

KÁTIA DE LIMA NECHET

**AVALIAÇÃO DE *Alternaria euphorbiicola*,
Bipolaris euphorbiae e *Sphaceloma poinsettiae* COMO AGENTES DE
CONTROLE BIOLÓGICO DE *Euphorbia heterophylla***

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2002

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

N365a
2002

Nechet, Kátia de Lima, 1973-

Avaliação de *Alternaria euphorbiicola*, *Bipolaris euphorbiae* e *Sphaceloma poinsettiae* como agentes de controle biológico de *Euphorbia heterophylla* / Kátia de Lima Nechet. – Viçosa : UFV, 2002.

134p. : il.

Orientador: Robert Weingart Barreto

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Viçosa

1. Agentes no controle biológico de pragas. 2. *Euphorbia heterophylla* - Controle biológico. 3. Pesticidas naturais - Pesquisa. 4. Mico-herbicidas. 5. *Alternaria euphorbiicola*. 6. *Bipolaris euphorbiae*. 7. *Sphaceloma poinsettiae*. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 19.ed. 632.96

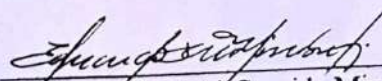
CDD 20.ed. 632.96

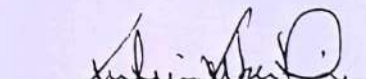
KÁTIA DE LIMA NECHET

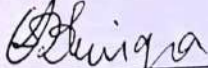
**AVALIAÇÃO DE *Alternaria euphorbiicola*, *Bipolaris euphorbiae*
E *Sphaceloma poinsettiae* COMO AGENTES DE CONTROLE
BIOLÓGICO DE *Euphorbia heterophylla***

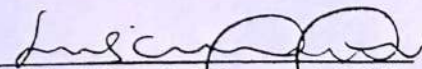
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

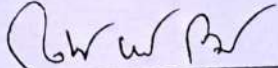
AFROVADA: 17 de dezembro de 2002


Prof. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti
(Conselheiro)


Prof. Antônio Alberto da Silva
(Conselheiro)


Prof. Onkar Dev Dhingra


Dr.^a Sueli Corrêa Marques de Mello


Prof. Robert Weingart Barreto
(Orientador)

Aos meus pais Dimitrie e Severina

aos meus irmãos Fausto e Karina

ao Bernardo por todos os momentos juntos,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder paciência, sabedoria e saúde, durante a realização do curso

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), especialmente ao Departamento de Fitopatologia pela oportunidade de realização deste curso

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela bolsa concedida durante boa parte do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq pelo apoio financeiro dado ao projeto

À Embrapa pela liberação para continuar a curso de doutorado

Ao Prof. Robert Weingart Barreto pela orientação, apoio e incentivo constante

Aos conselheiros Prof. Eduardo S.G. Mizubuti e Prof. Antônio Alberto da Silva pela atenção, disponibilidade, críticas e sugestões

Ao Prof. Onkar Dev. Dhingra pelo aprendizado constante

Ao Dr. José Tadashi Yorinori pelas doações e sugestões

Aos funcionários da Clínica de Doenças de Plantas, Célio, José Orlando e Osvaldo pela ajuda e amizade

À amiga Denise Castro Lustosa, pela ajuda incondicional durante a realização dos experimentos

Aos amigos Gisele, Maria Luiza, Claudia, Cláudio, José Luciano, Sérgio, Jânia Lilia, Raquel, Bárbara, Ana Beatriz, pela amizade e convívio harmonioso

Aos amigos de longe por sempre se fazerem presentes

AGRADEÇO

BIOGRAFIA

KÁTIA DE LIMA NECHET, filha de Dimitrie Nechet e Severina de Lima Nechet, nasceu em Belém-PA, em 11 de agosto de 1973.

Em 1996, graduou-se em Engenharia Agrônômica pela Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, PA.

Em 1999, concluiu o curso de Mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Lavras-MG.

No mesmo ano iniciou o curso de doutorado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa-MG.

Desde outubro de 2001 é pesquisadora da Embrapa Roraima, Boa Vista, RR.

ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	xi
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	7
<i>Bipolaris euphorbiae</i> como agente de controle biológico de <i>Euphorbia heterophylla</i> : Seleção de novos isolados, avaliação de especificidade e estudos complementares	11
Resumo	11
Abstract	11
Introdução	12
Material e Métodos	14
Resultados	19
Discussão	27
Referências Bibliográficas	29
Avaliação de <i>Sphaceloma poinsettiae</i> , agente causal da verrugose em <i>Euphorbia heterophylla</i> , como micoherbicida.....	32
Resumo	32
Abstract	32
Introdução	33
Material e Métodos	34

Resultados	40
Discussão	48
Referências Bibliográficas	52
<i>Alternaria euphorbiicola</i> como microherbicida para o controle de <i>Euphorbia heterophylla</i> : seleção de isolado, efeito da concentração de inóculo, idade da planta e período de molhamento	55
Resumo	55
Abstract	55
Introdução	56
Material e Métodos	58
Resultados	63
Discussão	70
Referências Bibliográficas	74
Especificidade, sobrevivência e disseminação de <i>Alternaria euphorbiicola</i> , agente de controle biológico do leiteiro (<i>Euphorbia heterophylla</i>)	77
Resumo	77
Abstract	77
Introdução	78
Material e Métodos	80
Resultados	83
Discussão	89
Referências Bibliográficas	92
Eficiência do fungo <i>Alternaria euphorbiicola</i> isoladamente ou em mistura com herbicidas no controle de populações de <i>Euphorbia heterophylla</i>	94
Resumo	94
Abstract	95
Introdução	95
Material e Métodos	97
Resultados	101
Discussão	106
Referências Bibliográficas	110

<i>Alternaria euphorbiicola</i> um potencial micoherbicida para <i>Euphorbia heterophylla</i> : temperatura para crescimento, produção massal e sobrevivência durante o armazenamento	113
Resumo	113
Abstract	113
Introdução	114
Material e Métodos	116
Resultados	120
Discussão	126
Referências Bibliográficas	129
CONCLUSÕES GERAIS	132

RESUMO

NECHET, Kátia de Lima, D.S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2002.
Avaliação de *Alternaria euphorbiicola*, *Bipolaris euphorbiae* e *Sphaceloma poinsettiae* como agentes de controle biológico de *Euphorbia heterophylla*.
Orientador: Robert Weingart Barreto. Conselheiros: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti e Antônio Alberto da Silva.

