien invasive tree *Miconia calvenscens* DC. (Melastomataceae) in the islands of Raiatea and Tahaa Society Islands, French Polynesia. 1997.

MEYER, J. Y.; TAPUTUARAI, R. & KILLGORE, E. Dissemination and impacts of the fungal pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *miconiae* (Deuteromycetinae) on the invasive alien tree *Miconia calvenscens* (Melastomataceae) in the rainforests of Tahiti (French Polynesia, South Pacific). XII International symposium on biological control of weeds. La Grande Motte, France. 2007.

PICANÇO, M.C, BARRETO, R.W, FIDELIS, E.G, SEMEÃO, A.A, ROSADO, J.F, MORENO, S.C, BARROS, E.C, SILVA, A.G & JOHNSON, T. Biological control of *Miconia calvenscens* by phytophagous arthropods. Technical Report 134. Pacific Cooperative Studies Unit, University of Hawaii at Manoa, Honolulu, HI, 31p.2005.

RENNER, S.S, CLAUSING, G. & MEYER, K. Historical biogeography of Melastomataceae: the roles of Tertiary migration and long-distance dispersal. *American Journal of Botany*. 88: 1290-1300. 2001

SANTIN, A. M. Controle biológico da planta invasora *Miconia calvenscens* por uma nova espécie de *Ditylenchus*. Tese de mestrado em fitopatologia. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa. 2008 (no prelo).

SCHROEDER, D. Biological control of weeds. In : FLETCHER, W.W. (ed.). Recent advances in weed research, CAB Publication. p.42-78. 1983.

SEIXAS, C.D.S., BARRETO, R.W. & KILLGORE, E. Fungal pathogens of *Miconia calvenscens* (Melastomataceae) from Brazil, with reference to classical biological control. *Mycologia*, 99(1). 2007.

SMITH, D.R. Los Sinfitos. In: Hanson, P.E., Gauld, I.D. (Eds.), *Hymenoptera de la Region Neotropical*. *Memoirs of the American Entomological Institute* 77: 166–201. 2006.

University of Hawaii, Botany Department. The Search for Biological Control of *Miconia Calvenscens*.

http://www.botany.hawaii.edu/faculty/cw_smith/mc_control.htm (Julho 07, 2008)

ZILLER, S.R. A Estepe Gramíneo-Lenhosa no segundo planalto do Paraná: diagnóstico ambiental com enfoque à contaminação biológica. Tese de doutorado. Curitiba: Universidade Federal do Paraná. 268 p. 2001.

WATSON, A.K. The classical approach with plant pathogens: In: D.O. TeBeest (ed.) *Microbial Control of Weeds*. New York: Chapman and Hall. p. 3-23. 1991.

Adições à micobiota de *Miconia calvenscens* (Melastomataceae)

Segundo normas da revista Mycologia

Adições à micobiota de *Miconia calvescens* (Melastomataceae)

Janaina Lana Alves

Robert Weingart Barreto*

Dartanhã José Soares

Olinto Liparini Pereira

*Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais 36571-000,
Brasil*

Resumo: O trabalho aqui documentado representa uma contribuição adicional no esforço apontando o controle biológico de *Miconia calvenscens*, espécie considerada como uma das piores invasoras de ecossistemas florestais. Até o presente momento, apenas o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *miconiae* foi efetivamente introduzido no Havaí e na Polinésia Francesa. Apesar de ter se estabelecido nestes locais onde foi introduzido, o impacto causado por ele é considerado limitado, por este motivo considera-se necessário a introdução de novos agentes para o controle de *M. calvenscens*. Realizaram-se levantamentos exploratórios no Brasil, Costa Rica e Equador, em busca de fitopatógenos para o biocontrole desta espécie vegetal. Dentre os fungos encontrados, *Hyalosphaera* sp. nov., *Microsphaeropsis* sp. nov., *Myrothecium* sp. nov e *Phyllachora* sp. nov. foram descritas como novas taxa e *Hyalosphaera miconiae*, *Lembosia melastomatum* e *Microsphaeropsis clidemiae*, encontradas pela primeira vez em associação com esta planta. Tudo isto confirma a importância do estudo intensivo da micobiota de uma espécie botânica, o que contribui muito para a ampliação do conhecimento micológico.

Palavras-chave: Controle biológico, Havaí, *Hyalosphaera*, *Microsphaeropsis*, *Myrothecium*, *Phyllachora*, Sistemática-Taxonomia

INTRODUÇÃO

Espécies exóticas invasoras de ecossistemas naturais são atualmente consideradas a segunda maior ameaça à biodiversidade mundial. Estas espécies, que não fazem parte da composição original da biota de um dado ecossistema, após serem introduzidas, sem seus inimigos naturais, passam a se multiplicar e dispersar excessivamente provocando mudanças no funcionamento destes ecossistemas, e

causando desequilíbrios que não são revertidos naturalmente (Ziller, 2000). A reversão desta situação exige a intervenção humana, geralmente na forma de introdução, no novo habitat dos inimigos naturais da espécie exótica, obtidos em seu centro de origem. A este procedimento convencionou-se chamar de controle biológico clássico. Invasões biológicas por plantas da família Melastomataceae são proeminentes em ilhas do pacífico, tais como Havaí e Taití (Meyer e Florenze, 1996). Dentre as melastomatóceas invasoras mais importantes estão as espécies *Tibouchina herbacea* (D.C.) Cogn., *Clidemia hirta* (L.) D. Don e *Miconia calvenscens* D.C. (DeWalt et al., 2003). *Miconia calvenscens*, a espécie estudada no presente trabalho, é um arbusto ou pequena árvore nativa em área que se estende desde o sul do México ao sul do Brasil e norte da Argentina (Meyer, 1998). Esta planta tornou-se invasora agressiva após sua introdução como ornamental no Taití em 1937, no Havaí em 1960 e em outras ilhas do pacífico nos anos 90 (Meyer, 1996).

Para investigar a possível existência de fungos fitopatogênicos com potencial para utilização como agentes de biocontrole, associados a *M. calvenscens* no Brasil, e outras regiões dos Neotrópicos onde é nativa, deu-se início em 1995, a levantamentos exploratórios da micobiota associada a esta planta. Estes levantamentos cobriram áreas selecionadas no Brasil, Costa Rica e Equador. A descoberta de fungos capazes de causar doenças severas em *M. calvenscens* poderia levar à sua utilização no controle biológico clássico desta planta. Em 2007 foi publicada uma descrição de parte da micobiota obtida, incluindo os seguintes fungos: *Coccidiella miconiae* (Duby) Hino & Katumoto., *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & Schrenk (= *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. f. sp. *miconiae* Killgore, Sugiyama & Barreto.), *Guignardia miconiae* Seixas & Barreto,

Korunomyces prostratus Seixas & Barreto e *Pseudocercospora tamoneae* (Chupp) Braun & Castañeda (Seixas et al., 2007).

No presente trabalho deu-se continuidade aos estudos de Seixas et al. (2007) e são descritos e discutidos mais sete outros taxa fúngicos coletados em associação com *M. calvescens* nos neotrópicos, dentre estes alguns dos que haviam sido listados naquele trabalho e superficialmente identificados como *Melanconium* sp., *Myrothecium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Phyllachora* sp. e *Pythium* sp.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras estudadas no presente trabalho foram obtidas durante viagens de levantamento feitas no Brasil (Agosto/2004), Costa Rica (Dezembro/1998; Maio/2004; Junho/2006) e Equador (Maio/2000). No Equador, as coletas foram em parte orientadas por informações fornecidas por Jaime Jaramilo sobre registros de ocorrência de *M. calvescens* naquele país vinculados a exicatas depositadas no Herbário da Pontifícia Universidad Católica del Ecuador (QCA) e, para a Costa Rica, utilizaram-se, as informações sobre localidades de ocorrência de *M. calvescens* disponíveis em relatório de Robert Burckhart, entomologista do Departamento de Agricultura do Havai (HDOA) (University of Hawaii, Botany Department, 2008).

As amostras coletadas nos levantamentos foram desidratadas em prensa botânica e depositadas no herbário da Universidade Federal de Viçosa (Herbário VIC).

Fungos passíveis de serem cultivados foram isolados, quando possível, por transferência de esporos ou outras estruturas fúngicas para placas de Petri contendo o meio CVA (Pereira et al., 2003). Culturas puras foram preservadas em sílica gel conforme descrito por Dhingra & Sinclair (1995). Para estudos posteriores, estes

isolados foram recuperados pela transferência de fragmentos de papel filtro, mantidos em sílica-gel, impregnados com as estruturas fúngica para placas contendo CVA. Observações da morfologia dos fungos foram feitas a partir de lâminas contendo as estruturas representativas dos fungos montadas em lactofenol ou lactofucsina. Para observação das estruturas fúngicas e preparo das lâminas foram realizados cortes a mão livre ou, quando necessário, foram feitos cortes em criomicrotomo (Leitz, Kriomat), com espessuras de 20 e 30 μm . Observações da morfologia e ilustrações foram feitas sob microscópio de luz Olympus BX 51 equipado com DIC, câmara clara e uma câmera fotográfica Olympus E330.

Alguns materiais foram examinados em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Carl Zeiss, LEO modelo VP 1430), após preparação das amostras seguiu-se o seguinte protocolo: 1) pré-fixação em aldeído 5 % + tampão fosfato 0,1 M (1:1) durante 1 h em temperatura ambiente; 2) lavagem em tampão fosfato 0,05 M por 6 vezes, sendo 10 min cada; 3) pós-fixação em OsO_4 1 % preparado em tampão fosfato 0,1 M (1:1), mantendo-se na geladeira a 4–8 °C, durante 4 h; 4) repetição do passo 2; 5) Desidratação em gradiente crescente de etanol: 30 %, 50 %, 70 %, 80 % e 95 % por 10 min cada, em temperatura ambiente; 6) Secagem no ponto crítico (CPD), Bal – Tec modelo 030; 7) Metalização (Balzers modelo FDU 010).

RESULTADOS

Sete espécies de fungos foram coletadas em associação a *M. calvescens*, adicionalmente aos já descritos e discutidos por Seixas et al. (2007) e são descritos abaixo.

Hyalosphaera miconiae F. Stev., Trans. Ill. St. Acad. Sci. 10: 172. 1917. FIG. 1

Doença: Não se observa a presença de lesões visíveis.

Morfologia: Micélio interno indistinto. Micélio externo branco, septado e ramificado. Pseudotécios hipófilos, superficiais, solitários ou formando pequenos grupos, globosos a subglobosos, $92,5\text{--}200 \times 80\text{--}125 \mu\text{m}$, parede composta de textura *angularis*, 1–2 camadas de células, $2,5\text{--}5,0 \mu\text{m}$ de espessura, hialinas, não ornamentadas. Ostíolos ausentes, deiscência por ruptura na maturidade do ápice dos pseudotécios e exposição de ascas e ascósporos. Filamentos interteciais ausentes. Ascas bitunicadas, subcilíndricas, $50\text{--}62 \times 12\text{--}15 \mu\text{m}$, com oito ascósporos. Ascósporos subcilíndricos, com as extremidades arredondadas, organizados em feixes, $47,5\text{--}52,5 \times 4\text{--}5 \mu\text{m}$, 3–4 septos, gutulados, castanhos, verruculosos.

Espécime examinado. BRASIL. SÃO PAULO: Km 71, rodovia entre Caraguatatuba e Ubatuba. Em *Miconia calvescens*, 13 Agosto 2004, O. L. Pereira (VIC 28786).

Hyalosphaera **sp. nov.** J.L.Alves, R.W.Barreto & O.L.Pereira, FIG. 2

Doença: Lesões em folhas vivas, amarelecimento sem bordos definidos, por vezes ocupando grandes porções das folhas infectadas, acompanhadas abaxialmente de colonização branco acinzentada tênue, por vezes imperceptível a olho nu.

Morfologia: Micélio interno indistinto. Micélio externo hialino, ramificado, septado. Pseudotécios hipófilos, superficiais, isolados e dispersos sobre a colônia ou formando pequenos grupos, subglobosos a globosos, $120\text{--}150 \times 87,5\text{--}137,5 \mu\text{m}$, parede $3,8\text{--}7,5 \mu\text{m}$ de espessura, 2–3 camadas de células hialinos e transparentes, permitindo a visualização dos ascósporos escuros em seu interior, com ornamentos miceliais, abundantes e longos nos dois terços inferiores dos pseudotécios e curtos e escassos no terço superior, ocasionalmente ramificados, $1,0\text{--}2,5 \mu\text{m}$, asseptados e hialinos. Ostíolo central, amendoado. Filamentos interteciais ausentes. Ascas

bitunicadas, clavadas, $46\text{--}55 \times 5\text{--}10 \mu\text{m}$, com oito ascósporos, hialinas. Ascósporos subcilíndricos, organizados em feixes, $37,5\text{--}47,5 \times 1,5\text{--}2,5 \mu\text{m}$, com 4 a 6 septos, castanhos, gutulados, lisos.

HOLOTIPO. COSTA RICA. Alajuela, Cari Blanco, El Angel, Em *Miconia calvescens*, 21 Junho 2006, R. W. Barreto (VIC 30442).

Lembosia melastomatum Mont. Beiträge Zur Kryptogamenflora der Schweiz. 1962.

FIG. 3

Doença: Colônias anfigenas em folhas vivas. As lesões iniciam-se com pontuações negras, formando manchas fuligionosas de formato irregular, 0,2–1,0 mm, por vezes recobrimdo grandes porções do limbo foliar, mas sem provocar danos visíveis.

Morfologia: Micélio interno indistinto. Micélio externo superficial, marrom escuro, septado, ramificado. Apressórios lobados, $9\text{--}11 \times 5\text{--}9 \mu\text{m}$, marrons. Ascostromas tirioteciais, superficiais, lineares ou em formato de Y ou V, alongados, $200\text{--}350 \times 80\text{--}120 \mu\text{m}$, parede composta de textura *angularis*, $12,5\text{--}19 \mu\text{m}$, marrom escura. Deiscência por fenda longitudinal, ao longo de todo o comprimento do ascoma. Filamentos interteciais composto de pseudoparáfises cilíndricas, $1,0\text{--}2,5 \mu\text{m}$ de diâmetro, septadas, ramificadas, hialinas. Ascas bitunicadas, subglobosas, $55\text{--}65 \times 25\text{--}30 \mu\text{m}$, ápice mais largo, com 8 ascósporos. Ascósporos aproximadamente ovóides, $20\text{--}27,5 \times 10\text{--}12,5 \mu\text{m}$, medianamente ou sub-medianamente 1-septado, constrictos no septo, formando uma nítida cintura escurecida, marrons, parede espessa, gutulados, lisos.

Espécime examinado. COSTA RICA. Alajuela, El Angel, Cari Blanco. Em *Miconia calvescens*, 18 Maio 2004, R. W. Barreto (VIC 30589).

Microsphaeropsis clidemiae B. Sutton *Trans. Br. Mycol. Soc.* 74(3): 645. 1980b.

FIG. 4

Doença: Lesões em folhas vivas, freqüentemente na região apical. Na face adaxial, inicialmente delimitadas por um halo clorótico, posteriormente o centro torna-se branco a palha, com pontuações negras, bordos marrom escuros, levemente elevados atingindo até 1 mm de diam, circulares a subcirculares, ocasionalmente irregulares. Na superfície abaxial, o centro das lesões torna-se marrom pálido, com bordos marrons escuros a quase negros, bem definidos.

Morfologia: Micélio interno ramificado, 2,0–3,0 µm, septado, marrom claro. Micélio externo ausente. Conidiomas picnidiais, epífilos, erumpentes, isolados, esparsos (1–3 por lesão), globosos a subglobosos, 120–200 × 120–175 µm, paredes compostas de *textura angularis*, 1–3 camadas de células, marrons, lisas. Ostíolo central, circular, simples, 9–15 µm de diam. Conidióforo restrito às células conidiogênicas, discretas, enteroblásticas, fialídicas, ampuliformes ou cilíndricas, 5,5–7,0 × 4,5–7,0 µm, hialinas, lisas. Conídios mucilaginosos formando cirros escuros sobre os ostíolos, globosos a oblongos, 13,0–17,5 × 7,5–12,5 µm, asseptados, ápice e base arredondados, hilo truncado, escurecido e ligeiramente espessado extenamente com 1,5 µm diam, parede espessa, ocasionalmente gutulados, marrons, lisos.

Espécime examinado. EQUADOR. Napo: Archidona. Em *Miconia* sp., 14 Maio 2004, R.W. Barreto (VIC 30587).

Microsphaeropsis **sp. nov.** J.L.Alves, R.W.Barreto & O.L.Pereira, FIG. 5

Doença: Lesões em folhas vivas, geralmente sobre nervuras, com formato variável, 0,5–1,5 mm, por algumas vezes observadas amplamente espalhadas sobre o limbo foliar. Adaxialmente, amarelecimento do tecido e pontuações negras, espalhadas igualmente por toda a lesão, a partir do ponto inicial. Abaxialmente, as lesões iniciam-se como pontuações cloróticas, tornando-se marrom pálido centralmente, com bordos marrons bem definidos, em lesões mais velhas, os bordos se tornam marrom escuro a preto.

Morfologia: Micélio interno indistinto. Micélio externo ausente. Picnídios em sua maioria formados na face adaxial, imersos a subepidermais, isolados, subglobosos a ligeiramente achatados $76\text{--}200 \times 50\text{--}160 \mu\text{m}$, parede composta de textura *angularis*, com 2–3 células de espessura, $7,5\text{--}12,5 \mu\text{m}$, marrom a marrom escura, superfície um pouco áspera. Deiscência ostiolada, central, simples, circular, $6\text{--}12 \mu\text{m}$ diam. Conidióforos reduzidos às células conidiogênicas. Células conidiogênicas enteroblásticas fialídicas, discretas, cilíndricas, $3,0\text{--}5,0 \times 1,0\text{--}2,0 \mu\text{m}$, hialinas. Loci conidiogênicos indistintos. Conídios isolados, fusiformes, retos ou ligeiramente curvados, comumente com forma similar à de uma banana, $16\text{--}21 \times 5\text{--}6 \mu\text{m}$, ápice terminado em projeção rombuda, base truncada, hilo $1\text{--}2 \mu\text{m}$ ligeiramente escurecido, asseptados, gutulados, olivaceos a marrons, parede fina ou ligeiramente espessada, lisos.

HOLOTIPO: COSTA RICA. TURRIALBA: Beira da estrada próximo à entrada do Parque Arenal. Em *Miconia calvenscens*, 30 Dez 1998, R. W. Barreto (VIC 22203).

Myrothecium **sp. nov.** J.L.Alves, R.W.Barreto & O.L.Pereira, FIG. 6

Doença: Colônias associadas a necroses iniciadas nas nervuras centrais e secundárias das folhas acompanhadas de encharcamento do tecido no limbo subjacente e comumente levando ao enfraquecimento e quebra das folhas nas porções afetadas.

Morfologia: Micélio interno ramificado, septado e marrom claro. Micélio externo ausente. Sinêmios eretos, com haste cilíndrica, de até cerca de 460 µm de comprimento, compacta, formada por textura *intrincata*, ápice pulvinado, composto de células conidiogênicas terminais, setas e massa mucilaginosa de conídios, marrom. Setas numerosas, reconhecíveis a partir aproximadamente do terço superior do sinêmio, cilíndricas, base 1,5–2,0 µm de diâm., afinando-se gradativamente até uma ponta aguda, geralmente recurvada para o centro do sinêmio, sem ramificações, lisas, parede espessa, marrom escura. Conidióforos cilíndricos, 1,0–2,0 µm de diâm., septados, ramificados, marrom claros, lisos. Células conidiogênicas fialídicas terminais, 5–10,5 × 1,5–2,5 µm, cilíndricas. Conídios agrupados em mucilagem na região apical, fusiformes a estreitamente sub-bicônicos, 12,5–17,5 × 4–5 µm, 1-septo, egutulados, oliváceos a marrons, lisos.

HOLOTIPO. COSTA RICA. TURRIALBA. Em *Miconia calvescens*, 18 Maio 2004, R. W. Barreto (VIC 30588).

Phyllachora **sp. nov.** J.L.Alves, R.W.Barreto & O.L.Pereira, FIG. 7

Doença: Lesões na face abaxial limitadas a pintas pretas (manchas de pixe), formadas sobre folhas que apesar disto tem aparência geral sadia, 0,2–1,0 mm diam, circulares ou irregulares.

Morfologia: Micélio interno indistinto. Micélio externo ausente. Ascocarpos periteciais, imersos, subesféricos, 190–350 × 65–265 µm, parede composta de

textura angularis, 25–40 µm de espessura, superfície lisa a ligeiramente áspera, negras, clipeo sub-epidermal, muito escuro, presente ao redor do ostíolo e, freqüentemente, envolvendo todo o peritécio. Ostíolo central, simples, circular, 16–20 µm de diam. Paráfises filiformes a cilíndricas, 0,5–1,0 µm diam., septadas, hialinas. Ascas unitunicadas, obclavadas a cilíndricas, com ápice arredondado, 69–100 × 12,5–19 µm, hialinas, com oito ascósporos uniseriados a desordenados. Ascósporos sub-elipsóides, com o ápice agudo e a base arredondada, 12,5–27,5 × 7,5–11,0 µm, asseptados, gutulados, parede espessa, hialinos, lisos.

Espécime examinado. COSTA RICA. Guanacaste: Barragem do Lago Arenal. Em *Miconia calvescens*, 30 Dez 1998, R. W. Barreto (VIC 30586).

DISCUSSÃO

Duas dentre as espécies fúngicas encontradas em associação a *M. calvescens* durante os levantamentos eram ascomicetos que apresentavam características próprias dos fungos incluídos na família Tubeufiaceae, conforme disposto por Rossmam (1987): parede do ascocarpo geralmente fina, com 1 a 2 camadas de células; hifas abaixo e ao redor dos pseudotécios. A maioria das espécies possuem ascósporos longos e multiseptados e hialinos, mas havendo exceções como *Hyalosphaera miconiae* e *Nematothecium* spp., que apresentam ascósporos marrom claros. O exame mais detalhado indicou que ambos os fungos encontrados tinham também características que os situavam bem dentro do conceito adotado para o gênero *Hyalosphaera*: Ascocarpo marrom bem claro ou hialino, de parede fina, permitindo visualização das ascas e ascósporos dentro e material gelatinoso envolvendo as ascas ainda jovens, que desaparecem até a maturidade. As espécies desta família são amplamente distribuídas, no entanto a maior concentração de

espécies é tropical, e em raras ocasiões podem ser encontradas em áreas temperadas. São patógenos que colonizam folhas vivas, algumas espécies são encontradas associadas a pêlos na superfície foliar. Na literatura há apenas três espécies de *Hyalosphaera* descritas. *Hyalosphaera ciliata* Rossman, *Hyalosphaera miconiae* F. Stevens e *Hyalosphaera pulchella* (F. Stevens) Rossman (Rossman, 1987). Devido às diferenças morfológicas como ornamentação do peritécio e tamanho dos ascósporos, o espécime obtido na Costa Rica é distinto das três espécies de *Hyalosphaera* conhecidas e foi reconhecido como representando um táxon novo, o outro espécime foi reconhecido sendo *Hyalosphaera miconiae*, relatada pela primeira vez sobre este hospedeiro no Brasil. Abaixo é apresentada uma chave para identificação das espécies do gênero *Hyalosphaera* (chave 1).

Chave 1: Para identificação das espécies pertencentes ao gênero *Hyalosphaera*

1. Ascocarpos ornamentados..... *Hyalosphaera* sp. nov.
- Ascocarpos sem ornamentações..... 2
2. Ascósporos com apêndices nas extremidades..... *Hyalosphaera ciliata*
- Ascósporos desprovidos de apêndices..... 3
3. Ascósporos hialinos, $33\text{--}35 \times 4\text{--}4,5 \mu\text{m}$, 5 septos..... *Hyalosphaera pulchella*
3. Ascósporos castanhos, $47,5\text{--}52,5 \times 4\text{--}5 \mu\text{m}$, 3–4 septos.... *Hyalosphaera miconiae*

O gênero *Lembosia* (Dothideales: Asterinaceae) possui 40 espécies já descritas (Kirk et al., 2001). A presença de tiriotécios alongados lineares ou em forma de Y e com deiscência por fendas lineares acompanhando o comprimento do ascomas são típicas para este gênero e foram observadas no material obtido de *M. calvescens*. A morfologia deste fungo equivale à descrita por Von Arx e Muller (1962) para *L. melastomatum*. Este fungo foi relatado por diversos autores na literatura e sempre

associado a plantas do gênero *Miconia*. Este é, no entanto, o primeiro relato deste fungo sobre *M. calvescens* e seu primeiro relato na Costa Rica.

Dois dentre os fungos associados à *Miconia* foram reconhecidos como tipicamente pertencentes ao gênero *Microsphaeropsis*. Dentre as espécies discutidas por Sutton (1980a) *Microsphaeropsis callista* (H. Syd.) Sutton e *Microsphaeropsis globulosa* (Camara) Sutton são as mais semelhantes a um dos espécimes obtidos em *Miconia*. No entanto, no mesmo ano de publicação de sua monografia sobre os coelomycetes, Sutton descreveu uma espécie adicional para o gênero *Microsphaeropsis clidemiae*, que além de colonizar um membro da família Melastomataceae tem morfologia ainda mais próxima à encontrada para o fungo coletado em *Miconia* sp. Este é o primeiro relato de *M. clidemiae* em associação a *Miconia* sp. e o primeiro relato deste fungo no Equador.

O segundo espécime de *Microsphaeropsis* encontrado neste estudo estava associado a *M. calvescens* e tem morfologia diferente das espécies discutidas por Sutton (1980a) e das demais encontradas na literatura, particularmente quanto à forma e tamanho dos conídios. Na maioria dos casos, tais como *M. amaranthi* (Ellis & Barthol.) Heiny & Mintz, *M. arundinis* (S. Ahmad) B. Sutton, *M. centaureae* Morgan-Jones, *M. clidemiae* B. Sutton, *M. ochraceae* Carisse & Bernier, os conídios são elipsóides, cilíndricos, subglobosos, globosos e baciliformes, respectivamente, enquanto que na espécie encontrada, os conídios são fusiformes, retos ou ligeiramente curvados, predominantemente com forma similar à de uma banana. Em relação ao tamanho, os conídios de *Microsphaeropsis* sp. nov. são maiores (16–21 µm) quando comparado às demais espécies já descritas, que possuem comprimento máximo de 13,5 µm. Por apresentar diferenças morfológicas e na dimensão dos

conídios, o material analisado difere das espécies encontradas na literatura, portanto foi reconhecido como espécie nova.

O gênero *Myrothecium* Tode ex Fr. pertence ao grupo Coelomycetes. Foi proposto por Tode em 1790, tendo como espécie tipo *Myrothecium inundatum* Tode ex Gray. A monografia mais recente deste gênero é a de Tulloch (1972). Atualmente são aceitas 16 espécies para o gênero *Myrothecium* (Kirk et al. 2001). São fungos polífagos, podem ser encontrados tanto em material vegetal vivo ou em decomposição (Tulloch, 1972; Sutton, 1985), como atuando como endófitos (Bohn, 1993). Algumas espécies podem causar danos de importância econômica a culturas, como exemplo *M. roridum*, causador de manchas foliares em *Antirrhinum*, *Coffea*, *Gossypium* e *Viola* (Tulloch, 1972) e *M. mori* em amoreira (*Morus alba* L.) (Sullia e Padma, 1985).

Após a revisão do gênero *Myrothecium* por Tulloch (1972), que reconheceu como válidas para o gênero treze espécies, foram descritas mais 11 novas espécies. Dentre estas, merece particular atenção a espécie *Myrothecium renaudii*. Escalona (1997) que foi descrita como tendo sinêmios apresentando uma zonação na forma de várias “camadas de crescimento”, como a conformação encontrada na espécie encontrada em *M. calvescens*. A espécie encontrada associada a *M. calvescens* tem alguns aspectos morfológicos bastante diferentes dos de *M. renaudii* como: sinêmios com setas características (hifa marginal), marrons e os conídios produzidos em massa mucilaginosa somente no seu ápice pulvinado e sendo marrons, fusiformes e com um septo (enquanto que hialinos, elipsóides e unicelulares em *M. renaudii*). O material analisado difere das espécies já relatadas na literatura, por isso foi reconhecido como espécie nova para a ciência.

Algumas espécies de “*Phyllachora*” foram listadas por Viégas (1961) ocorrendo sobre plantas do gênero *Miconia*, a saber: *P. melastomacearum* Racib. ex Theiss. & Syd., *Phyllachora miconiicola* Speg., que são hoje aceitas como espécies do gênero *Phyllachora*. Já *Phyllachora gibbosa* Wint., *Phyllachora miconiae* (Duby) Sacc., *Phyllachora peribebuyensis* Speg., e *Phyllachora sellowii* Henn., foram reconhecidas como pertencentes ao gênero *Coccodiella*, são elas: *Coccodiella peribebuyensis* (Speg.) Hino & Katumoto., *Coccodiella melastomatis* (Lév.) Hino & Katumoto., *Coccodiella melastomatis*, *Coccodiella miconiae* (Duby) Hino & Katumoto , respectivamente.

Até hoje, nenhuma espécie de *Phyllachora* havia sido relatada em *M. calvescens*. As diferenças morfológicas entre a nova espécie e as espécies do gênero descritas em Melastomataceae são enumeradas na Tab. 1. Note-se que o tamanho e forma dos ascósporos da espécie encontrada no presente trabalho diferenciam-na claramente das demais e por isto ela está sendo proposta como nova para a ciência.

Tabela 1. Características morfológicas de espécies de *Phyllachora* associadas a *Miconia* spp.

Espécies de <i>Phyllachora</i> sobre <i>Miconia</i>	Peritécios	Ascas	Ascósporos
			Elipsóides (agudo em ambos as extremidades) 15 × 7–8 µm
<i>P. miconiicola</i>	120–200 µm	90–100 × 12 µm	
<i>P. melastomacearum</i>	130–180 × 100–140 µm	98–106 × 12–14 µm	Ovais 10–13 × 6 µm
<i>Phyllachora</i> sp.nov.	190–350 × 65–265 µm	69–100 × 12,5–19 µm	Elipsóides (com ápice arredondado e base aguda) 12,5–27,5 × 7,5–11,0 µm

No âmbito dos levantamentos feitos da micobiota de *M. calvescens*, em busca de agentes de biocontrole para esta planta invasora, um total de 12 espécies de fungos foi obtido e descrito, sendo que aqui, sete espécies foram adicionadas às cinco documentadas por Seixas et al. (2007). Deste total seis representavam espécies novas para a ciência, confirmando o valor do estudo intensivo da micobiota de espécies botânicas selecionadas como forma de se contribuir para a ampliação do conhecimento da micodiversidade. Além das espécies de fungos coletados em associação a *M. calvescens* por Seixas et al. (2007) e estudadas em detalhes por estes autores, também foram citados outros fungos que foram superficialmente identificados como: *Corticium* sp., *Melanconium* sp., *Myrothecium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Phyllachora* sp. e *Pythium* sp. Neste trabalho esclareceu-se a identidade da suposta espécie de *Melanconium* sp. (na verdade *M. clidemiae*), *Myrothecium* sp. (reconhecido como uma espécie nova) e *Phyllachora* sp. (também reconhecida como uma espécie nova). *Corticium* sp., *Pestalotiopsis* sp. e *Pythium* sp. não foram estudados em mais detalhes agora pela escassez de material para estudo ou falta de material em cultura. Os fungos examinados no presente trabalho aparentemente também têm pouco potencial para o controle biológico. No entanto, a simples observação do impacto produzido por um agente de controle biológico sobre o seu hospedeiro no campo, pode ser inadequada para predizer o seu real potencial, conforme já demonstrado algumas vezes na prática (Room et al., 1981).