Euphorbia heterophylla L. é uma das principais invasoras da cultura da soja no Brasil. Essa cultura gera recursos de bilhões de dólares e o não controle ou controle ineficiente de *E. heterophylla* e outras invasoras é o principal fator que restringe a produção da cultura. Os herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) são os principais produtos utilizados para o controle de *E. heterophylla* na cultura da soja. No entanto, existem biótipos da planta resistentes a estes produtos, que têm dominado áreas cultivadas com soja, em função do uso contínuo desses herbicidas. Neste contexto, o uso de microherbicidas pode ser uma alternativa para o controle de *E. heterophylla*, tanto isoladamente como em mistura com produtos químicos. Assim, o objetivo geral deste trabalho foi selecionar dentre os fungos *Alternaria euphorbiicola* Simmons & Engelhart, *Sphaceloma poinsettiae* Jenkins & Ruehle e *Bipolaris euphorbiae* (Hansford) Muchovej, isolados promissores para o desenvolvimento de um microherbicida para o controle de *E. heterophylla*. Além da etapa inicial envolvendo a coleta e seleção de isolados destes fungos, investigaram-se a gama de hospedeiros de cada isolado; a epidemiologia das doenças em condições controladas; a eficácia de *A. euphorbiicola*, isoladamente ou em mistura com herbicidas no controle de *E. heterophylla*; a

viabilidade de conídios de *A. euphorbiicola* durante o armazenamento e a produção massal desse fungo. *B. euphorbiae* e *S. poinsettiae* são específicos à *E. heterophylla*, mas ainda apresentam limitações a serem superadas para que se viabilize o seu uso no biocontrole de *E. heterophylla*. O isolado selecionado de *B. euphorbiae* foi superior ao que vinha sendo utilizado em trabalhos anteriores feitos no Paraná. A suspensão de 10^7 conídios de *B. euphorbiae*/mL foi necessária para causar 80% de mortalidade nas plantas de uma população, enquanto a população destacada como resistente ao fungo não foi controlada eficientemente. A germinação dos conídios de *B. euphorbiae* não foi inibida pela mistura com herbicidas. Os fragmentos de micélio de *S. poinsettiae* foram usados como inóculo em substituição aos conídios e sua virulência foi maior quando produzidos em meio de cultura líquido de Batata Dextrose. Entretanto, a viabilidade desses propágulos durante o armazenamento, tanto em temperatura ambiente como a 4°C declinou rapidamente. Após 25 dias, o maior valor de ufc viáveis foi de apenas 60% quando o propágulo foi mantido em suspensão com água ou solução de sacarose 35% a 4°C. O isolado KLN06 de *A. euphorbiicola* destacou-se como potencial micoherbicida, sendo capaz de produzir elevada mortalidade em todas as populações de *E. heterophylla* testadas, inclusive na resistente aos herbicidas inibidores da ALS. Os resultados foram excelentes mesmo quando as plantas inoculadas estavam no estágio de seis a oitos folhas, em que aplicações de produtos químicos já não resultam em controle. A aplicação de uma suspensão de 2×10^5 conídios/mL e a exposição das plantas inoculadas a um período de seis horas de molhamento provido até 48 horas após a inoculação são condições suficientes para ocorrer a morte da parte aérea das plantas. O atraso no início do período de molhamento não diminuiu a eficiência do fungo, mas permitiu o aumento na porcentagem de rebrota das plantas. As plantas nos seis estádios fenológicos testados (de plântula a planta com frutos) foram suscetíveis ao patógeno. *A. euphorbiicola* sobreviveu em hastes de leiteiro colonizadas localizadas na superfície do solo seco e úmido e, quando enterradas, em solo seco. A transmissão da doença para as plântulas emergentes de *E. heterophylla* ocorreu quando as hastes colonizadas foram mantidas na superfície do solo úmido. No entanto, apenas a infecção natural de plântulas não foi suficiente para o controle de *E. heterophylla*. A aplicação de uma suspensão em concentração mais baixa (10^4 conídios/mL) não controlou as plantas previamente infectadas após a emergência próximo à fonte de inóculo (hastes de leiteiro colonizadas por *A. euphorbiicola*). A gama de hospedeiros de *A. euphorbiicola* foi restrita às euforbiáceas *Chamaesyce hirta*, *C. hysopifolia*, *E. heterophylla*, *E. cotinifolia*, *E. milii*,

E. pulcherrima e *E. tirucali*. O fungo causou doença em alta severidade em *C. hirta* e *E. hyssopifolia* e pode ser explorado também para o controle destas invasoras. As oito cultivares de soja testada foram imunes à *A. euphorbiicola*. O controle das populações de *E. heterophylla* resistentes e sensíveis aos herbicidas inibidores da enzima ALS obtido em função da aplicação de *A. euphorbiicola* foi equivalente aos dos herbicidas fomesafen, carfentrazone, atrazine e glyphosate em plantas com até cinco folhas e superior aos produzidos por imazethaphyr e fomesafen em plantas com cinco a 10 folhas. A mistura com o imazethaphyr (inibidor da ALS) retardou o processo de infecção do fungo e sua eficácia em controlar a população resistente aos inibidores da ALS. Além disso, a mistura resultou em injúrias que levaram a morte das plantas de soja. Porém as causas deste efeito ainda não são conhecidas. A técnica difásica foi indicada para a produção de inóculo de *A. euphorbiicola* e a adição de extrato de folha de leiteiro estimulou a esporulação do fungo em meio agarizado e o seu crescimento micelial em meio líquido. Como substratos sólidos, o resíduo de café e folhas de mamona, se mostraram apropriados para a produção de inóculo do fungo, em substituição ao meio agarizado. A manutenção de conídios a seco após a sua suspensão prévia em sacarose 35% foi o único tratamento capaz de manter a viabilidade dos conídios acima de 90% após três meses de armazenamento à temperatura ambiente.

ABSTRACT

NECHET, Kátia de Lima, D.S., Universidade Federal de Viçosa, December 2002.
Evaluation of *Alternaria euphorbiicola*, *Bipolaris euphorbiae* and *Sphaceloma poinsettiae* as bio-control agents of *Euphorbia heterophylla*. Advisor: Robert Weingart Barreto. Committee members: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti and Antônio Alberto da Silva.

Euphorbia heterophylla L. is one the major weed plant in soybean crop in Brazil. This crop generates billions of dollars in revenue and inefficient or no control of this and other weed plants is the major factor limiting soybean production. The acetolactate synthetase (ALS) inhibitor herbicides are the major products used for controlling *E. heterophylla* in this crop. Due to continuous use of these herbicides, the biotypes that are resistant to these products have dominated the soybean cultivating areas. Thus, the use of mycoherbicides can be an alternative to control *E. heterophylla*, either alone or as in mixture with the chemical compounds. The general objective of this study was to select promising isolates of *Alternaria euphorbiicola* Simmons & Engelhart, *Sphaceloma poinsettiae* Jenkins & Ruehle and *Bipolaris euphorbiae* (Hansford) Muchovej, to develop a mycoherbicide to control the weed. Besides the initial steps involving collection and selection of fungal isolates, other investigations included host range of selected isolates, disease epidemiology in controlled conditions; the efficacy of *A. euphorbiicola*, alone or in mixture with chemical herbicides to control *E. heterophylla*; mass production and viability of *A. euphorbiicola* conidia during storage. *Bipolaris euphorbiae* and *S. poinsettiae* isolates were specific to