Muitas áreas dos neotrópicos, onde *M. calvescens* ocorre naturalmente, ainda não foram exploradas adequadamente, sendo de particular interesse os contrafortes orientais dos Andes onde ocorre com frequência o biótipo da planta similar ao que invade áreas do Pacífico. Apenas parte do Equador foi visitada para este fim e espera-se que descobertas interessantes sejam feitas com buscas mais intensivas

nesta região. Até o presente, um único agente de controle biológico foi utilizado contra *M. calvenscens*, mais exatamente *C. gloeosporioides* f. sp. *miconiae*, introduzido em 1997 no Havaí e em 2007 na Polinésia Francesa. Recentemente (T. Johnson, com. pess. 2008) comentou que a situação no Havai, com relação à gravidade da invasão por *M. calvenscens*, continua a mesma. A opinião dos técnicos envolvidos é a de que mais agentes de controle biológico são ainda necessários para um controle efetivo de *M. calvenscens*. Além dos fungos, o nematóide fitopatogênico *Ditylenchus drepanocercus* Goodey causador de manchas angulares em folhas de *M. calvenscens* (Seixas et al., 2004) foi estudado e avaliado em certa medida como agente de controle biológico, mas considerado como tendo pouco potencial. No momento insetos encontrados na Costa Rica e no Brasil (R. Burkhart, 1995; Picanço et al., 2005; Smith, 2006; Badenes-Perez et al., 2007) e uma espécie de nematóide *Ditylenchus* sp. nov., causadora de galhas na parte aérea das plantas, estão sendo avaliadas com mais detalhe e aparentam ter também um bom potencial para utilização no controle biológico.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi apoiado por USGS BRD Pacific Islands Ecosystem Research Center, National Park Service and the Research Corporation University of Hawaii. Observações em MEV foram feitas no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade de Federal Viçosa, com colaboração da Dra. Cláudia A. Vanetti. Os autores agradecem ao CNPq (Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela bolsa concedida. R. W. Barreto e J. L. Alves agradecem também a J.

Jaramillo pelas informações prestadas sobre as ocorrências de *M. calvescens* no Equador e Amy Y. Rossman e José Luiz Bezerra pelas sugestões.

LITERATURA CITADA

- Badenes-Perez FR, Johnson MT. 2007. Ecology, host specificity and impact of *Atomacera petroa* Smith (Hymenoptera: Argidae) on *Miconia calvescens* DC (Melastomataceae). *Biological Control* 43: 95-101.
- Bohn M. 1993. *Myrothecium groenlandicum* sp. nov. a presumed endophytic fungus on *Bétula nana* (Greenland). *Mycotaxon* 46: 335-341.
- Dhingra OD, Singlair JB. 1995. Basic plant pathology methods. 2nd ed. London: Lewis Publishers.
- DeWalt JS, Denslow JS, Ickes K. 2003. Natural-enemy release facilitates habitat expansion of the invasive tropical shrub *Clidemia hirta*. Department of biological sciences, Louisiana State University. *Ecology* 85: 471–483
- Escalona F. 1997. *Myrothecium renaudii* sp. nov. on *Heliconia psittacorum* × *H. spathocircinata*. *Mycotaxon* 61: 81-86.
- Katumoto K. 1968. On the genus *Coccodiella* Hara. *J Jap Bot.* 43 (9): 277-283.
- Kirk PM, Cannon PF, David JC, Stalpers JA. 2001. Dictionary of the Fungi. 9th ed. CAB International. 655 p.
- Meyer, JY. 1996. Status of *Miconia calvescens* (Melastomataceae), a dominant invasive tree in the Society Islands (French Polynesia). *Pac Sci* 50: 66–78.

- . 1998. Observations on the Reproductive Biology of *Miconia calvenscens* DC (Melastomataceae), an Alien Invasive Tree on the Island of Tahiti (South Pacific Ocean). *Biotropica* 30: 609-624.
- , Florence J. 1996. Tahiti's native endangered by the invasion of *Miconia calvenscens* DC. (Melastomataceae). *J Biogeo* 23:775–781.
- Pereira JM, Barreto RW, Ellison CA, Maffia LA. 2003. *Corynespora cassiicola* f. sp. *lantanae*: a potential biocontrol agent for *Lantana camara* from Brazil. *Biological Control* 26: 21-31.
- Picanço MC, Barreto RW, Fidelis EG, Semeão AA, Rosado JF, Moreno SC, Barros EC, Silva GA, Johnson MT. 2005. Biological control of *Miconia calvenscens* by phytophagous arthropods. Technical Report 134. Pacific Cooperative Studies Unit, University of Hawaii at Manoa, Honolulu, HI, 31p.
- Room PM, Harley KLS, Forno IW, Sands DPA. 1981. Successful biological control of the floating weed salvinia. *Nature* 294: 78 – 80.
- Rossman AY. 1987. The Tubeufiaceae and similar loculoascomycetes. *Mycological Papers* 157.
- Seixas CDS, Barreto RW, Freitas LG, Maffia LA, Monteiro FT. 2004. *Ditylenchus drepanocercus* (Nematoda), a potential biological control agent for *Miconia calvenscens* (Melastomataceae): host-specificity and epidemiology. *Biological Control* 31: 29-37
- , ———, Killgore E. 2007. Fungal pathogens of *Miconia calvenscens* (Melastomataceae) from Brazil, with reference to classical biological control. *Mycologia* 99: 99-111.

- Smith DR. 2006. Los Sinfitos. In: Hanson, P.E., Gauld, I.D. (Eds.), Hymenoptera de la Region Neotropical. Memoirs of the American Entomological Institute 77: 166–201.
- Sullia SB, Padma SD. 1985. *Myrothecium mori* sp. nov. A New Leaf Spot Patogen of Mulberry. Current Science 54: 757-758.
- Sutton BC. 1980 a. The coelomycetes. Fungi Imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata New York: CABI Publishing. 696 p.
- . 1980 b. *Microsphaeropsis clidemiae* sp. nov. associated with leaf lesions on *clidemia hirta*. Trans Br Mycol Soc 74: 645-647.
- . 1985. *Myrothecium flavo-virens* sp. nov. Notes on Deuteromycetes. Sydowia, Annales Mycologici Ser. II. 38: 329-331.
- University of Hawaii, Botany Department. The Search for Biological Control of *Miconia calvescens*.
http://www.botany.hawaii.edu/faculty/cw_smith/mc_control.htm
 (Julho 07, 2008).
- Tulloch M. 1972. The genus *Myrothecium* TODE ex FR. Mycological Papers 130.
- Viégas AP. 1961. Índice de fungos da América do Sul. Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas, 921 p.
- Von Arx JA, Muller E. 1962. Beiträge Zur Kryptogamenflora der Schweiz. 922p.
- Ziller SR. 2000. A Estepe Gramíneo-Lenhosa no segundo planalto do Paraná: diagnóstico ambiental com enfoque à contaminação biológica. Tese de doutorado. Curitiba: Universidade Federal do Paraná. 268 p.

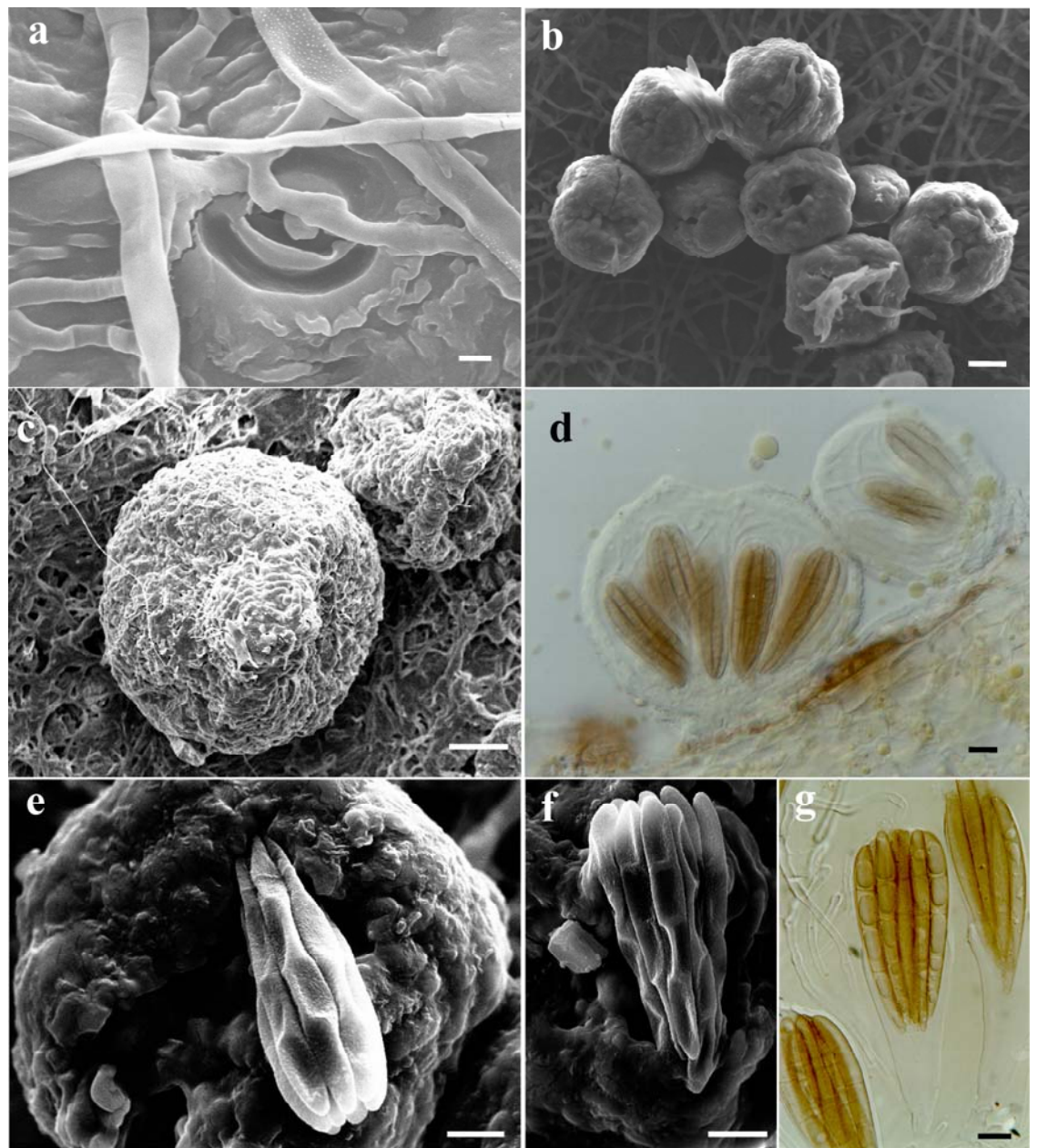


FIG. 1. *Hyalosphaera miconiae* (VIC 28786): a. Penetração do fungo observada em MEV; b. Grupo de peritécios em MEV; c. Peritécio observado em detalhe sob MEV; d. Peritécio hialino visto em corte transversal; e. Asca depositada sobre peritécio em MEV; f. Ascósporos verruculosos, organizados em feixes; g. Liberação de ascósporos pela asca. Barras: a = 2 μ m; b e c = 20 μ m; d, e, f e g = 10 μ m.

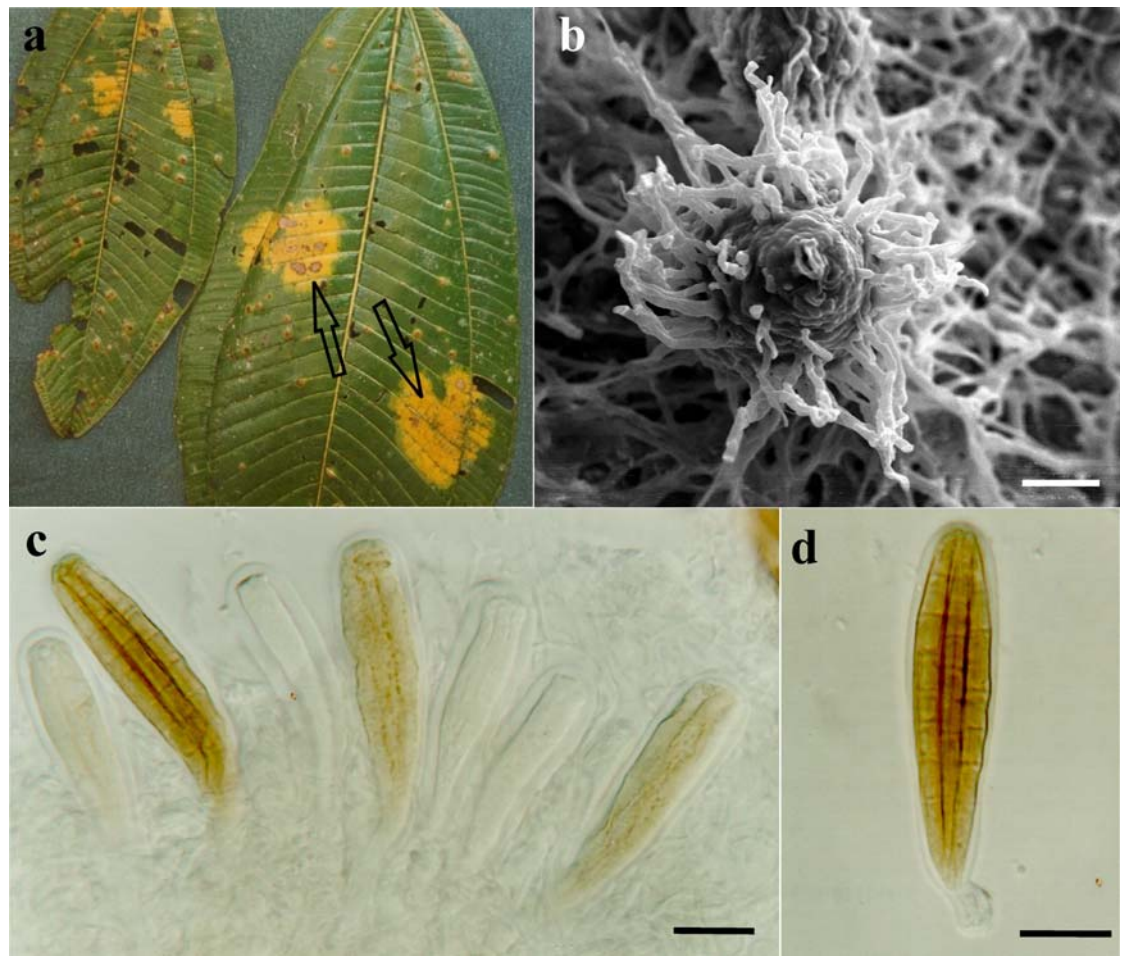


FIG. 2. *Hyalosphaera* **sp. nov.** (VIC 30442): a. Sintomas (manchas amarelas) são mostrados por setas; b. Peritécio ornamentado observado sob MEV; c. Ascas paralelas; d. Detalhe da asca hialina contendo ascósporos marrons. b, c e d = 10 μ m.

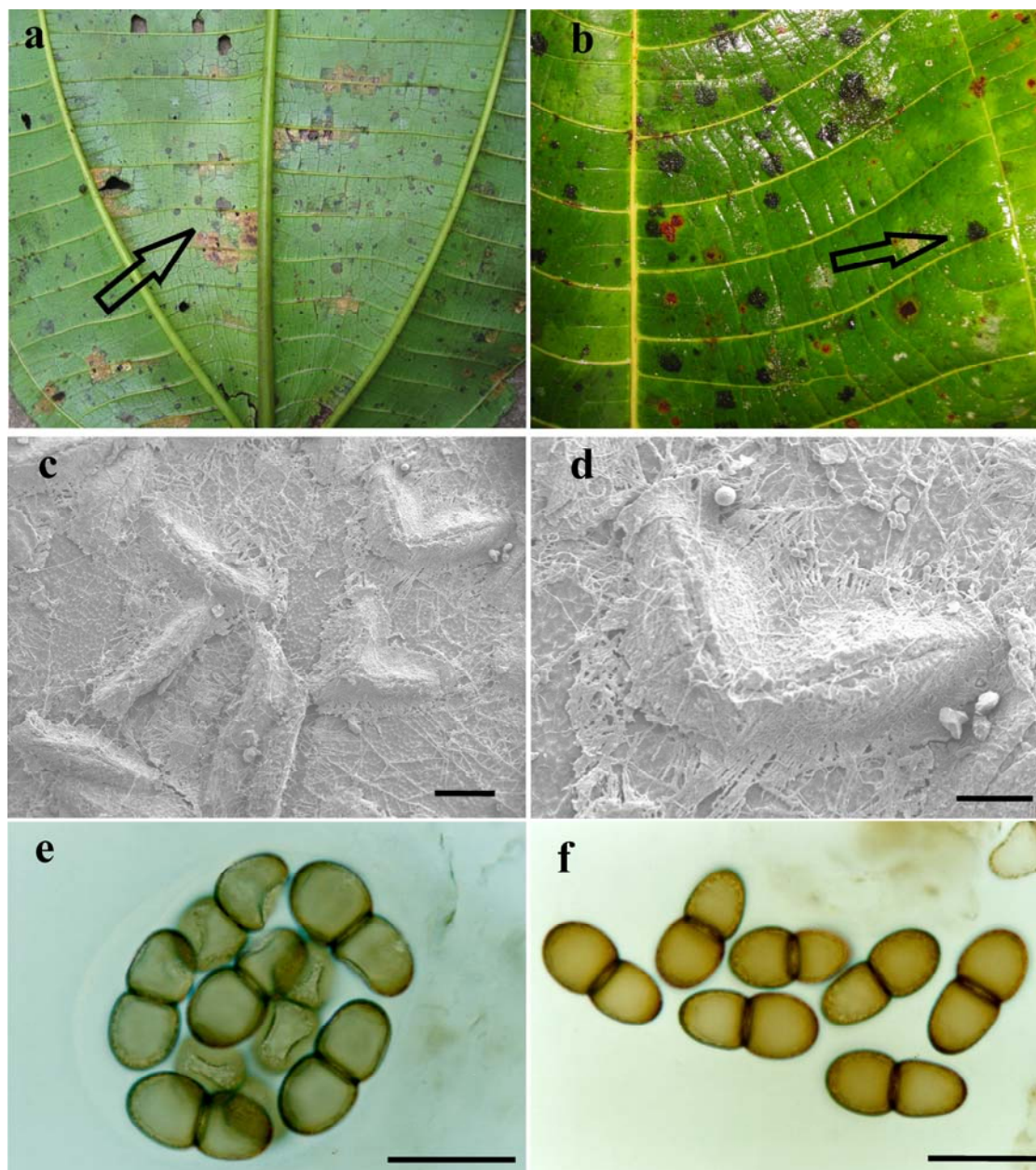


FIG. 3. *Lembosia melastomatum* (VIC 30589): a. Lesões negras por toda a superfície abaxial; b. Formação de colônias adaxialmente; c. Grupo de tirioteócios em MEV; d. Detalhe de tirioteócio com ostíolo por fenda longitudinal em MEV; e. Asca com 8 ascósporos em seu interior; f. Ascósporos marrons, constrictos no septo. Barras: c = 200 μm ; d = 100 μm ; e e f = 20 μm .

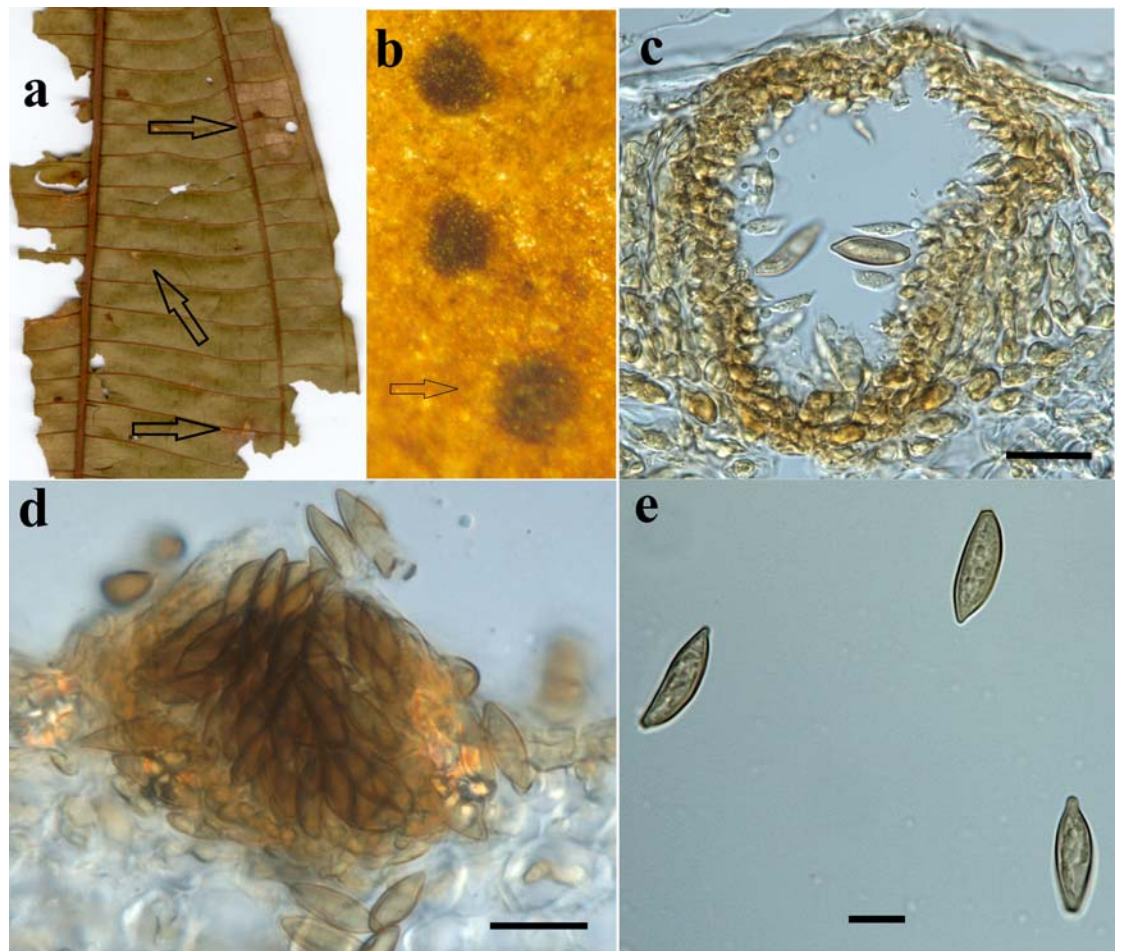


FIG. 4. *Microsphaeropsis* **sp. nov.** (VIC 22203): a. Setas indicam sintomas causados pelo fungo na superfície abaxial de folhas de *M. calvescens*; b. Detalhe das pontuações negras espalhadas por toda a lesão; c. Picnídio e início da formação de conídios; d. Liberação de conídios maduros; e. Detalhe do conídio de ápice rombudo. Barras: c e d = 20 μ m; e = 10 μ m.

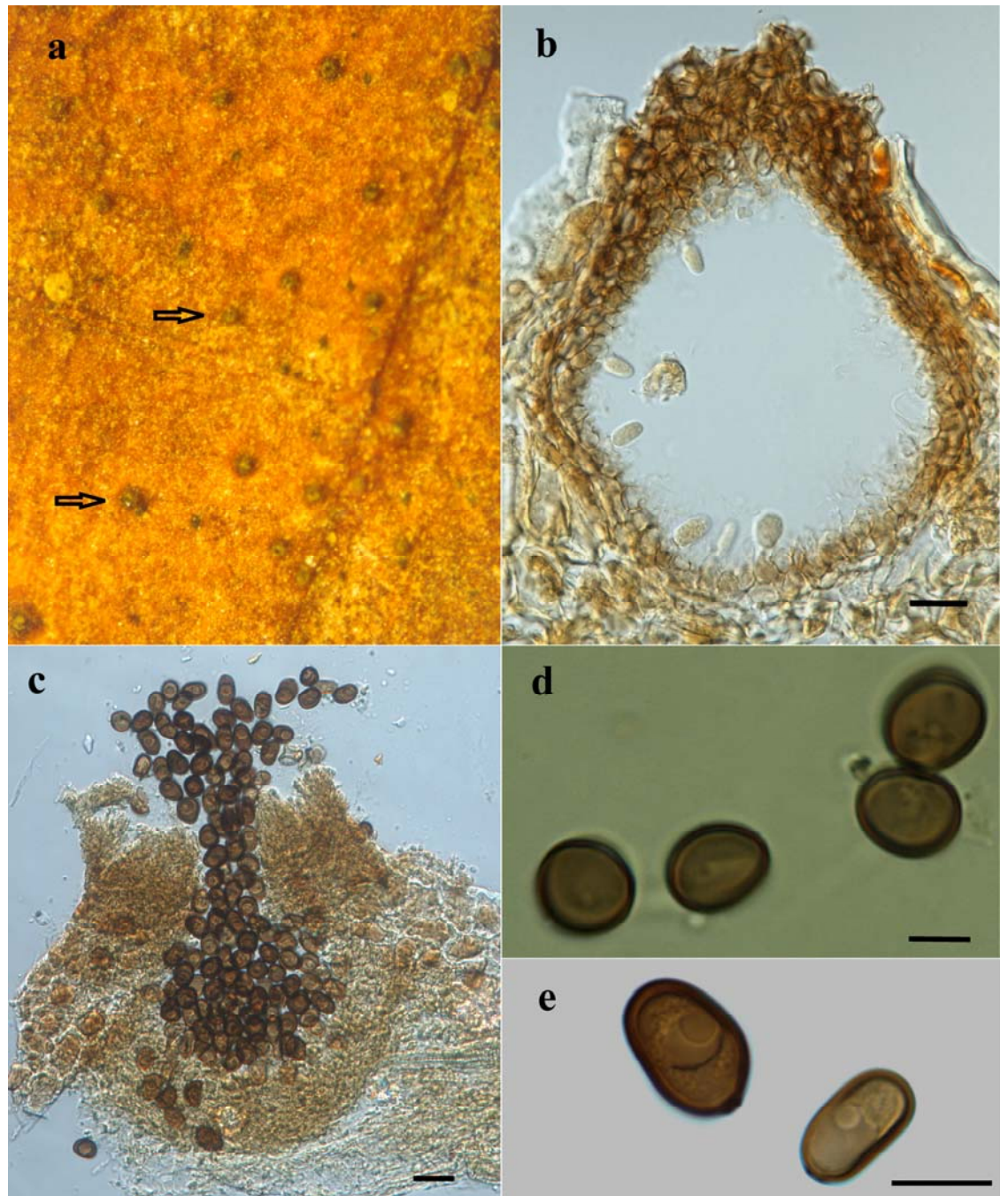


FIG. 5. *Microsphaeropsis clidemiae* (VIC 30587): a. Pontuações negras do fungo na superfície adaxial são mostradas por setas; b. Início da formação de conídios a partir de células da parede do picnídio; c. Liberação de conídios maduros; d. Conídios; e. Detalhe de conídios com parede espessa. Barras: b = 20 μ m; c = 15 μ m e d e e = 10 μ m.

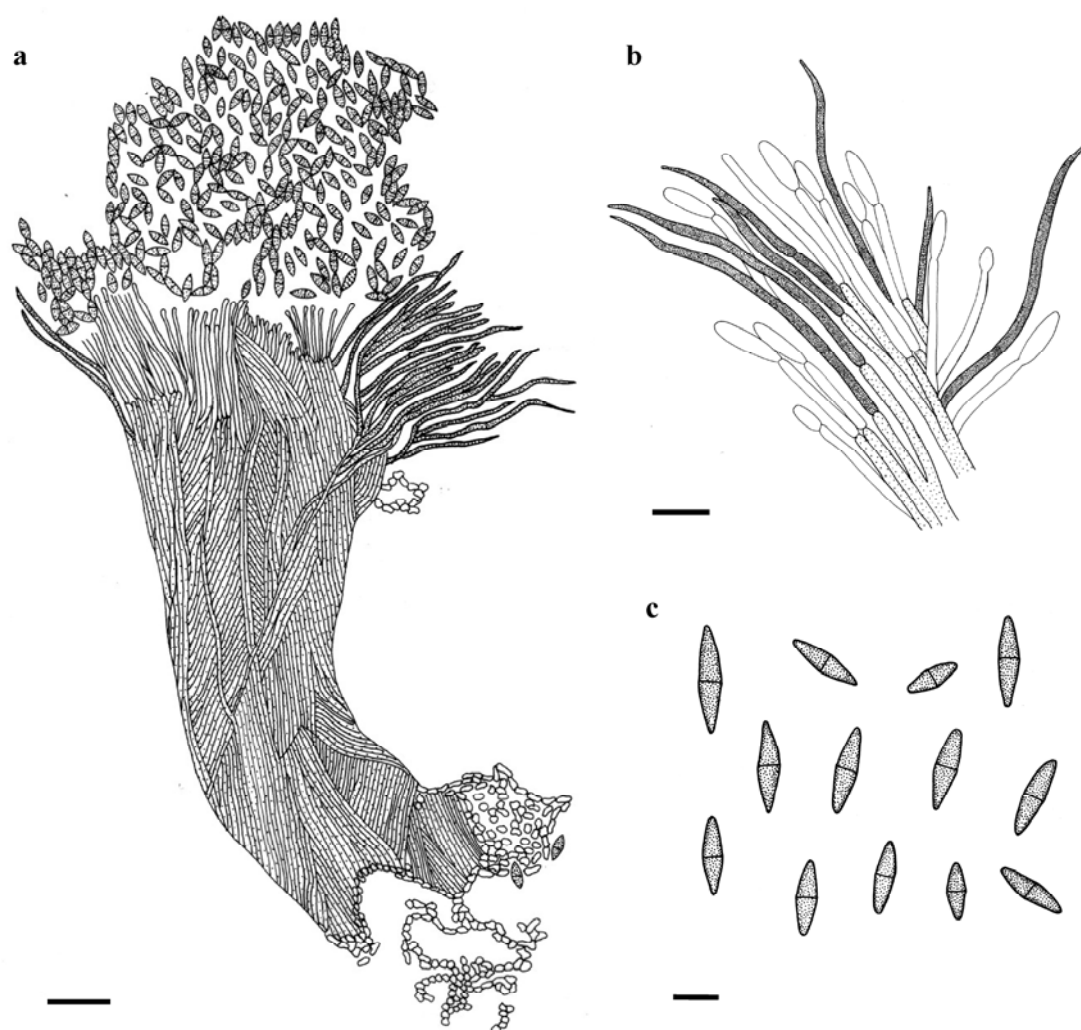


FIG. 6. *Myrothecium* **sp. nov.** (VIC 30589): a. Sinêmio composto por conidióforos compactados, mucilagem de conídios e setas na região apical; b. Detalhe da região fértil mostrando células conidiogênicas e setas negras; c. Conídios oliváceos a marrons, com 1 septo. Barras: a = 45 μ m; b e c = 10 μ m.



FIG. 7. *Phyllachora* **sp. nov.** (VIC 30586): a. Sinais do fungo são mostrados pela seta; b. Detalhe da asca com ascósporos e paráfises hialinas; c. Clípeo se estendendo por todo o peritécio. Barras: b = 20 μ m e c = 50 μ m.