E. heterophylla, but have limitation to be overcome for their use in biocontrol of *E. heterophylla*. The selected isolate of *B. euphorbiae* was better than the isolate that was being used in research at Paraná. A conidial suspension of 10^7 /ml was essential to cause 80% mortality in the some *E. heterophylla* populations while the certain populations were resistant and not controlled efficiently. The germination of *B. euphorbiae* conidia was not inhibited when in mixture with the chemical herbicides. The mycelial fragments, instead of conidia, of *S. poinsettiae* were used as inoculum and its virulence was greater when produced on potato dextrose broth. However, the viability of these propagules declined rapidly during storage at 4°C or at room temperature. The proportion of viable cfu units was reduced to only 60% when stored suspended in water or 35% sucrose at 4°C. The isolate KLN06 of *A. euphorbiicola* showed best potential for being developed in to a mycoherbicide, because it caused high plant mortality in all *E. heterophylla* populations tested, including those resistant to ALS inhibitor herbicides. The results were excellent even when plants were inoculated at the six to eight leaf stage, at which the chemical herbicides are not effective. Inoculation with a conidial suspension of 2×10^5 /mL and six hour post-inoculation wetness period, even 48 h after inoculation, was sufficient for shoot mortality. Delaying wet-period did not reduce efficacy of the fungus, but resprouting of plants increased. Plants were susceptible when inoculated at any of the six different plant phenological stages (from seedling to fruiting). *A. euphorbiicola* survived in colonized milkweed stems placed on the dry or wet soil surface, or buried in dry soil. The disease was transmitted to emerging seedling of *E. heterophylla* when the colonized stems were on the moist soil surface. But this natural seedling infection was not sufficient to control the weed. The application of the conidial suspension at lower concentration (10^4 /mL) did not control the plants infected previously during emergence near the inoculum source (*A. euphorbiicola* colonized milkweed stems). The host range of *A. euphorbiicola* was restricted to the euphorbiaceous species, *Chamaesyce hirta*, *C. hyssopifolia*, *E. heterophylla*, *E. cotinifolia*, *E. milii*, *E. pulcherrima* and *E. tirucali*. The disease severity was high on *C. hirta* and *E. hyssopifolia* and the fungus also can be explored for the control of these weeds. The eight soybean cultivars tested were immune. The control level of *E. heterophylla* in populations resistant and susceptible to ALS inhibiting herbicides, obtained by *A. euphorbiicola* application was similar to that obtained by fomesafen, carfentrazone, atrazine and glyphosate in plants up to five-leaf stage and better than that given by imazethaphyr and fomesafen in plants with five to

10 leaves. Mixing the fungus with imazethaphyr (ALS inhibitor) delayed the infection process of the fungus and its efficacy in controlling the populations resistant to ALS inhibitor. The mixture also resulted in mortal injury to soybean plants. However, the cause of this effect is not known. The diphasic technique was most useful for production of *A. euphorbiicola* and media enrichment with milkweed leaf extract stimulated fungal sporulation in agar medium and mycelial growth in liquid medium. Of the solid substrates, coffee residues and castor leaves were most appropriate for inoculum production and can substitute the agar medium. Storing dry conidia after treating with 35% sucrose was the only technique capable of maintaining the conidial viability above 90% after three-month storage at room conditions.

INTRODUÇÃO GERAL

Euphorbia heterophylla L. é uma euforbiácea nativa da América tropical e subtropical e ocorre em pelo menos 65 países, sendo a principal invasora em Fiji, Ghana, México, Filipinas, Indonésia e Tailândia. É considerada importante em 22 países, incluindo Argentina, Bolívia, Brasil, Cuba, Índia, Israel, Ilhas Maurícios, Nigéria, Nova Guiné, Peru, África do Sul, e Estados Unidos. (Parsons e Cuthbertson, 1992). Em Sri Lanka foi introduzida com o objetivo de abafar uma outra invasora, *Imperata cylindrica* (L.) P. Beauv. (Kissmann e Groth, 1993). Essa espécie apresenta alta variabilidade, sendo marcante a variação no formato da folha tanto dentro de uma mesma população como entre diferentes populações, o que levou a denominações distintas da espécie. Atualmente, as espécies *Euphorbia geniculata* Ort., *E. prunifolia* Jacq., *Poinsettia heterophylla* (L.) Klotzsch & Garce ex Klotzsch, e *P. geniculata* (Ort.) Klotzsch & Garce ex Klotzsch são sinônimos de *E. heterophylla* (Wilson, 1981).

No Brasil, *E. heterophylla* é popularmente conhecida como leiteiro, leiteira ou amendoim-bravo apresentando ampla distribuição geográfica no país (Lorenzi, 2000). A importância agrícola dessa planta deve-se à sua freqüente presença em culturas economicamente importantes como milho, cana-de-açúcar, feijão e soja (Guedes e Wiles, 1976; Instituto Agronômico do Paraná, 1977; Arevalo e Rozanski, 1991), sendo considerada uma das principais invasoras da cultura da soja no Brasil. A exportação de grãos, farelo e óleo de soja geram recursos de bilhões de dólares e fazem da soja um dos principais produtos da economia nacional (Timossi, 2002). A interferência de *E. heterophylla* e outras invasoras é o principal fator que restringe a produção da

cultura. No intuito de reduzir as perdas causadas por invasoras, estima-se que mais de 50% da utilização de herbicidas no Brasil sejam em campos de soja (Foloni e Christoffoleti, 1999).

Chemale e Fleck (1982) registraram reduções de 16 e 50% na produção de soja, quando 54 plantas de *E. heterophylla*/m² competiram, respectivamente, por 45 e 115 dias após a emergência da soja. A densidade de 350 plantas/m² causou redução de 62% da produção da cultivar BR-16, no ano agrícola de 1995/96, no estado do Paraná (Constantin *et al.*, 1997). Voll *et al.* (2002) estimaram que *E. heterophylla* na densidade de 1 planta/m² reduz em 10% a produção das cultivares de soja Embrapa-48 e Embrapa-62 e em 35%, se a densidade passa a ser de 10 plantas/m². Segundo Marambe (1998) a competição de invasoras, entre elas *E. heterophylla*, resulta em redução da área foliar, da biomassa seca da raiz e da brotação, da quantidade de nitrogênio na brotação, interceptação da luz e na produção da soja. Para um ótimo crescimento e produção da soja, o manejo de *E. heterophylla* deve ser feito antes do estágio de dois pares de folhas. Pereira *et al.* (2000), avaliando o efeito do método de preparo do solo, verificaram maior população de *E. heterophylla* no plantio direto do que no plantio convencional, o que pode estar atribuído a estimulação física, química e/ou biológica das sementes desta espécie, em sistemas de não revolvimento do solo. A legislação nacional determina que as sementes de *E. heterophylla* são proibidas como contaminantes para comércio de sementes de grandes culturas (Ministério da Agricultura, 1986).

E. heterophylla é caracterizada por sua elevada competitividade e agressividade. Seu potencial de competição é indicado por sua alta capacidade de produção de sementes por área, dispersão e rápido desenvolvimento (Parsons e Cuthbertson, 1992), maturação dos frutos não simultânea, possibilitando a produção de sementes por longo período (Mikusinski-Costa, 1982). As sementes de *E. heterophylla* germinam e emergem de até 12 cm de profundidade (Cerdeira e Voll, 1980). Ocorre regeneração adventícia em *E. heterophylla* quando parte de seu caule é danificado ou removido por ação de herbicidas ou capina (Mikusinski-Costa, 1987). Além da redução na produtividade, *E. heterophylla* interfere na colheita mecanizada e transfere umidade aos grãos colhidos devido ao látex produzido por esta espécie (Bannon *et al.*, 1976; Kissmann e Groth, 1992). Além das perdas por competição, *E. heterophylla* é considerada uma planta tóxica (Holm *et al.*, 1997) e hospedeira de *Diaporthe phaseolorum* (Cke. & Ell.) Sacc. f.sp. *meridionalis*, agente causal do cancro da haste da soja (Garrido e Dhingra, 1997), do percevejo *Euschistus heros* Fabr., (Kissmann e

Groth, 1993) e da mosca-branca (*Bemisia tabaci* Genn.) que transmite o vírus do mosaico dourado do feijoeiro (BGMV) (Faria, 1994).

Nas lavouras de soja, os principais produtos aplicados para o controle de *E. heterophylla* são os herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS). Esses herbicidas são utilizados em larga escala, pois são eficientes em baixas doses, apresentam baixa toxicidade para mamíferos e seletividade para várias culturas (Saari *et al.*, 1994). No entanto, no Brasil, já foram identificados biótipos da planta resistentes a estes produtos, que têm se tornado dominantes em muitas áreas, em função do uso contínuo destes herbicidas (Gazziero *et al.*, 1997; Melhorança e Pereira, 1999). A resistência é codificada por um gene dominante nuclear com dominância completa (Vargas *et al.*, 2001) e não há diferença competitiva entre os biótipos sensíveis e resistentes, quanto a morfologia, duração de ciclo e potencial de competição com as culturas (Vidal e Trezzi, 2000; Vargas *et al.*, 1999). Portanto, a tendência dos problemas com populações de leiteiro resistentes a este grupo de herbicidas tem se agravado.

Invasoras que apresentam resistência a herbicidas representam uma oportunidade para o uso de agentes de controle biológico, isoladamente ou em mistura com produtos químicos (Charudattan, 2001). Neste contexto, a importância de *E. heterophylla* resistente aos inibidores da ALS é uma justificativa aceitável para o estudo de estratégias alternativas para seu controle. O uso de microherbicidas é baseado na multiplicação massal e aplicações periódicas de propágulos de um patógeno, à semelhança dos herbicidas químicos (TeBeest *et al.*, 1992; Auld e Morin, 1995; Roskopf *et al.*, 1999). Atualmente oito fitopatógenos são registrados como bioherbicidas, mas esse número ainda é pequeno se comparado aos vários patossistemas já estudados e que mostram resultados satisfatórios em condições de campo. Essa situação reflete as limitações que ainda existem no desenvolvimento de microherbicidas e na sua adoção como estratégia no manejo integrado de plantas daninhas. Podemos destacar que o retorno econômico tem sido muito pequeno para despertar o interesse das grandes indústrias de agroquímicos e que a produção massal para uso em larga escala, a eficácia e vida de prateleira do inóculo ainda são obstáculos da aplicação prática dessa tecnologia (Charudattan e Dinooor, 2000).

O primeiro teste de um microherbicida no Brasil foi feito por Ribeiro e Andrade (1985) utilizando Collego®, um produto desenvolvido nos Estados Unidos, para o controle do angiquinho (*Aeschynomene* spp.) em lavouras irrigadas no Rio Grande do Sul. O controle da planta foi satisfatório somente quando as plantas inoculadas

permaneceram sob condições de alta umidade relativa (acima de 90%) enquanto que, na condição ambiente local sob baixa umidade relativa do ar (50 a 70%), ocorrem apenas lesões que não provocam a morte das plantas. Em 1980, a Embrapa Soja, iniciou o programa pioneiro de controle biológico de invasoras no país, visando o desenvolvimento de um micoherbicida tendo como alvo *E. heterophylla* (Yorinori, 1985; Yorinori, 1987).

As pesquisas realizadas enfocaram a utilização do fungo *Bipolaris euphorbiae* (Hansford) Muchovej (= *Helminthosporium* sp.) que apresentou a eficiência igual ou superior ao herbicida acifluorfen sódico no controle de *E. heterophylla*, tanto em casa de vegetação como no campo. Em casa de vegetação, as plantas de leiteiro avaliadas 72 horas após a inoculação com uma suspensão de 1×10^4 conídios/mL apresentaram redução de 68% de matéria fresca e as tratadas com o herbicida 47,6% em relação ao controle. No campo, o fungo causou severa desfolha em plantas no estágio de florescimento, época não recomendada para o acifluorfen sódico, e não ocorreu produção de sementes (Yorinori, 1985). Uma das limitações do uso do fungo como agente de controle foi a existência de populações da planta resistentes à *B. euphorbiae*. Coletas de sementes de populações de *E. heterophylla* realizadas nos estados de Minas Gerais, Santa Catarina, Mato Grosso do Sul e Paraná permitiram a classificação arbitrária das populações em quatro grupos: aquelas que apresentaram todas as plantas suscetíveis, as com a maioria das plantas suscetíveis, as com a maioria das plantas resistentes e as com todas as plantas resistentes (Yorinori e Gazziero, 1989). Apesar dos resultados obtidos, o desenvolvimento de *B. euphorbiae* como micoherbicida dependerá do intercâmbio com a indústria, como forma de cooperação tecnológica e da busca de isolados com maior virulência para o controle das populações resistentes. (Gazziero e Yorinori, 1993).

Barreto e Evans (1998), em levantamento da micobiota associada à essa invasora, destacaram os fungos *Alternaria euphorbiicola* Simmons & Engelhart e *Sphaceloma poinsettiae* Jewnkins e Reuhle, agentes causais do cancro de Alternaria e da verrugose, respectivamente, como potenciais agentes de biocontrole, sugerindo a utilização desses fungos como complementares ou em substituição a *B. euphorbiae* visando aumentar o leque de populações de *E. heterophylla* controladas. Yorinori (1985) já havia observado que no estágio de plântula uma única lesão de *A. euphorbiicola* pode matar a planta, mas considerou que em condições de campo, sua eficiência seria menor que *B. euphorbiae* no controle da invasora por requerer um

período maior para causar infecção. Resultados prévios de Barreto e Evans (1998) demonstraram que *S. poinsettiae* foi capaz de causar a morte de plantas de *E. heterophylla* no estágio de cotilédone e de 1º par de folhas. Nos estádios mais avançados ocorreu rebrota das plantas, alongação dos internódios, mas não houve formação de flores. Plantas maduras não foram infectadas. A obtenção de mais informações sobre a interação desses fungos com o leiteiro visando determinar as condições ambientais ótimas para serem desenvolvidos como micoherbicidas se faz necessária.

O uso de micoherbicidas na agricultura convencional é limitado em função de disponibilidade de produtos químicos eficientes para o controle de invasoras importantes, como o leiteiro, para o qual há 104 formulações registradas para uso em diversas culturas (Agrofit, 2002). Mesmo nesse contexto, há um nicho para o produto biológico, não como substituto dos herbicidas, mas como um complemento no controle do leiteiro, em vista do uso em larga escala dos inibidores da ALS pelos produtores e do crescente problema com a resistência de populações de leiteiro a estes produtos. Outro nicho de mercado para o uso de micoherbicidas é na agricultura orgânica. No Brasil, o maior número de produtores orgânicos se dedica à cultura da soja (8,4%) totalizando uma área de 12.516 ha, seguido pelos produtores de hortaliças (7,77%) e café (5,93%). Esses valores expressivos são recentes e se devem à demanda dos mercados do Japão e União Européia por soja orgânica e pela experimentação dos produtores de soja em manejo orgânico (Ormond *et al.*, 2002).