* Fax: (31) 3899-2240, e-mail: rbarreto@ufv.br

Biologia e obtenção de inóculo de *Coccodiella miconiae*, agente de controle biológico para *Miconia calvenscens*

Janaina Lana Alves* & Robert Weingart Barreto

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 36571-000, Brasil. *autor para correspondência (e-mail: janainaee@yahoo.com.br)

Resumo. *Miconia calvenscens* é uma espécie arbustiva, neotropical, pertencente à família Melastomataceae, que se tornou invasora agressiva de ecossistemas florestais naturais após sua introdução como planta ornamental no Taití, Havaí e outras ilhas do Pacífico. O controle biológico clássico é reconhecido como sendo a única alternativa sustentável para uma solução definitiva a longo prazo para este tipo de problema. Levantamentos foram realizados no Brasil, Equador e Costa Rica em busca de fitopatógenos para serem utilizados como agentes de biocontrole de *M. calvenscens* e revelaram a existência de um fitoplasma, dois nematóides e diversas espécies fúngicas atacando esta planta. Dentre os fungos, *Coccodiella miconiae* foi considerado como um dos candidatos mais promissores para utilização no controle biológico de *M. calvenscens*. Trata-se de um patógeno biotrófico e possivelmente altamente específico e causador de uma doença foliar muito severa que denominamos de pústula amarela. Tentativas preliminares de avaliação do potencial efetivo de *C. miconiae* foram frustradas, pois além de se tratar de fungo que, como biotrófico, não cresce em meio de cultura, obrigando a utilização de inóculo fresco coletado diretamente de plantas infectadas no campo, se mostrou também bastante difícil de ser manipulado no laboratório. A obtenção de inóculo viável e virulento do fungo e a simples reprodução da doença pela aplicação de ascósporos sobre plantas suscetíveis se apresentaram como operações difíceis de se efetuar. Como membros do gênero *Coccodiella* nunca foram investigados quanto ao aspecto patológico e há pouca informação publicada na literatura fitopatológica sobre os membros da família Phyllachoraceae o desenvolvimento de um protocolo básico para a manipulação deste fungo se faz então necessário para que este fungo possa vir a ser eventualmente explorado no biocontrole de *M. calvenscens*. O propósito deste trabalho foi o de se tentar desenvolver tal protocolo. O trabalho combinou a observação da evolução do ciclo de vida do fungo em condições de campo durante um ano e uma série de testes

efetuados em laboratório. No laboratório, foram feitos testes para determinação do método ideal de obtenção de ascósporos a partir de estromas maduros, determinação das condições adequadas para a germinação dos ascósporos e a escolha de um método de preservação de materiais do fungo que garantisse a viabilidade dos ascósporos por tempo suficiente para o transporte para o Havaí (para estudos adicionais em quarentena para a introdução). Após a realização de numerosos ensaios concluiu-se o seguinte: a) o melhor método para obtenção de inóculo é a retirada de estromas maduros e sadios das folhas de *M. calvescens* colonizadas pelo fungo no campo, sua suspensão em água esterilizada sob agitação por borbulhamento durante 3 a 4 h e posterior separação dos ascósporos por filtração e centrifugação com imediata utilização do inóculo; b) a temperatura ideal para germinação foi de 25°C e fotoperíodo de 12 h; c) o melhor método de preservação dentre os testados foi a herborização de folhas doentes por dois dias.

INTRODUÇÃO

As espécies da família Melastomataceae encontram-se distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais de todo o globo (Clausing & Renner 2001). Segundo Goldenberg (2004), o gênero *Miconia* é o maior gênero da família, com aproximadamente 1100 espécies. Plantas desse gênero ocorrem desde o sul do México ao sul do Brasil, bem como no norte da Argentina e do Uruguai (Meyer, 1998).

Miconia calvescens (Schr. & Mart.) DC. é uma planta arbustiva, introduzida como ornamental em diversas regiões do mundo. No entanto, livre de seus inimigos naturais esta planta teve uma expansão populacional extraordinária na Polinésia Francesa e no Havaí, sendo hoje considerada uma das maiores ameaças aos ecossistemas florestais naturais das ilhas do Pacífico (Loope, 1997). Como solução sustentável para problemas de invasões biológicas, como o envolvendo *M. calvescens*, a única opção viável é o controle biológico clássico (Meyer & Malet, 1997). Trata-se de um método de baixo custo, que não polui o ambiente e é mais seguro (Harley & Forno, 1992). Uma das primeiras ações em um programa de controle biológico clássico de uma planta invasora é a realização de levantamentos

de inimigos naturais da planta alvo na região onde esta é nativa (Schoroeder, 1983). Em 1995, após um convênio firmado entre a FUNARBE (Fundação Arthur Bernardes) e o RCUH (Research Corporation of the University of Hawaii), realizaram-se explorações com o intuito de encontrar fitopatógenos associados a *M. calvescens*.

Recentemente, parte da micobiota associada a *M. calvescens* foi descrita e publicada (Seixas *et al.*, 2007), dentre os quais: *Coccidiella miconiae* (Duby) Hino & Katumoto, *Glomerella cingulata* (= *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. f. sp. *miconiae*), *Guignardia miconiae*, *Korunomyces prostratus* e *Pseudocercospora tamoneae*. Dentre eles, somente *C. gloeosporioides* f. sp. *miconiae* foi introduzido em ambientes onde a planta tornou-se invasora. Em 1997, foi concluída a avaliação e autorizada sua introdução no Havaí (Killgore *et al.*, 1997) e, posteriormente, no Taiti (Meyer *et al.*, 2007). No presente trabalho, são adicionalmente descritos: *Hyalosphaera miconiae*, *Hyalosphaera* sp., *Lembosia melastomatum*, *Microsphaeropsis clidemiae*, *Microsphaeropsis* sp., *Myrothecium* sp. e *Phyllachora* sp. Outros potenciais agentes também foram obtidos, tais como o nematóide *Ditylenchus drepanocercus* (Goodey) e uma outra espécie do gênero *Ditylenchus*, provavelmente nova e um fitoplasma (Seixas, 2002). Vale ressaltar que apesar do estabelecimento de *C. gloeosporioides* f. sp. *miconiae*, ainda há necessidade de introdução de novos agentes de biocontrole.

Como resultado deste esforço, revelou-se a existência de uma grande diversidade de fungos fitopatogênicos, possíveis agentes de biocontrole para esta planta. Dentre os fitopatógenos encontrados está o fungo *C. miconiae*. Esta espécie foi encontrada no Brasil, na Costa Rica e no Equador. Este fungo causa uma doença severa em folhas de *M. calvescens* e que foi descrita como “pústula amarela”. Abaxialmente são formadas estruturas estromáticas negras contendo os ascósporos enquanto que na superfície adaxial o tecido torna-se um pouco elevado e assume coloração amarelada. As lesões podem ser numerosas e levar a deformação das folhas e dão a estas uma aparência que lembra o ataque dos fungos da ordem Uredinales (ferrugens) em sua fase telial.

O gênero *Coccidiella*, proposto por K. Hara em 1911, abrange um grande número de espécies já descritas, dentre elas *C. miconiae*. Em sua maioria, trata-se de parasitas foliares com ampla distribuição geográfica. No laboratório, foram propostas metodologias para gerar informações sobre sua biologia a fim de ampliar os

conhecimentos sobre este fungo. No campo, verificou-se a influência de fatores climáticos sobre a incidência e severidade da doença. É importante considerar que, sem essas informações torna-se complicado avaliar seu potencial. Portanto, objetivou-se com este trabalho preencher essa lacuna para que este fungo possa ser manipulado de maneira adequada e posteriormente ser utilizado como agente de biocontrole para *M. calvescens*.

Vários estudos foram conduzidos no decorrer de dez anos. Dentre eles podemos citar alguns realizados por Seixas (2002). Descreveu pela primeira vez o ciclo de vida do fungo *C. miconiae*; relatou seis espécies de micoparasitas, encontradas colonizando estromas de *C. miconiae*, com maior frequência para espécies do gênero *Sagenomella*. Após a descrição destas espécies, testou métodos de exclusão, que é muito importante para o sucesso de patógenos em programas de controle biológico; realizou testes para definir condições ideais para a ejeção de ascósporos de *C. miconiae* e qual o maior período de preservação de estromas em que os ascósporos permanecem ainda viáveis; conduziu inoculações utilizando-se inóculo obtido por maceração de estromas, seguido de pincelamento em folhas, mas não conseguiu reproduzir a doença.

No presente trabalho tentativas preliminares de avaliação do potencial efetivo de *C. miconiae* foram frustradas, pois trata-se de um patógeno biotrófico que não cresce em meio de cultura sendo, portanto, necessária a utilização de inóculo fresco coletado de plantas doentes no campo. A obtenção de inóculo viável e virulento do fungo e a reprodução da doença pela aplicação de ascósporos sobre plantas suscetíveis se apresentaram como obstáculos difíceis de serem superados. Observou-se a evolução do ciclo de vida do fungo em condições de campo durante um ano e vários testes foram realizados em laboratório. Iniciaram-se os trabalhos com inóculo obtido por maceração de estromas em água destilada. Várias tentativas foram feitas, mas a hipótese de que uma possível substância auto inibidora estaria presente no estroma, nas ascas ou nos ascósporos serviu como incentivo para realização de diversas metodologias, como por exemplo lavagens sucessivas de ascósporos. No decorrer dos estudos, suspeitou-se de que exposição a água livre estaria sendo prejudicial aos ascósporos, como ocorre para determinados membros da família Erysiphaceae. A coincidência de tal observação foi feita no laboratório com *Oidium*, encontrado atacando outra espécie de planta, também daninha, *Schinus terebinthifolius* (aroeirinha). Para este fungo, o contato com água livre estava

proporcionando o rompimento da membrana plasmática, por isso resolveu-se transpor esse processo de acompanhamento da germinação de conídios de *Oidium* para ascósporos de *Coccodiella*. No entanto, foi proposta a ejeção natural de ascósporos, neste caso os ascósporos não têm contato direto com a água. Além deste, outros métodos foram propostos para desvendar se a água realmente seria a causa principal da não ocorrência da germinação, como exemplo a adição de uma substância (o manitol), capaz de modificar o potencial osmótico da suspensão. Mais tarde foi proposta a utilização de uma bomba de aquário sob agitação, para extrair ascósporos dos corpos de frutificação. Ascósporos de *C. miconiae* são extremamente sensíveis, o que torna difícil o seu armazenamento e posterior transporte. Portanto, a escolha de um método de preservação de materiais fúngicos que garantisse a viabilidade dos ascósporos por tempo suficiente para o transporte para o Havaí é essencial para que estudos adicionais de quarentena possam ser feitos e finalmente autorizada sua introdução.

Os membros do gênero *Coccodiella* ainda não foram investigados quanto ao aspecto de sua biologia, sendo assim, pretendeu-se desenvolver um protocolo para a manipulação deste fungo para que o mesmo possa vir a ser eventualmente explorado no biocontrole de *M. calvescens*.

MATERIAL E MÉTODOS

1) Extração de ascósporos de *Coccidiella miconiae*

a) Esmagamento de estromas - Folhas doentes foram coletadas no campo, pela manhã, em bosque situado na localidade de Cristais (município de Viçosa, MG) e trazidas para o laboratório. Estromas grandes e maduros ($\geq 1,5\text{mm}$ diam.), sem evidências de danos de insetos e sem crescimento de micoparasitas foram selecionados e destacados do tecido foliar com o auxílio de um bisturi. Em almofariz de porcelana contendo 5 mL de água destilada estéril, foram colocados 200 estromas que, posteriormente, foram esmagados com um pistilo e a suspensão obtida filtrada em gaze. Com o auxílio de câmara de Neubauer foi realizada a contagem de ascósporos, determinação da concentração ajustada para 10^7 ascósporos/mL. A suspensão obtida foi utilizada imediatamente em outros estudos.

b) Borbulhamento de estromas em água - Estromas obtidos como o descrito acima, foram colocados em um becker contendo 30 mL de água destilada esterilizada. Uma bomba de aquário ligada a uma mangueira que tinha a extremidade imersa no interior do becker foi acionada e os estromas ficaram sob agitação por 3-4 h. A suspensão de ascósporos obtida foi filtrada em gaze a concentração aferida e ajustada conforme descrito acima. A suspensão obtida foi utilizada imediatamente em outros experimentos.

c) Ejeção natural de ascósporos - Folhas contendo estromas, como os citados anteriormente, foram coletadas e fragmentos contendo estromas foram selecionados com características já citadas anteriormente. Foram recortados com uma tesoura e fixados com vaselina na face interior da tampa da placa de Petri esterilizada (a porção contendo o estroma ficou voltada para o interior da placa). Na base da placa havia uma camada de agar-água ou meio de cultura agarizado ou então uma camada de papel filtro esterilizado e umedecido e sobre este um bastão de vidro em formato de V, que servia de suporte para uma lâmina. O conjunto de placa, papel filtro umedecido, bastão de vidro e lâmina foi previamente autoclavado a 127°C por 30 minutos (Fig. 1). As placas foram fechadas e vedadas com filme de PVC e mantidas a 25°C , sob fotoperíodo de 12 h. Após 48 h, a lâmina foi retirada do interior da placa e sob microscópio de luz foi observado se houve a

ejeção dos ascósporos. Onde houve a ejeção foi realizada também a contagem dos ascósporos e determinada a concentração para que estes ascósporos fossem utilizados em estudos posteriores.

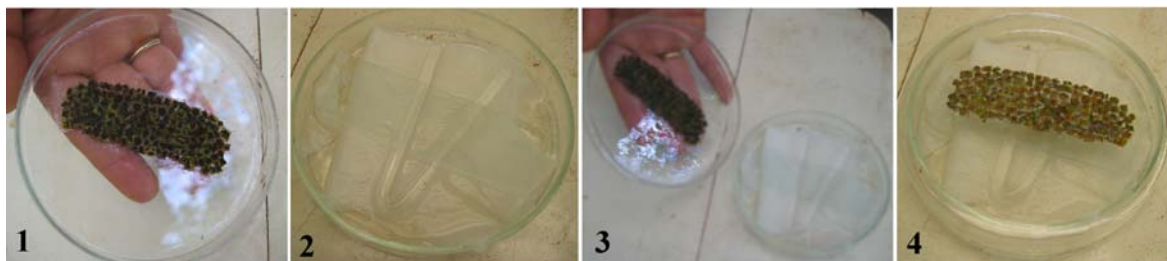


Figura 1. Aparato para ejeção natural de ascósporos. 1- Estromas fixados na face interna da tampa da placa de Petri ; 2- Papel umedecido no fundo da placa, sobre ele o bastão de vidro que serviu de suporte para a lâmina; 3- A placa pronta para ser fechada e 4- Vedada com filme de PVC.

2) Determinação de condições ideais para a germinação de ascósporos de *Coccidiella miconiae*

2.1) Incubação de ascósporos sob diferentes condições de temperatura

Placas montadas para a obtenção de ascósporos ejetados naturalmente (1c) foram utilizadas neste experimento. Aguardou-se um período de 24 h. Depois disto as tampas das placas foram trocadas por tampas estéreis e o aparato foi selado novamente com filme de PVC. As placas foram então mantidas a 5, 10, 15, 20, 25, 30 ou 35 °C. O mesmo procedimento foi efetuado utilizando-se os métodos de extração de ascósporos descritos em 1a e 1b. Os três ensaios foram montados em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições (uma placa/repetição). As placas foram mantidas nestas condições de temperatura e após 6, 12, 24 e 48 h as placas foram observadas sob microscópio de luz para determinar o percentual de germinação de ascósporos na superfície das lâminas. Foram avaliados os 100 primeiros ascósporos observados por lâmina. Considerou-se como germinado, o ascósporo que tivesse produzido tubo germinativo com comprimento igual ou maior que seu diâmetro.