O objetivo geral desse trabalho foi o de explorar o potencial dos fungos *Alternaria euphorbiicola*, *Bipolaris euphorbiae* e *Sphaceloma poinsettiae*, visando o desenvolvimento de um micoherbicida para o controle de *E. heterophylla* no Brasil. Para alcançar essa meta foram adotadas algumas etapas dentre as citadas por Auld (1997) como as de um programa de pesquisa visando o desenvolvimento de bioherbicidas:

- Seleção de um isolado de cada patógeno com virulência elevada ao maior número possível dentre as populações de *E. heterophylla* testadas;
- Avaliação da especificidade dos isolados selecionados, baseado no método centrífugo-filogenético (Wapshere, 1974);
- Realização de estudos epidemiológicos sobre a interação leiteiro x isolados fúngicos;

- Avaliação da combinação de *A. euphorbiicola* com herbicidas e seu efeito no controle de populações de *E. heterophylla* resistentes e sensíveis aos herbicidas inibidores da ALS;

- Avaliação da vida de prateleira e da produção massal de *A. euphorbiicola*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrofit on line. 2002. In: <http://www.200252.165.4/agrofit>.
- Arevalo, R.A.; Rozanski, A. 1991. Plantas Daninhas na cultura do feijão. In: “*Anais 4º Seminário sobre Pragas e Doenças do Feijoeiro*”, pp. 33-43. Campinas: Secretaria da Agricultura e Abastecimento. Campinas, São Paulo.
- Auld, B.A. 1997. Bioherbicides. In: “*Biological Control of Weeds: theory and practical application*”, (Julien, M.; White, G., Eds), pp.129-134. ACIAR Monograph nº49, Austrália.
- Auld, B.A.; Morin, L. 1995. Constraints in the development of bioherbicides. *Weed Technology*, v.9, p.638-652.
- Bannon, J.S.; Baker, J.B.; Harger, T.R.; Rogers, R.L. Weed Watch. 1976. *Weeds Today*, v.8, p.12.
- Barreto, R.W.; Evans, H.C. 1998. Fungal pathogens of *Euphorbia heterophylla* and *E. hirta* in Brazil and their potential as weed biocontrol agents. 1998. *Mycopathologia*, v. 141, n.1, p.21-36.
- Cerdeira, A.L.; Voll, E. 1980. Germinação e emergência do amendoim bravo (*Euphorbia heterophylla* L.). “*Resultados de Pesquisa de Soja, 1979/1980*”, pp. 216-220. Embrapa, Londrina.
- Charudattan, R. 1984. Microbial control of plant pathogens and weeds. *Journal Georgia Entomol. Soc.*, v.19, n.3, p.40-62.
- Charudattan, R. 2001. Biological Control of weeds by means of plant pathogens: Significance for integrated weed management in modern agro-ecology. *BioControl*, v.46, p.229-260.

- Charudattan, R.; Dinooor, A. 2000. Biological control of weeds using plant pathogens: accomplishments and limitations. *Crop Protection*, v.19, p. 691-695.
- Chemale, V.M.; Fleck, N.G. 1982. Avaliação de cultivares de soja (*Glicine Max* (L.)Merril) em competição com *Euphorbia heterophylla* L, sob três densidades e dois períodos de ocorrência. *Planta Daninha*, v.4, n.2, p.36-45.
- Constantin, J.; Contiero, R.L.; Demeis, M.; Ita, A.G.; Maciel, C.D. de G. 1997. Controle de *Euphorbia heterophylla* e fitotoxicidade dos herbicidas imazamox e imazethaphyr na cultura da soja (*Glycine Max* L. Merrill). In: “Resumos do XXI Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas”, pp. 451, Caxambu, Minas Gerais.
- Faria, J.C.de. 1994. Mosaico dourado. In: “Principais Doenças do feijoeiro comum e seu controle”, (Sartorato, A.; Rava, C.A., Eds), pp.263-284. Embrapa: SPI, Brasília, DF.
- Foloni, L.L.; Christoffoleti, P.J. 1999. Chemical weed control in soybean in Brazil using new herbicides and mixtures. In: “Proceedings of the 1999 Brighton Conference Weeds.”, (The British Crop Protection Council, Ed.), pp. 315-318, 1999, Brighton British Crop Protection Council, Brighton, UK.
- Garrido, L. Da R.; Dhingra, O.D. 1997. Weed species as potential reservoir hosts of *Diaporthe phaseolorum* f.sp. *meridionalis*. *Fitopatologia Brasileira*, v.22, n.1, p.108-110.
- Gazziero, D.L.P.; Brighenti, A.M.; Maciel, C.D.G.; Christofolleti, P.J.; Adegas, F.S.; Voll, E. 1997. Resistência de amendoim-bravo aos herbicidas inibidores da enzima ALS. *Planta Daninha*, v.16, n.2, p.117-125.
- Gazziero, D.L.P.; Yorinori, J.T. 1993. “Experiência sobre controle biológico de *Euphorbia heterophylla* no Brasil”. FCAV, UNESP-Jaboticabal, 11p.
- Guedes, L.V.; Wiles, T.L. 1976. Controle de plantas daninhas em plantio direto de soja: avaliação em escala comercial em fazendas. In: “Resumos do XI Seminário Brasileiro de Herbicidas e Ervas Daninhas”, pp.131, Londrina, Paraná.
- Holm, L.R.; Doll, J.; Holm, E.; Pancho, J.; Herberger, J. 1997. “World Weeds. Natural Histories and Distribution”. John Wiley & Sons, New York.
- Instituto Agrônômico do Paraná.1977. Recomendações técnicas para a cana-de-açúcar no estado do Paraná, n.6, 96p.
- Kissmann, K.G.; Groth, D. 1993. *Plantas infestantes e nocivas.Tomo II*. São Paulo: Basf Brasileira, 798p.
- Lorenzi,H. 2000. *Plantas Daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas*. Instituto Plantarum: Nova Odessa, São Paulo.
- Marambe, B. 1998. The mecanism of weed interference in soybean. *Tropical Science*, v.38, p.138-146.

- Melhorança, A.L.; Pereira, F.A.R. 1999. Eficiência do herbicida lactofen no controle de *Euphorbia heterophylla*, resistente aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS). *Documentos-Embrapa Agropecuária Oeste*, n. 3, p. 11-14.
- Mikusinski Costa, O.M. 1982. Morfologia e desenvolvimento de *Euphorbia heterophylla* L. *Agronomia sulriograndense*, v.18, n.2, p.59-66.
- Mikusinski Costa, O.M. 1987. Ocorrência de regeneração adventícia na leiteira (*Euphorbia heterophylla* L.). *Agronomia sulriograndense*, v.23, n.2, p.157-165.
- Ministério da Agricultura. 1986. Portaria M.A. nº 443 11/11/86.
- Ormond, J.G.P.; Paula, S.R.L. de; Filho, P.F.; Rocha, L.T.M. da. 2002. Agricultura orgânica: quando o passado é futuro. *BNDES Setorial*, n.15, p. 3-34.
- Parsons, W.T.; Cuthbertson, E.G. 1992. *Noxious weeds of Australia*. Inkata Press, Melbourne, Sydney.
- Pereira, E.S.; Velini, E.D.; Carvalho, L.R.; Maimoni-Rodella, R.C.S. 2000. Avaliações qualitativas e quantitativas de plantas daninhas na cultura da soja submetida aos sistemas de plantio direto e convencional. *Planta Daninha*, v.18, n.2, p.207-216.
- Ribeiro, A.S.; Andrade, V.A. 1985. Controle biológico de angiquinho (*Aeschynomene* spp.). *Lavoura Arrozeira*, v.38, n.361, p.44-49.
- Roskopf, E.N.; Charudattan, R.; Kadir, J.B. 1999. In: “*Use of plant pathogens in weed control*. In: “*Handbook of Biological Control*”, (Bellows, T.S.; Fisher, T.W., Eds), pp.891-918. Academic press, New York.
- Saari, L.L.; Cotterman, J.C.; Thill, D.C. 1994. Resistance to acetolactate syntase inhibiting herbicides. In: “*Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry*”, (Powles, S.B. e Holtum, J.A.M., Eds), pp.83-142. CRC Press, Boca Raton.
- TeBeest, D.O.; Yang, X.B.; Cisar, C.R.; 1992. The status of biological control of weeds with fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, v. 30, p. 637-657.
- Timossi, A.J. 2002. “I Levantamento de safra 2002/2003 FNP Consultoria & Comércio: Grãos (milho e soja)”. *FNP Agroinformativos*, Brasil.
- Vargas,L.; Silva, A.A.da; Borém, A.; Rezende, S.T.de; Ferreira, F.A.; Sediyaama, T. 1999. *Resistência de Plantas Daninhas a Herbicidas*. Viçosa, Minas Gerais.
- Vargas,L.; Borém, A.; Silva, A.A.da.2001. Herança da resistência aos herbicidas inibidores da ALS em biótipos da planta daninha *Euphorbia heterophylla*. *Planta Daninha*, v.19, n.3, p.331-336.
- Vidal, R.A.; Trezzi, M.M. 2000. Análise de crescimento de biótipo de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes e suscetível aos herbicidas inibidores da ALS. *Planta Daninha*, v.18, n.3, p.427-433.