2.2) Exposição de ascósporos a diferentes regimes de luz

Utilizou-se o mesmo procedimento descrito no item 2.1, porém deixando-se as placas em incubadoras ajustadas para temperatura de 25 °C e regimes de luz de: a) fotoperíodo de 12 h iniciado com o período de escuro; b) idem, iniciado com o período de luz; c) luz contínua e d) escuro contínuo (placas envoltas em papel alumínio). O ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições (uma placa/repetição). As placas foram mantidas em incubadoras ajustadas para cada regime de luz por um período fixo de 24 h. Após este período e com um intervalo de 6, 12, 24 e 48 h, grupos de placas submetidas a cada regime de luz foram retirados das incubadoras para determinar o percentual de germinação conforme descrito no item 2.1.

2.3) Lavagem sucessiva de ascósporos

Adotou-se o método descrito em Dhingra & Singlair (1995). A suspensão de ascósporos foi centrifugada por 10 minutos, com velocidade de 4070 rpm. Decorridos 10 minutos, o sobrenadante foi eliminado e o conteúdo do tubo foi ressuspensionado em água destilada esterilizada e novamente centrifugado. Este procedimento foi repetido por 10 vezes. Gotas da suspensão obtida da lavagem foram depositadas sobre lâminas em aparato como o descrito em 1c e mantidas a 25 °C e sob fotoperíodo de 12 h. Como testemunhas foram utilizadas gotas de suspensão de ascósporos obtida por esmagamento de estromas e sem a lavagem e montadas conforme descrito em 1a. Este ensaio foi montado em DIC com quatro repetições (1 lâmina/repetição). Após 6, 12, 24 e 48 h, foi determinado o percentual de ascósporos germinados conforme descrito no item 2.1.

2.4) Suspensão de ascósporos em lavado de folhas de *Miconia calvenscens*

Cinco folhas sadias de *M. calvenscens* foram coletadas e colocadas em uma bandeja de plástico limpa contendo água destilada esterilizada. Um pincel foi passado suavemente sobre as folhas para se obter um lavado. Uma alíquota de 5 mL deste lavado foi colocada em um almofariz de porcelana juntamente com 200 estromas sadios e maduros de *C. miconiae* e procedeu-se ao esmagamento dos estromas. A suspensão obtida foi filtrada em gaze e, logo após, gotas desta suspensão foram colocadas sobre

lâmina que ficou depositada dentro de um aparato como o descrito em 1c. As placas foram mantidas a 25 °C e sob fotoperíodo de 12 h. A testemunha consistiu de suspensão obtida por esmagamento de estromas como descrito em 1a. Após 6, 12, 24 e 48 h, foi determinado o percentual de ascósporos germinados conforme descrito no item 2.1.

2.5) Diluição da suspensão de ascósporos

Após a obtenção da suspensão de ascósporos por esmagamento de estromas conforme descrito em 1.a e quantificação da concentração, foram preparadas diluições crescentes da suspensão na ordem de 10^7 , 10^6 , 10^5 e 10^4 ascósporos/mL. Gotas destas suspensões foram colocadas separadamente em lâminas contidas em aparato como o descrito em 1c e mantidas a 25 °C e sob fotoperíodo de 12 h. Este ensaio foi realizado em DIC com quatro repetições (1 placa/repetição). Após 6, 12, 24 e 48 h avaliou-se o percentual de ascósporos germinados conforme o descrito anteriormente.

2.6) Suspensão de ascósporos em óleo mineral

Foram realizados três ensaios envolvendo: a) obtenção de ascósporos por esmagamento de estromas conforme o descrito em 1a, substituindo-se a água por óleo mineral; b) borbulhamento de estromas como em 1b, mas em óleo mineral e não em água; c) ejeção natural de ascósporo como em 1c, mas de duas formas, sobre lâmina sobre a qual previamente havia sido espalhado óleo mineral e d) idem, mas com a ejeção de ascósporos orientada para o fundo da placa contendo BDA sobre o qual havia sido previamente espalhado óleo mineral. Após 48 h realizou-se a contagem do percentual de ascósporos germinados conforme descrito nos ensaios anteriores.

2.7) Germinação de ascósporos sob diferentes níveis de atividade de água

Para obtenção dos níveis de atividade de água, utilizou-se diferentes concentrações de manitol adicionado ao meio sólido e ao líquido usado para a extração dos ascósporos. Para se determinar o potencial osmótico dos vários meios e soluções usadas neste ensaio, utilizou-se o Osmômetro “Osmette Precision Osmometer”, do UCP - Unidade de Crescimento de Plantas, Departamento de Biologia Vegetal/UFV.

2.7.1) Em meio sólido

Foram preparadas placas contendo 30 mL de BDA cada e suplementadas com as seguintes quantidades de manitol: 3 mg/mL; 10 mg/mL; 17 mg/mL; 23 mg/mL; 30 mg/mL e 37 mg/mL, o que corresponde aos respectivos potenciais osmóticos 0,0735; 0,1610; 0,2820; 0,3986; 0,5120 e 0,6010 mPa. Ascósporos foram obtidos conforme descrito em 1c, sendo fragmentos de folhas contendo estromas afixados ao interior de tampas de placas de Petri, mas a ejeção de ascósporos orientada para que houvesse deposição direta sobre o fundo das placas contendo BDA + manitol. A testemunha consistiu de um conjunto semelhante, mas com placas contendo BDA sem a adição do manitol. Após 24 h, as tampas em que foram fixados fragmentos de folha contendo estromas, foram substituídas por tampas estéreis. Decorridos 6, 12, 24 e 48 h, as placas foram examinadas sob microscópio de luz (objetiva de 20 ×) para a contagem do percentual de ascósporos germinados conforme já descrito. O ensaio foi montado em DIC com quatro repetições (1 placa/repetição).

2.7.2) Em suspensão

Procedimento equivalente ao descrito no item 2.6 foi realizado neste experimento, mas ao invés de óleo mineral os estromas foram suspensos em 8 beakers contendo 30 mL de água esterilizada suplementada com quantidades de manitol relativas aos potenciais osmóticos 0,044; 0,136; 0,243; 0,340; 0,461 e 0,589 mPa, um becker contendo água destilada (0 mpa) e outro com água MiliQ (0 mpa). Depois de um período de 3-4 h de agitação, a suspensão foi filtrada em gaze e posteriormente centrifugada para concentrar os ascósporos. Gotas da suspensão foram colocadas sobre lâminas deixadas dentro de um aparato como o descrito no item 1c e mantido a 25 °C e sob fotoperíodo de 12 h. Como testemunha foi utilizada a suspensão obtida conforme descrito em 1b, ou seja, sem adição de manitol. Após 12, 24 e 48 h, as lâminas foram observadas ao microscópio de luz (400 ×) para determinar o percentual de ascósporos germinados conforme descrito anteriormente.

3) Preservação de inóculo de *C. miconiae* em folhas de *M. calvescens*

Para cada método de preservação foram utilizadas três folhas contendo estromas maduros e sádios do fungo. Foram comparados os seguintes métodos de preservação: a) herborização por 2, 4 e 8 dias; b) manutenção em geladeira a 10 °C por 2, 4 ou 8 dias; c) herborização por 2, 4 e 8 dias seguida de transferência, após cada período para uma geladeira ajustada para 10 °C por 2 dias; d) manutenção em geladeira a 10 °C por 2, 4 e 8 dias e após cada período, imediata herborização das amostras por 2 dias. e) *in vivo* (o pecíolo de folhas doentes imerso em cilindros de vidro de 10 cm de altura e 2 cm diam, contendo meios agarizados) sacarose – (20 g de sacarose, 100 mL de água de coco, 8 g de agar), as folhas com o pecíolo imerso no meio foram colocadas dentro de bandejas limpas e no interior desta deixou-se um chumaço de algodão umedecido, a bandeja foi coberta por um saco plástico e mantida em uma sala com temperatura ajustada para 25 °C; f) *in vivo* – idem meio GB 5 (20g de sacarose, 2g de carvão ativado, 100 mL de água de coco, 8g de agar, 0,25g/L de K₂PO₄); g) *in vivo* – idem meio de Petters (20g de sacarose, 2g de carvão ativado, 100 mL de água de coco, 8g de agar, 2g do fertilizante Petters). Folhas recém colhidas foram usadas como testemunha. Para interpretação dos resultados foram considerados 0 (plantas recém colhidas), 2, 4 e 8 dias. Após cada tratamento, os estromas de *C. miconiae* foram selecionados e destacados para extração de ascósporos como descrito em 1b. O ensaio foi montado em DIC com três repetições (1folha/1placa/repetição). Decorridas 48 h foi efetuada a avaliação do percentual de ascósporos germinados.

4) Interação *Coccidiella miconiae* – *Miconia calvescens*

4.1) Estudo no campo para determinação do estágio de desenvolvimento das folhas de *M. calvescens* apropriado para infecção por *C. miconiae*

Efetuiu-se o acompanhamento da doença em condições de campo, no período de Setembro/ 2003 a Agosto/ 2004, em área de mata secundária, onde as plantas estão consistentemente infectadas por *C. miconiae* (Cristais, município de Viçosa, MG). Para tal, foram selecionadas 10 plantas que tiveram suas brotações terminais marcadas, num total de 100. Estabeleceu-se um ranqueamento arbitrário de estádios de desenvolvimento das folhas (Fig. 2) e ao longo de um ano, foram feitas visitas semanais ao local. A cada visita realizou-se um sorteio ainda no laboratório que decidiria quais as folhas seriam

coletadas. As dez folhas destacadas foram avaliadas quanto à presença de estruturas de *C. miconiae* nos seguintes estádios: a) lesão sem estroma, b) lesão de pústula amarela com estroma imaturo, c) lesão com estroma espermogonial, d) lesão com estroma conidial, e) lesão com estroma peritecial e f) lesão com estroma senescente. O estágio de desenvolvimento das folhas e o número total por folha de cada tipo de manifestação foram registrados. A vinculação entre a ocorrência dos estádios do fungo, o tamanho das folhas, o estágio fenológico da planta, foram observadas para um exercício de inferência da relação entre o ciclo de vida do fungo e o desenvolvimento das folhas e da fenologia da planta.

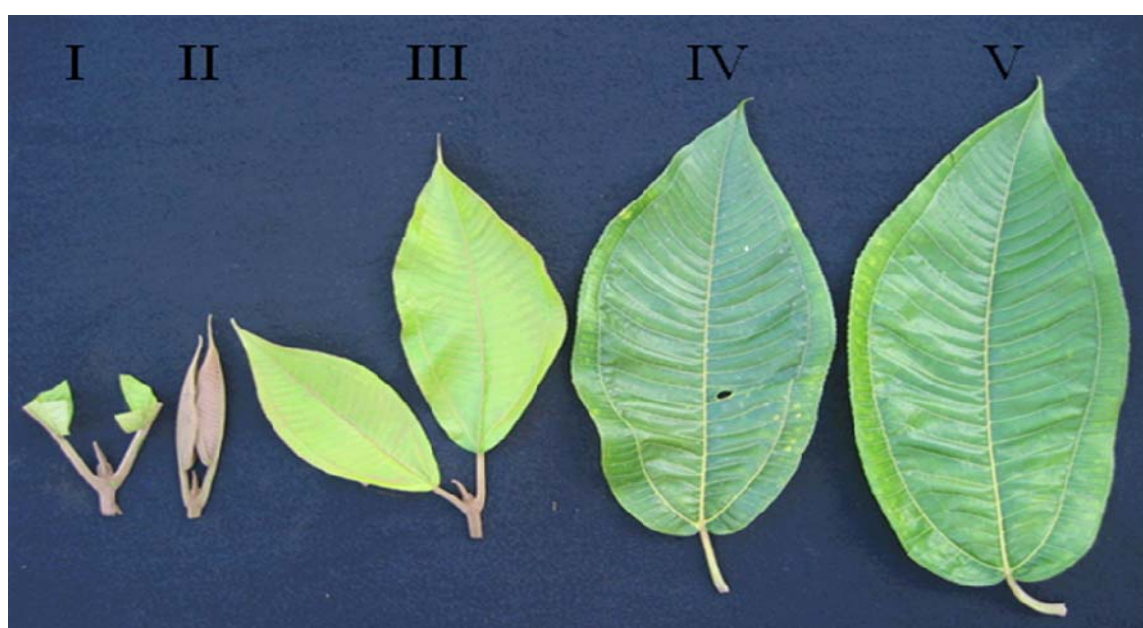


Figura 2: Categorias eleitas para estádios de desenvolvimento de folhas de *Miconia calvescens*. I- Brotação; II- Botão aberto, folhas visíveis, mas em ângulo agudo, pequena, com pigmentação rosada, na posição terminal do ramo; III- Folha jovem, com até metade do tamanho final de uma folha madura, com coloração verde claro, em posição sub-terminal; IV- Folha submatura, verde escuro e ainda não completamente expandida, posição mediana no ramo; V- Folha madura, completamente expandida, verde escuro, localizada na posição basal do ramo.

4.2) Observação de eventos posteriores à deposição de ascósporos de *Coccidiella miconiae* sobre folhas de *Miconia calvenscens* em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Plantas de *M. calvenscens* sadias dos biotipos do Brasil e do Havaí (como as citadas no item anterior) foram inoculadas com *C. miconiae*. O fungo foi obtido de folhas doentes, coletado em Viçosa-MG. Dois métodos de inoculação foram utilizados: ejeção de ascósporos e pincelamento de suspensão de ascósporos. Duas plantas de cada biotipo foram inoculadas por pincelamento e ejeção. Para o pincelamento, uma suspensão de ascósporos de *C. miconiae*, obtida como descrito em 1a foi pincelada na superfície abaxial e adaxial de todas as folhas de cada uma das plantas. Para a ejeção, um procedimento modificado a partir do descrito em 1c foi utilizado. Fragmentos de folhas de *M. calvenscens* contendo estruturas de *C. miconiae* foram fixados no interior de tampas de placas de Petri, as quais foram colocadas sobre as folhas de cada planta a ser inoculada, de maneira que os estromas ficassem suspensos e com os ostíolos voltados para a face abaxial e adaxial das folhas. Para inoculação, da superfície abaxial foi necessário virar parte do limbo foliar das folhas selecionadas e mantê-las invertidas e presas sobre a superfície de uma bancada com fita adesiva durante o período de inoculação, colocando-se sobre partes selecionadas destas folhas a tampa de placas de Petri. Cada conjunto foi envolto num saco plástico fechado e colocou-se, internamente a este, envolvendo o pecíolo desta folhas um chumaço de algodão umedecido para garantir condições de umidade elevada. Estas plantas foram mantidas em temperatura ambiente por 48 h. Após este intervalo, amostras foram fixadas e examinadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura para elucidação de detalhes ultra-estruturais da interação *C. miconiae* – *M. calvenscens*. após a deposição dos ascósporos (germinação, formação de tubo germinativo, possível formação de apressório e penetração). O procedimento foi realizado de acordo com o protocolo usado no Núcleo de Microscopia Eletrônica e Microanálise do CCB/Universidade Federal de Viçosa. Obedecidas as seguintes etapas: 1) pré-fixação em aldeído 5 % + tampão fosfato 0,1 M (1:1) durante 1 h em temperatura ambiente; 2) lavagem em tampão fosfato 0,05 M por 6 vezes, sendo 10 min cada; 3) pós-fixação em O_3O_4 1 % preparado em tampão fosfato 0,1 M (1:1), mantendo-se na geladeira a 4–8 °C, durante 4 h; 4) repetição do passo 2; 5) Desidratação em gradiente crescente de etanol: 30 %, 50 %, 70 %, 80 % e 95 % por 10 min cada, em temperatura

ambiente; 6) Secagem no ponto crítico (CPD), Bal – Tec modelo 030; 7) Metalização (Balzers modelo FDU 010).

RESULTADOS

1) Extração de ascósporos de *Coccidiella miconiae*

Todas as três metodologias testadas obtiveram ascósporos em quantidade adequada (superior a 10^5 ascósporos/mL), para a realização dos demais estudos, no entanto, o método menos trabalhoso foi o que envolveu a agitação de estromas em suspensão por borbulhamento.

2) Determinação de condições ideais para a germinação de ascósporos de *Coccidiella miconiae*

2.1) Incubação de ascósporos sob diferentes condições de temperatura

Para ascósporos obtidos por esmagamento de estromas (1a) não se verificou germinação de ascósporos em nenhuma das três vezes em que se repetiu o ensaio. Para ascósporos obtidos com ejeção natural (1c) foi observado um pequeno percentual (2 %) de ascósporos germinados após 48 h de incubação. Para ascósporos obtidos por agitação por borbulhamento (1b) notou-se que, após 24 h de incubação, já havia alguns (1%) de ascósporos germinados em amostras mantidas a 25 °C, mas nas demais temperaturas estudadas não havia ainda germinação. Observou-se uma tendência de que os níveis mais elevados de até 28,25 % de germinação (Fig. 3) ocorressem mais tarde para as amostras incubadas por 48 h a 25 °C.

2.2) Exposição de esporos a diferentes regimes de luz

Os níveis mais elevados de germinação de ascósporos foram obtidos para os tratamentos envolvendo fotoperíodo de 12 h (28 %), independentemente de se havia exposição inicial a 12 h de luz ou de escuridão (Fig. 3). Por outro lado, não houve germinação de ascósporos para os demais tratamentos.

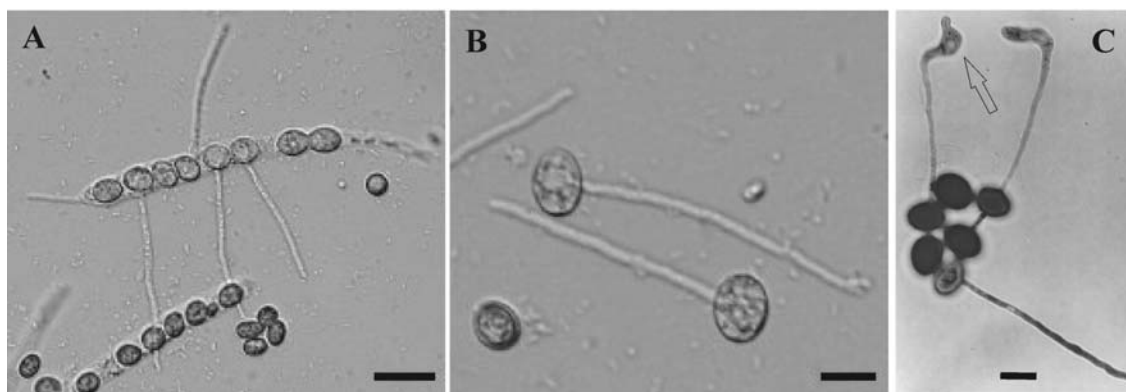


Figura 3. Germinação de ascósporos incubados a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 h. Note em (A) a ocorrência de germinação de ascósporos ainda envoltos pela parede da asca com perfuração desta pelos tubos germinativos e em (C) após emitir o tubo germinativo, há formação do apressório, mostrado pela seta. Barras = 10μm.

2.3) Lavagem sucessiva de ascósporos

Neste ensaio não foi verificada a germinação de ascósporos, em nenhum dos tratamentos, inclusive na testemunha.

2.4) Suspensão de ascósporos em lavado de folhas de *Miconia calvenscens*

Nenhuma germinação foi observada em ascósporos expostos ao lavado de folhas após o período pré-estabelecido de 6, 12, 24 e 48 h e nem na testemunha.

2.5) Diluição da suspensão de ascósporos

Nenhum ascósporo germinado foi observado após os períodos de 6, 12, 24 e 48 h para qualquer das concentrações de ascósporos testadas.

2.6) Suspensão de ascósporos em óleo mineral

A metodologia de extração de ascósporos por borbulhamento foi ineficiente quando os estromas foram suspensos em óleo mineral. Não houve liberação de ascósporos nestes tratamentos. Para os demais, independentemente da forma como os ascósporos foram obtidos não foi observada germinação de ascósporos em qualquer dos

tratamentos. O experimento foi repetido e novamente não foi observada a germinação dos ascósporos.

2.7) Germinação de ascósporos sob diferentes níveis de atividade de água

Para ascósporos depositados em meio agarizado, independentemente dos níveis de atividade de água testados, ou seja, das proporções de manitol presentes, não se verificou germinação de ascósporos para quaisquer tratamentos. Por outro lado, para ascósporos em suspensão aquosa, observou-se germinação em diversos tratamentos, como em água destilada esterilizada e nas suspensões contendo as seguintes quantidades de manitol/mL de água destilada, 10 mg/mL, 17 mg/mL e 23 mg/mL. Não houve germinação quando utilizada água MiliQ e 3 mg/mL; 30 mg/mL e 37 mg/mL, embora para todos os níveis do manitol os efeitos tenham sido semelhantes quanto à germinação de ascósporos de *C. miconiae*, para a concentração de 10 mg/mL, equivalente a 0,136 mPa foi ligeiramente mais eficiente, mas o maior valor médio de germinação de ascósporos ocorreu para o tratamento onde se utilizou água destilada esterilizada sem a adição de manitol (Fig. 4).

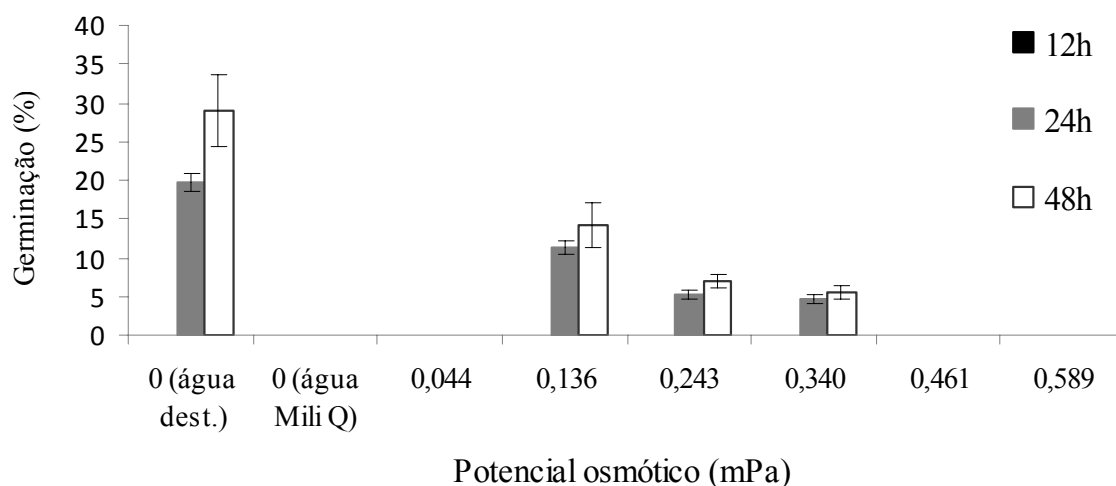


Figura 4. Porcentagem de germinação de ascósporos de *C. miconiae*, observada após suspensão em água destilada (0 mpa), água MiliQ (0 mpa) e diferentes concentrações de manitol, que são: 3 mg/mL; 10 mg/mL; 17 mg/mL; 23 mg/mL; 30 mg/mL e 37 mg/mL, o que corresponde a 0,044; 0,136; 0,243; 0,340; 0,461 e 0,589 mPa, respectivamente, seguidos por incubação a 25 °C por 12, 24 ou 48 h.

3) Preservação de inóculo de *C. miconiae* em folhas de *M. calvescens*.

Dentre os diversos tratamentos, aquele envolvendo a manutenção das folhas com o pecíolo imerso em meio agarizado por oito dias não resistiram e ficaram ressecadas, não sendo possível avaliar a viabilidade dos ascósporos em seus estromas após este período. Os resultados indicaram que dentre os métodos de preservação testados para folhas de *M. calvescens* infectadas por *C. miconiae*, o melhor foi o envolvendo a desidratação de folhas por herborização. Nessa condição, o fungo se manteve por dois dias com o nível de germinação ainda razoável (13%) quando comparado à testemunha (23,5%). No tratamento envolvendo a manutenção de folhas com o pecíolo imerso em meio agarizado contendo sacarose, por dois dias obteve-se alguma germinação dos ascósporos (4,25%), mas quando comparados com a testemunha, o percentual de ascósporos germinados foi muito baixo. Nos demais tratamentos não foram observados ascósporos germinados.

4) Interação *Coccidiella miconiae* – *Miconia calvescens*

4.1) Estudo no campo para determinação do estágio de desenvolvimento das folhas de *M. calvescens* apropriado para infecção por *C. miconiae*

A pústula amarela ocorreu ao longo de todo o ano, na localidade onde o estudo foi efetuado de Setembro/ 2003 a Agosto/ 2004. Até a quinta semana, cerca de 40 dias, as folhas ainda estavam jovens, estádios I e II. Na sexta semana, dentre as 10 folhas destacadas, duas delas apresentavam sintomas da doença, na forma de pequenas pontuações amarelas, elevadas, na superfície adaxial das folhas. Na próxima semana, foram observados os primeiros sinais do fungo, presente nas folhas de estádios III, IV e V, o fungo se apresentava em fase espermogonial. Nestes três últimos estádios fenológicos da planta-desenvolvimento da folha, podem ser encontrados todas as fases do ciclo de vida do fungo.

4.2) Observação de eventos posteriores à deposição de ascósporos de *Coccidiella miconiae* sobre folhas de *Miconia calvescens* em MEV

O exame das amostras inoculadas com ascósporos obtidos por esmagamento de estromas em MEV confirmou a inexistência de germinação para este material,

confirmando mais uma vez que este procedimento, embora tenha sido utilizado em muitos testes é desfavorável para a germinação dos ascósporos. Quando se utilizou a ejeção natural de ascósporos os resultados foram superiores e observou-se uma proporção variável de germinação que ocorreu em frequência maior para as inoculações feitas em plantas do biótipo brasileiro (alcançando até 55 % para inoculações na superfície abaxial e período de câmara úmida de 48 h) (Fig. 5) e inferiores para o biótipo do Havaí (atingindo um máximo de 3% para inoculações na superfície abaxial e por um período de incubação de 48 h). Em inoculações feitas na superfície adaxial das folhas também se observou germinação embora numa frequência menor (máximo de 33% de germinação de ascósporos para plantas do biótipo brasileiro deixadas em câmara úmida por 48 h). A aparente incompatibilidade entre os isolados de *C. miconiae* do Brasil e o biótipo de *M. calvenscens* presente no Havaí já era sugerida por trabalhos anteriores (Seixas, 2002) e por resultados e observações efetuadas no decorrer do presente trabalho. Os estudos sobre a germinação observados sob MEV confirmam isto ao revelarem uma baixa proporção de ascósporos germinados sobre folhas de plantas do biótipo do Havaí, a porcentagem de ascósporos germinados foi bem menor, conforme já descrito acima.

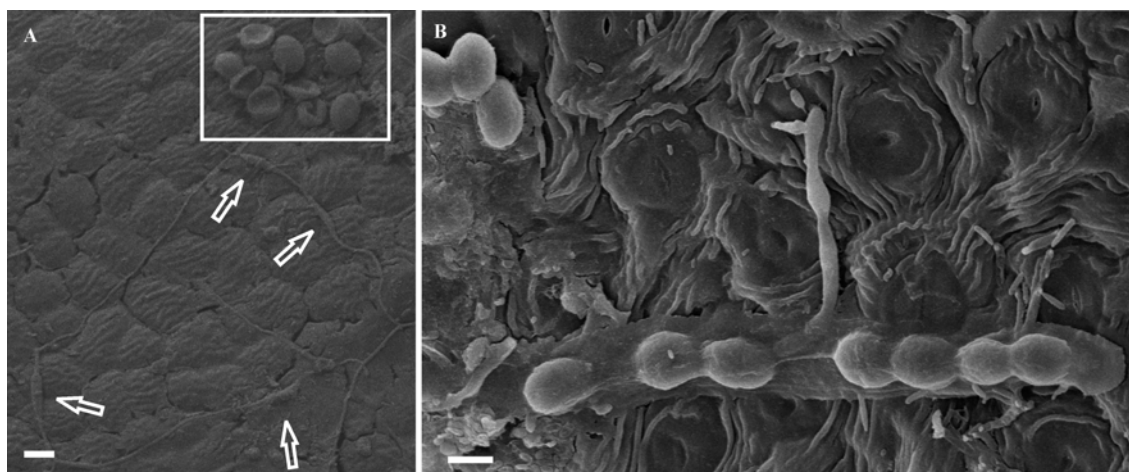


Figura 5. Germinação de ascósporo de *C. miconiae* em folhas de *M. calvenscens* observados sob MEV: A – Em detalhe, um grupo de ascósporos de *C.miconiae*. As setas brancas estão indicando os apressórios; B - Um único ascósporo ainda no interior da asca germinando e formando tubo germinativo que perfurou a membrana da asca (vista geral). Barras = 5 μ m

DISCUSSÃO

Coccodiella (Ascomycota: Phyllachoraceae) é um gênero pouco conhecido de fungo, predominantemente tropical, e inclui diversas espécies que atacam membros da família Melastomataceae. Embora Katumoto (1968) tenha publicado uma revisão deste gênero, aspectos sobre a taxonomia dos membros deste gênero permanecem ainda nebulosos, necessitando de um reexame do material da espécie tipo (*Coccodiella arundinariae* Hara), isso porque em sua monografia, propôs numerosas recombinações, sem ao menos ter examinado o material tipo referente a estes nomes. Naturalmente, que para um grupo tão pouco estudado de fungos há uma carência generalizada de informação sobre aspectos básicos de sua biologia como, por exemplo, as condições adequadas para a obtenção de inóculo e a sua manipulação para a simples reprodução da doença. Mesmo para o maior gênero da família (*Phyllachora*) há pouca informação publicada além de trabalhos versando sobre taxonomia. Uma das únicas espécies do gênero que foi objeto de pesquisas sobre a biologia, patologia e epidemiologia foi *Phyllachora maydis* Maubl. que é patógeno da cultura do milho. Para esta espécie há estudos como os de Dittrich *et al.* (1991) que investigou aspectos como a ejeção de ascósporos de frutificações deste fungo bem como a germinação dos ascósporos e a formação de apressório. Tendo em vista esse fato, vale ressaltar a importância deste trabalho de natureza exploratória cujo objetivo é a obtenção de informações úteis para um conhecimento básico sobre o fungo *C. miconiae*, já que na literatura não foram encontrados trabalhos que descrevam métodos já testados em investigações sobre fungos deste gênero. O conhecimento dos fatores epidemiológicos requeridos pelos patógenos desempenha papel-chave na determinação do sucesso de agentes de controle biológico (Mello *et al.*, 2000).

Coccodiella miconiae foi reconhecido como potencial agente de controle biológico para *M. calvenscens* por Barreto *et al.* (2000), mas estudos mais aprofundados sobre o potencial efetivo deste fungo foram frustrados pelas dificuldades em se manipular este fungo Seixas (2002). No presente trabalho uma investigação ampla visando superar estas dificuldades e permitir uma compreensão mais completa sobre o fungo gerou um conjunto de informações cruciais para estudos posteriores e que pode ser resumido nos pontos que se seguem:

1. Como *C. miconiae* é um fungo biotrófico, a opção de produção de inóculo pelo cultivo *in vitro* é inviável. Seus ascósporos são a única opção de inóculo disponível para investigações fitopatológicas. A melhor metodologia para a obtenção destes ascósporos para utilização em qualquer trabalho é a remoção de estromas maduros e sadios de plantas infectadas, sua suspensão em água esterilizada sob agitação por borbulhamento por 3 a 4 h, seguida de filtração/centrifugação para obtenção da suspensão de ascósporos. Contrariamente ao suposto durante parte dos trabalhos a exposição de ascósporos a água livre não é deletéria para a viabilidade dos ascósporos e nem inibe a sua germinação. Outros métodos testados foram ineficientes ou prejudiciais aos ascósporos.