- Voll, E.; Gazziero, D.L.P.; Brighenti, A.A.M.; Adegas, F.S. 2002. Competição relativa de espécies de plantas daninhas com dois cultivares de soja. *Planta Daninha*, v.20, n.1, p.17-24.
- Wapshere, A.J. 1974. A strategy for evaluating the safety of organisms for biological weed control. *Annals of Applied Biology*, v.77, p. 201-211.
- Wilson, A.K. 1981. *Euphorbia heterophylla* : a review of distribution, importance and control. *Tropical Pest management*, v.27, n.1, p.32-38.
- Yorinori, J.T. 1985. Biological control of milkweed (*Euphorbia heterophylla*) with pathogenic fungi. In: "Proceedings of the VI International Symposium on Biological Control of Weeds.", (Delfosse, E.S. Ed.), pp.677-681, 1985, Vancouver Agriculture Canada, Vancouver, Canada.
- Yorinori, J.T. 1987. Controle biológico de ervas daninhas com microrganismos. In: "Anais da II Reunião sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas", (Fundação Cargill. Ed.), pp.20-30, 1987, Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz", Piracicaba, São Paulo.
- Yorinori, J.T.; Gazziero, D.L.P. 1989. Control of milkweed (*Euphorbia heterophylla*) with *Helminthosporium* sp. In: "Proceedings of the VII International Symposium on Biological Control of Weeds.", (Delfosse, E.S. Ed.), pp.571-576, 1989, Rome Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale, Rome, Italy.

***Bipolaris euphorbiae* COMO AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO DE
Euphorbia heterophylla: SELEÇÃO DE NOVOS ISOLADOS, AVALIAÇÃO DE
ESPECIFICIDADE E ESTUDOS COMPLEMENTARES**

RESUMO

Bipolaris euphorbiae vem sendo estudado desde o início dos anos 80 como agente de controle biológico do leiteiro (*Euphorbia heterophylla*), importante invasora da cultura da soja no Brasil. Um novo isolado do fungo com maior agressividade em sete das nove populações da planta testadas foi selecionado. As populações apresentaram reações diferentes ao isolado selecionado e duas foram consideradas como padrão de maior suscetibilidade e menor suscetibilidade ao fungo. Nessas populações, a severidade da doença aumentou em função do aumento da concentração de inóculo com diferença significativa entre as populações, com exceção da suspensão de 1×10^3 conídios/mL. Morte de plantas foi verificada apenas na população mais suscetível, quando inoculada com uma suspensão de 1×10^7 conídios/mL. O isolado foi inoculado em 32 espécies de plantas de 12 famílias e foi específico à *E. heterophylla*. Na faixa de temperatura de 10 a 30°C houve crescimento radial micelial do fungo, sendo ótimo a 25 °C. A porcentagem de conídios germinados foi máxima entre 20 e 30°C. A germinação dos conídios não foi inibida pela mistura com os herbicidas imazethapyr (106 g i.a/L), glyphosate (720 g i.a/Kg), fomesafen (250 g i.a/L), carfentrazone (400 g i.a/L), atrazine (500 g i.a/L) e glyphosate+carfentrazone, na dosagem recomendada e metade da dose.

ABSTRACT

Since early 1980's, *Bipolaris euphorbiae* is being studied as the bio-control agent for milkweed (*Euphorbia heterophylla*), which is an important weed plant of soybean crop in Brazil. A new isolate of this fungus with higher aggressiveness on seven of the nine plant populations was selected. The weed populations showed different reactions to the selected isolate and one of them was considered as a standard

of highest and the other of lowest susceptibility to the fungus. The disease severity in these populations increased by increasing inoculum concentration although there was significant difference among the populations, except at inoculum concentration of 1×10^3 conidia/mL. Plant mortality occurred only in most susceptible population inoculated with conidial suspension of 1×10^7 ML/mL. The isolate was inoculated on plants of 32 species of 12 families and it was found to be specific on *E. heterophylla*. Radial mycelial growth of the fungus occurred in the temperature range of 10 to 30°C with optimum at 25 °C and the conidial germination was highest between 20 and 30°C. The conidia germination was not inhibited by herbicides imazethapyr (106 g i.a/L), glyphosate (720 g i.a/Kg), fomesafen (250 g i.a/L), carfentrazone (400 g i.a/L), atrazine (500 g i.a/L) and glyphosate+carfentrazone, at the recommended or half than recommended dose.

INTRODUÇÃO

A soja é um dos principais produtos da economia brasileira para exportação ocupando 17,4 milhões de hectares, o que resultará em uma produção de até 48,5 milhões de toneladas de grãos na safra 2002/03, gerando recursos de bilhões de dólares resultantes da exportação de grãos, farelo e óleo (Timossi, 2002). *Euphorbia heterophylla* L., invasora popularmente conhecida como amendoim-bravo ou leiteiro, é considerada uma das principais invasoras da cultura da soja no Brasil (Lorenzi, 2000). Devido ao seu rápido crescimento, *E. heterophylla* compete no início do crescimento da cultura, freqüentemente sombreando as plântulas. A espécie, ainda, contém um látex que transfere umidade aos grãos colhidos e sua haste é um obstáculo à colheita mecanizada (Kissmann e Groth, 1992).

A interferência de *E. heterophylla* e outras invasoras é o principal fator que restringe a produção da cultura, o que faz com que mais de 50% do volume total de herbicidas utilizados no país sejam aplicados em campos de soja (Foloni e Christoffoleti, 1999). O papel de *E. heterophylla* como invasora é fortemente influenciado pela resistência da planta aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) (Vidal e Fleck, 1997; Melhorança e Pereira, 1999) que são utilizados em larga escala na cultura da soja. Um dos métodos alternativos de controle de invasoras,

principalmente para as que apresentam resistência a herbicidas, é o uso de fungos fitopatogênicos utilizando a estratégia do micoherbicida (Charudattan, 1990; Te Beest *et al.*, 1992).