2. A etapa de seleção dos estromas a serem utilizados para a extração, pelo que se observou, deve ser feita com grande cuidado, pois conforme discutido por Seixas (2002) os estromas de *C. miconiae* sustentam uma micobiota micoparasita bastante variada e, em determinadas épocas epidemias severas de alguns destes, particularmente *Sagenomella alba* W. Gams & B.E. Söderstr., destroem a maioria dos estromas. A introdução de um micoparasita como este no Havaí, Polinésia Francesa ou outra área poderia por à perder o potencial que *C. miconiae* tem como agente de biocontrole, como alertado por outros pesquisadores desta área (Hasan, 1980; Watson, 1991).

3. A incubação pós ejeção de ascósporos a 25 °C foi apropriada para a germinação de ascósporos. Ascósporos incubados em temperaturas superiores (30 °C ou mais) e inferiores (20 °C) não germinaram. Novos ensaios explorando o intervalo 20-30 °C seriam necessários para uma informação mais precisa sobre a faixa de tolerância de temperatura para germinação para ascósporos de *C. miconiae* da população de Viçosa.

4. Para a sua germinação os ascósporos requerem exposição à alternância de luz, sendo que um fotoperíodo de 12 h, independentemente de ser iniciado com o período de luz ou de escuridão, foi adequado para a germinação. Estudos realizados por Dittrich *et al.* (1991) mostraram que para *Phyllachora maydis* a germinação também ocorreu quando os ascósporos eram incubados sob fotoperíodo de 12 h.

5. Investigou-se a possibilidade de existir alguma substância auto-inibidora nos corpos de frutificação, nas ascas ou nos ascósporos de *C. miconiae* e que pudesse estar interferindo com a germinação dos ascósporos. Tentou-se, então aplicar-se um processo de lavagem para a remoção de tal substância caso ela estivesse presente na suspensão obtida pelo processo 1a (esmagamento de estromas). Não houve evidência da existência de substância hidrossolúvel inibidora da germinação envolvendo os ascósporos, pois a

lavagem não foi necessária para que percentuais elevados de germinação fossem obtidos nas etapas finais deste trabalho. Por outro lado, é provável que o esmagamento de estromas libere alguma substância muito prejudicial aos ascósporos posto que, estes não germinaram quando obtidos com este processo mesmo quando submetidos à lavagem sucessiva, ou ainda que, as repetidas lavagens foram prejudiciais ao processo germinativo.

6. Investigou-se a possibilidade de que ascósporos de *C. miconiae* tivessem a necessidade de algum tipo de estímulo químico oferecido por substância presente nos exsudatos de folhas de *M. calvescens* para germinarem. Foi comprovado que não é necessária a presença de substância produzida pela planta hospedeira para que os ascósporos germinem. Se existir este efeito, isto ainda precisa ser confirmado em um novo teste envolvendo a suspensão de ascósporos em um lavado obtido de folhas, desta feita evitando-se o processo testado que envolveu o esmagamento de estromas que, como se discutiu, parece prejudicar a germinação dos ascósporos. Por outro lado observaram-se níveis elevados de germinação de ascósporos (embora de forma inconsistente) suspensos em água e colocados simplesmente sobre lâminas de vidro.

7. A adição de manitol modifica a atividade de água e o potencial osmótico do meio. Assim, a absorção de água pelo ascósporo é menor com concentrações crescentes de manitol. Pretendeu-se encontrar uma concentração de manitol que resultasse num nível de atividade de água não prejudicial à germinação dos ascósporos. A hipótese de que haveria um distúrbio osmótico que afetaria a viabilidade de ascósporos expostos à água livre, justificando o insucesso na manipulação do fungo neste trabalho e no de Seixas (2002) foi rejeitada pelos resultados do ensaio visando testar o efeito de diversos níveis de atividade de água. Surpreendentemente foi justamente para os ascósporos suspensos em água esterilizada que obtiveram os melhores resultados em termos de percentuais de germinação. Curiosamente, havia fortes indícios em favor desta hipótese, mas a partir de sua rejeição e da adoção do processo de obtenção de inóculo de *C. miconiae* pelo método de agitação de estromas em suspensão aquosa por borbulhamento como método padrão o trabalho passou a avançar de forma consistente.

8. Demonstrou-se sob condições controladas pela primeira vez a patogenicidade do fungo com aplicações de suspensões aquosas de ascósporos. A razão pela qual as tentativas anteriores haviam falhado permanece como enigmática.

9. *Coccidiella miconiae* é um fungo com estruturas infectivas muito frágeis. Na

literatura, há numerosas descrições de procedimentos adequados para a preservação de diferentes gêneros e espécies de fungos, tais como as contidas nas publicações de Smith & Onions (1994), Dhingra & Sinclair (1995) e Kirsop & Snell (1984). Os métodos descritos por estes e outros autores visam em geral a preservação a longo prazo da viabilidade dos fungos e incluem métodos para a preservação de fungos biotróficos, como *C. miconiae*. Infelizmente estes métodos para fungos biotróficos envolvem em geral a manutenção de amostras em temperaturas extremamente baixas com sua manutenção em ultra-freezer ou mergulhadas em nitrogênio líquido. Portanto, são métodos pouco práticos para o transporte de amostras de um agente de controle biológico para a introdução em região distante do ponto de coleta. Neste trabalho deu-se seqüência aos ensaios efetuados por Seixas (2002) e pretendeu-se utilizar a nova informação gerada sobre o processo de germinação de ascósporos de *C. miconiae* para melhor avaliar os resultados finais obtidos com cada método de preservação. Em herborização por dois dias foram observados 13% de ascósporos germinados, quantidade ainda razoável quando comparada a 23,5% da testemunha. Nos demais tratamentos não se verificaram ascósporos germinados. Em estudos anteriores, realizados por Seixas (2002), estromas mantidos a 5 °C por dois dias, o nível de germinação foi maior do que o obtido para a testemunha. No presente trabalho, mesmo depois de quatro dias de incubação, o percentual de germinação foi pequeno para estromas submetidos a 10 °C. Estudos adicionais devem ser realizados com manutenção sob temperaturas mais baixas, como as testadas por Seixas (2002) com e sem combinação com a herborização posterior ou prévia. Há ainda outras possibilidades que poderiam ser investigadas para a sua preservação como as envolvendo a conservação dos ascósporos após a sua extração. O ideal para preservação do fungo é sua manutenção em plantas vivas e, no estado atual da arte, o que se pode recomendar é que se mantenha o procedimento adotado até o momento, que é a coleta de folhas infectadas no campo na véspera do embarque para o destino final e o transporte das amostras frescas na bagagem de mão do coletor utilizando-se o itinerário e meio de transporte mais rápido possível.

10. *Coccidiella miconiae* é uma espécie que inclui populações muito especializadas em seus hospedeiros. Os isolados de *C. miconiae* estudados, originários do Brasil são específicos para os biótipos brasileiros de *M. calvescens* conforme demonstraram os trabalhos de Seixas (2002) com o uso de plantas sentinela e as inoculações em condições controladas efetuadas no âmbito deste trabalho. No campo,

verificou-se que em uma mesma área a intensidade da doença não é a mesma para todas as plantas. Algumas são atingidas com mais intensidade que outras, havendo ainda aquelas que não apresentavam sintomas da pústula amarela. Isso é normal para uma doença de *M. calvescens*, planta selvagem ocorrendo em seu centro de origem, e que se reproduz por fecundação cruzada e que provavelmente apresenta elevada variabilidade genética. A busca por isolados de *C. miconiae* adequados para o controle biológico clássico de *M. calvescens* deve se concentrar em áreas de ocorrência de populações de *M. calvescens* com morfologia mais próxima da do biótipo presente no Havaí (Equador, Costa Rica e México). Testes efetuados em laboratório de quarentena no Havaí, com material importado da Costa Rica e a colocação de plantas-sentinela em áreas de ocorrência do fungo na Costa Rica já demonstraram a susceptibilidade do biótipo presente no Havaí a estas populações do fungo (dados não publicados).

11. O conhecimento sobre o estágio fenológico da planta mais suscetível para o patógeno é importante para o sucesso no controle biológico (Watson *et al.*, 1991). A pústula amarela ocorre durante todo o ano no campo. Sintomas e sinais só são observados em folhas classificadas como III (folha jovem com coloração verde claro e tamanho cerca da metade do tamanho final) ou mais velhas. A partir deste estágio são observados estromas imaturos, jovens (espermogoniais) e maduros (periteciais) nas folhas, indicando que novos pontos de infecção surgem mesmo em folhas maduras.

13. Não se observou em Viçosa nenhuma ocorrência de estromas conidiomáticos. A observação da ocorrência destes foi apenas ocasional durante os anos de levantamento que antecederam este trabalho e parece que populações localizadas do fungo têm a capacidade de produzir conídios, como a população que ocorre na localidade de Balsa Velha, na empresa CAF em Dionísio MG, onde a sua ocorrência foi comum ao longo de todo o ano em estudo anterior (Seixas, 2002).

14. A infecção, conforme observado em MEV se dá pelos estômatos e a germinação é mais abundante na superfície abaxial das folhas, o que é coerente com o posicionamento dos estômatos nas folhas de *M. calvescens*. Observou-se em MEV e em microscopia de luz que o tubo germinativo, por vezes, após ser emitido pelo ascósporo, passava através da parede das ascas, crescendo sempre em 90°. Em estudos realizados com *Phyllachora* spp., observou-se também que os ascósporos germinavam mesmo estando ainda dentro das ascas (Orton, 1956; Parbery, 1996). Foi observada a formação de apressório após 48 h de avaliação, tanto sob microscopia de luz quanto em MEV. Parbery (1963) observou este mesmo fato em espécies de *Phyllachora* associadas a

gramíneas. E mais tarde, Ditrich *et al.* (1991) verificou para *P. maydis*.

A série de informações geradas no presente trabalho e enumeradas acima abre novas perspectivas para a realização de investigações complementares sobre *C. miconiae* e torna mais palpável o seu uso efetivo para o controle biológico clássico de *M. calvescens*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CLAUSING, G. & RENNER, S.S. Molecular phylogenetics of Melastomataceae and Memecylaceae: implications for character evolution. American Journal of Botany 88: 486-498. 2001.

DHINGRA, O.D. & SINCLAIR, J.B. Basic plant pathology methods. CRC Press, Boca Raton. 1995.

DITTRICH, U., HOCK, J.K. & RENFRO, B.L. Germination of *Phyllachora maydis* ascospores and conidia of *Monographella maydis*. Cryptogamic Botany 2/3: 214-218. 1991.

GOLDENBERG, R. O gênero *Miconia* (Melastomataceae) no Estado do Paraná, Brasil. Acta bot. bras. 18(4): 927-947. 2004.

HARLEY, K.L.S. & FORNO, I.W. Biological control of weeds, a handbook for practitioners and students. Melbourne: Inkata Press, 1992.

HASAN, S. Plant pathogens and biological control of weeds. Plant Pathol. 59: 349-356. 1980.

KATUMOTO, K. On the genus *Coccodiella* Hara. Journ. Jap. Bot. 43 (9): 277-283. 1968.

KILLGORE, E.M., SUGIYAMA, L.S. & BARRETO, R.W. Prospective Biological Control of *Miconia calvenscens* In Hawai'i With A Non-Indigenous Fungus *Colletotrichum Gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.. f.sp. *Miconiae*. Proceedings of the First Regional Conference on Miconia Control. 1997.

KIRSOP, B.E.& SNELL, J.J. (Ed.). Maintenance of microorganism: a manual of laboratory methods. London: Academic Press. 1984.

LOOPE, L.L. *Miconia calvenscens* DC. HNIS Report for *Miconia calvenscens*. A product of the Hawaiian Ecosystems at Risk Project. 1997.

MELLO, S.C.M., ÁVILA, Z.R., FONTES, E.M.G., RIBEIRO, Z.M.A. & PAIS, J.S.O. Processo de produção do fungo *Alternaria cassiae* para biocontrole de fedegoso (*Senna obtusifolia*). Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa, 18. 2000.

MEYER, J.Y. Observations on the Reproductive Biology of *Miconia calvenscens* DC (Melastomataceae), an Alien Invasive Tree on the Island of Tahiti (South Pacific Ocean). 1998.

MEYER J.Y., MALET, J.P. Study and management of the alien invasive tree *Miconia calvenscens* DC. (Melastomataceae) in the islands of Raiatea and Tahaa (Society Islands, French Polynesia). 1997.

MEYER, J. Y.; TAPUTUARAI, R. & KILLGORE, E. Dissemination and impacts of the fungal pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *miconiae* (Deuteromycetinae) on the invasive alien tree *Miconia calvenscens* (Melastomataceae) in the rainforests of Tahiti (French Polynesia, South Pacific). XII International symposium on biological control of weeds. La Grande Motte, France. 2007.

ORTON, C.R. The morphology and life history of *Phyllachora punctum*. Phytopathology 46 (8): 441-444. 1956.

PARBERY, D. G. Studies on graminicolous species of *Phyllachora* Nke. in Fekl. V. A taxonomic monograph. Australian Journal of Botany 15(2) 271 – 375. 1963.

PARBERY, D. G. Trophism and the ecology of fungi associated with plants. Biol. Rev. 71:473–527. 1996.

SCHROEDER, D. Biological control of weeds. Recent advances in weed research, CAB Publication. 1983.

SEIXAS, C.D.S. Controle biológico de *Miconia calvenscens* DC (Melastomataceae) com fitopatógenos. Tese de doutorado em fitopatologia. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa. 2002.

SMITH, D. & ONIONS, A.H.S. The preservation and maintenance of living fungi. Surrey: Commonwealth Mycological Institute. 1994.

WATSON, A. K. The classical approach with plant pathogens: 3-23. In: D.O. TeBeest (ed.) Microbial Control of Weeds. New York: Chapman and Hall. 1991.

CONCLUSÕES GERAIS

- Durante levantamentos de fitopatógenos associados a *Miconia calvenscens* encontraram-se diversos fungos sendo que parte já havia sido examinada e descrita. As seguintes espécies representam adições a esta micobiota: *Hyalosphaera miconiae*, *Hyalosphaera* sp.nov., *Lembosia melastomatum*, *Microsphaeropsis clidemiae*, *Microsphaeropsis* sp. nov., *Myrothecium* sp. nov., *Phyllachora* sp. nov.

- As espécies reconhecidas como novas (*Hyalosphaera* sp.nov., *Microsphaeropsis* sp. nov., *Myrothecium* sp.nov e *Phyllachora* sp.nov). foram descritas para posterior publicação como novas taxa para a ciência e as demais representam relatos de novas associações com *M. calvescens*.
- Em plantas de *M. calvescens* do biótipo predominante no Brasil conseguiu-se a reprodução de sintomas e aparecimento de estruturas do fungo, mas nenhuma das metodologias utilizadas para inoculação de *Coccidiella miconiae* em plantas do biótipo do Havaí resultou na reprodução da doença.
- Demonstrou-se que ascósporos de *C. miconiae* podem ser extraídos de estromas por três maneiras, mas aquela que gera um maior número de ascósporos viáveis, é a que envolve a suspensão em água de estromas e sua agitação por borbulhamento.
- No laboratório, a germinação de ascósporos ocorreu apenas quando estes foram incubados a 25 °C e sob fotoperíodo de 12 h.
- Não se observou em Viçosa qualquer ocorrência de *Hemidotis* sp., fase anamorfica de *C. miconiae*.
- Acompanhou-se pela primeira vez a reprodução da pústula amarela em plantas sadias após a sua inoculação com *C. miconiae*. Isto se tornou possível graças à utilização de suspensões aquosas de ascósporos, obtidas da forma mencionada acima.
- A única estratégia viável continua sendo a manutenção do fungo em folhas frescas, sua coleta e transporte ou envio o mais rápido possível para a destinação final.