O programa pioneiro de controle biológico de plantas daninhas no Brasil, visando o desenvolvimento de um micoherbicida, foi iniciado na Embrapa Soja, em 1980/81, tendo como alvo *E. heterophylla* (Yorinori, 1987). Inicialmente, *Helminthosporium* sp. foi tão eficiente no controle do leiteiro como o herbicida acifluorfen sódico, tanto em casa de vegetação como no campo. Em casa de vegetação, plantas de leiteiro avaliadas 72 horas após a inoculação com uma suspensão de 1×10^4 conídios/mL, apresentaram redução de 68 % de matéria fresca e as tratadas com o herbicida 47,6 % em relação ao controle. No campo, o fungo causou severa desfolha em plantas no estágio de florescimento, época não recomendada para o acifluorfen sódico, e não ocorreu produção de sementes (Yorinori, 1985). Porém, coletas de sementes de populações de *E. heterophylla* nos estados de Minas Gerais, Santa Catarina, Mato Grosso do Sul e Paraná permitiram verificar que as populações apresentavam graus variáveis de suscetibilidade ao fungo. As populações foram classificadas arbitrariamente em quatro grupos: aquelas que apresentavam todas as plantas suscetíveis, as com a maioria das plantas suscetíveis, as com a maioria das plantas resistentes e as com todas as plantas resistentes (Yorinori e Gazziero, 1989).

Apesar dos resultados terem demonstrado a potencialidade desse fungo como micoherbicida um produto comercial nunca foi desenvolvido (Gazziero e Yorinori, 1993) e a busca de isolados com maior agressividade foi sugerida pelos autores para o controle das populações resistentes ao fungo. A posição taxonômica de *Helminthosporium* sp. foi revista por Muchovej e Carvalho (1989), transferindo-o para a espécie *Bipolaris euphorbiae*. Barreto e Evans (1998), em levantamento da micobiota associada à *E. heterophylla* no Brasil, reafirmaram o potencial deste fungo como micoherbicida e destacaram também os fungos *Alternaria euphorbiicola* Simmons & Engelhard e *Sphaceloma poinsettiae* Jenkins & Reuhle como promissores agentes de controle biológico.

Entre as etapas iniciais de um programa de pesquisa visando o desenvolvimento de micoherbicida estão a identificação de patógenos promissores, seleção de isolados com maior agressividade e avaliação do efeito de concentrações de inóculo crescentes no controle da invasora (Auld, 1997). O ideal é que o isolado utilizado controle a maioria das populações da invasora ou então, quando misturado com herbicidas

químicos, aumente o espectro das populações controladas. Até o momento, não foi selecionado um isolado de *B. euphorbiae* capaz de controlar as populações de *E. heterophylla* caracterizadas como resistentes ao fungo. A determinação da gama de hospedeiros do fungo é outra etapa importante no programa de pesquisa, seja pelo método clássico ou de micoherbicida (Weidemann, 1990). Nenhum estudo demonstrando a especificidade de *B. euphorbiae* foi publicado até o momento.

Assim sendo o objetivo deste trabalho foi selecionar um isolado de *B. euphorbiae* com elevado potencial de controle sobre populações de *E. heterophylla*, testar sua especificidade utilizando o método centrífugo filogenético, avaliar o efeito de herbicidas químicos sobre a viabilidade de conídios do fungo e determinar a concentração de inóculo necessária para a obtenção do melhor controle da invasora.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Obtenção dos isolados de *Bipolaris euphorbiae*:

Coletaram-se, nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, plantas de *E. heterophylla* naturalmente infectadas com *B. euphorbiae*, que foram herborizadas e incorporadas à coleção micológica do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. A partir de lesões nas folhas e hastes foram feitos isolamentos direto e indireto em meio CVA (caldo de vegetais ágar, Pereira *et al.*, 2003) para a obtenção de culturas puras. Os isolados obtidos foram conservados *in vitro* pelo método de preservação em sílica-gel (Dhingra e Sinclair, 1995) e utilizados na seleção inicial (Tabela 1).

2. Produção de Inóculo:

A obtenção de conídios de *B. euphorbae* foi feita segundo metodologia de Walker (1980) com modificações. Dez discos de micélio do fungo provenientes da margem de uma colônia cultivada por sete dias em placa de Petri contendo meio CVA foram semeados assepticamente em erlenmeyers contendo 100 mL de meio CV (meio CVA sem adição de agar). Os erlenmeyers foram colocados em agitador orbital a

Tabela 1: Origem dos isolados de *Bipolaris euphorbiae* obtidos e utilizados na seleção inicial

Código	Origem
KLN01	Viçosa-MG
KLN02	Sete Lagoas-MG
KLN05	Venda Nova-ES
KLN09	Araruama-RJ
KLN16	Niterói-RJ
TAD*	Rio Grande do Sul

*Isolado doado por J.T. Yorinori e utilizado no programa pioneiro de controle biológico de *E. heterophylla* no Brasil.

30 rpm por sete dias a temperatura ambiente. Após esse período, o micélio foi triturado dentro dos erlenmeyers, utilizando-se um microtritador/homogeneizador, e vertido em bandejas de alumínio de 20x28 cm contendo 100 mL de meio CVA. As bandejas foram mantidas a 26°C e fotoperíodo de 12 horas sob um conjunto de duas lâmpadas fluorescentes (40W) e duas lâmpadas negras (40W). Após dois dias, foi feita a coleta de esporos adicionando-se 50 mL de água esterilizada sobre a superfície das bandejas e raspando-se estas com espátula de borracha. A suspensão obtida foi filtrada em gaze e a concentração de conídios ajustada para a utilização nos experimentos.

3. Obtenção de sementes das populações de *Euphorbia heterophylla*:

Foram consideradas populações distintas de *E. heterophylla* as sementes provenientes de plantas coletadas em diferentes localidades ou aquelas com alguma característica particular, como a resistência ao herbicida imazetaphyr obtido do Laboratório de Herbicida na Planta (Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa) e a população resistente a *B. euphorbiae* (doação de J. T. Yorinori, Embrapa Soja, provenientes de campos experimentais do Paraná). As sementes das populações utilizadas (Tabela 2) foram coletadas e armazenadas a 5°C. Sementes pré-germinadas

Tabela 2: Origem das populações de *Euphorbia heterophylla* utilizadas na seleção inicial

Código	Origem
EKLN16	Niterói-RJ
EKLN19	Viçosa-MG
ERWB 247	Itabuna-BA
ERWB 273	Foz do Iguaçu-RS
ERWB 274	Nova Laranjeira- PR
ETSB	Londrina- PR
ETRB	Londrina-PR (resistente à <i>B. euphorbiae</i>)
ESH	Viçosa-MG
ERH	Viçosa-MG (resistente à imazethapyr)

foram transferidas para copos plásticos perfurados com capacidade de 500 mL contendo solo esterilizado e mantidas em casa de vegetação ($26\pm 2^{\circ}\text{C}$) e regadas diariamente. As plantas foram inoculadas no estágio de três a quatro pares de folhas definitivas.

4. Seleção do isolado de *B. euphorbiae*:

Populações de *E. heterophylla* foram inoculadas com uma suspensão de 10^4 conídios/mL + Tween 20 (0,05%) + Break thru[®] (0,05%) e mantidas a 25°C em câmara de nevoeiro por 24 horas. Após esse período, foram levadas para casa de vegetação ($26\pm 2^{\circ}\text{C}$) e avaliada a incidência de folhas com sintomas e de plantas mortas. Plantas pulverizadas com água + Tween 20 (polioxietileno monolaurático, 0,05%) + Break thru[®] (copolímero poliéter - polimetil siloxano + poliéter, 0,05%) serviram como controle. A avaliação da intensidade da doença foi feita a cada cinco dias, iniciando-se logo após o aparecimento dos primeiros sintomas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial de seis isolados, nove populações e três repetições, sendo cada repetição um vaso com duas plantas.

5. Efeito da temperatura no crescimento micelial e na germinação de conídios do isolado selecionado:

O isolado selecionado a partir do experimento anterior (KLN 05) foi semeado no centro de placas de Petri contendo meio de cultura CVA e mantidas em incubadoras a 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40°C. As medições do diâmetro da colônia foram feitas ortogonalmente e o ensaio foi inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo cada repetição uma placa de Petri. A germinação dos conídios foi avaliada depositando 500 µL de uma suspensão de 1×10^5 conídios/mL em placas de Petri contendo ágar-água e espalhada com alça de Drigalski e mantidas nas mesmas temperaturas citadas acima seguindo o mesmo delineamento experimental. A avaliação foi feita após 24 horas examinando 200 esporos/placa. Os conídios foram considerados germinados quando o tubo germinativo era igual ou maior que o comprimento do conídio.

6. Efeito de herbicidas químicos em duas dosagens na germinação *in vitro* de conídios de *B. euphorbiae*:

As seguintes formulações comerciais dos herbicidas foram usadas nesses experimentos: imazethapyr (5-ethyl-2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)nicotinic acid, Pivot, 106 g i.a/L, Basf. S.A., Ludwigsghafen, Germany), glyphosate (N-(phosphonomethyl)glycine, Roundup WG, 720 g i.a/Kg, Monsanto do Brasil, São Paulo, SP), fomesafen (5-(2-chloro-alpha, alpha, alpha-trifluoro-p-tolyloxy)-N-methylsulfonyl-2-nitrobenzamide, Flex, 250 g i.a/L, Syngenta Proteção de Cultivares, São Paulo, SP), carfentrazone (ethyl (RS)-2-chloro-3-[2-chloro-5-[4-(difluoromethyl)-4,5-dihydro-3-methyl-5-oxo-1H-1,2,4-triazol-1-yl]-4-fluorophenyl] propionate, Aurora 400CE, 400 g i.a/L, FMC Química do Brasil, Campinas, São Paulo), atrazine (6-chloro-N2-ethyl-N4-isopropyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine, Gesaprim500, 500 g i.a/L, Syngenta Proteção de Cultivares, São Paulo, SP) e glyphosate + carfentrazone. As soluções foram preparadas na dose recomendada pelo fabricante (1X) e diluídas para obtenção da meia dose (0,5X) utilizando como diluente uma suspensão aquosa de 1×10^5 conídios/mL. Uma alíquota de 500 µL dessa suspensão foi depositada em placas contendo agar-água, espalhadas com alça de Drigalski e colocadas em incubadora a 26°C em fotoperíodo de 12 horas. A suspensão de esporos sem adição de herbicida constou como controle. A avaliação foi feita após 24 horas e da mesma maneira que citado no item 5. O

delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial de sete herbicidas, duas doses e cinco repetições. Cada repetição constou de uma placa de Petri.

7. Efeito de concentrações crescentes de inóculo na severidade da doença em duas populações de *E. heterophylla*:

Na avaliação do efeito da concentração de inóculo sobre a severidade da doença foram escolhidas duas populações de *E. heterophylla*, uma considerada como suscetível (EKLN19) e outra como resistente ao fungo *B. euphorbiae* (ETRB). Plantas dessas populações foram inoculadas com as suspensões de 0, 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷ conídios/mL + Tween 20 (0,05 %) + Break thru[®] (0,05 %). Após a inoculação, as plantas permaneceram em câmara de nevoeiro por 24 horas e em seguida foram transferidas para condições controladas (26±2°C). Avaliaram-se o número de plantas mortas e a porcentagem de folhas com sintomas a cada cinco dias durante 30 dias e calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (Campbell e Madden, 1990). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições, cada repetição considerada como um vaso com uma planta.

8. Especificidade de *Bipolaris euphorbiae*:

Para verificar a gama de hospedeiros do isolado selecionado (KLN05) foram feitas inoculações em espécies escolhidas segundo o método centrífugo-filogenético (Wapshere, 1974). Foram incluídas espécies pertencentes à Sub Classe Rosidae, com concentração no gênero *Euphorbia* e na família Euphorbiaceae, e adicionalmente espécies economicamente importantes, plantas sabidamente hospedeiras de fungos do gênero *Bipolaris* e oito cultivares de soja, considerando futura exposição da cultura ao micoherbida produzido com *B. euphorbiae* (Tabela 3). Para fins de confirmação da patogenicidade do inóculo foram incluídas plantas de *E. heterophylla* das populações EKLN19 e ETRB. A idade das plantas testadas variou de acordo com a espécie: as obtidas por semente tinham de 25 a 30 dias e as de mudas já formadas foram podadas para a obtenção de brotações novas. Para inoculação, atomizou-se suspensão de 1x10⁵ conídios/mL + óleo mineral (5%) + Break thru[®] (0,05%) até o ponto de escorrimento e as plantas foram levadas para câmara de nevoeiro a 25°C por 24 horas e em seguida transferidas para casa de vegetação (26±2°C). Foram utilizadas três

repetições, sendo cada repetição representada por um vaso com uma planta. Plantas inoculadas com água + óleo mineral (5%) + Break thru (0,05%) constaram como controle. As avaliações foram feitas a cada cinco dias durante 30 dias, verificando-se a presença ou não de sintomas nas folhas, ramos e inflorescências.

9. Análise estatística dos dados:

Os dados foram submetidos à análise de variância usando o proc GLM do programa SAS versão 6.12.

RESULTADOS

Seleção do isolado de *B. euphorbiae*

Todos os isolados foram patogênicos às populações de *E. heterophylla* testadas e os primeiros sintomas foram observados sete dias após a inoculação. Sintomas típicos de manchas necróticas nas folhas e hastes (Figura 1) e em alguns casos desfolha e morte da parte aérea das plantas foram verificadas em algumas interações população x isolado (Figura 2). A maioria das populações apresentou maior porcentagem de folhas com sintomas, variando de 62 a 100%, quando inoculadas com KLN05 (Figura 3). Apenas em EHRH o resultado obtido foi menor quando comparado com os outros isolados, incidência de 26 %, enquanto para ETRB esse resultado não o diferiu dos outros isolados. Além disso, KLN05 causou morte de pelo menos uma repetição em oito das nove populações testadas, o que não foi verificado com nenhum dos outros isolados testados (Figura 4). O isolado KLN05 foi selecionado para estudos de otimização.

Efeito da temperatura no crescimento micelial e na germinação de conídios do isolado selecionado

O crescimento radial micelial do isolado KLN05 ocorreu na faixa de 10 a 30°C sendo máximo a 25°C (Figura 5). Nas temperaturas de 5, 35 e 40°C não houve crescimento, mas após dois dias a 25°C pode-se observar a volta do crescimento nas



Figura 1: Sintoma de manchas nas folhas e na haste em planta de *E. heterophylla* da população ETRB após a inoculação de *B. euphorbiae* KLN05.



Figura 2: Morte da parte aérea da população ERWB247 de *E. heterophylla* aos sete dias após a inoculação de *B. euphorbiae* KLN05.

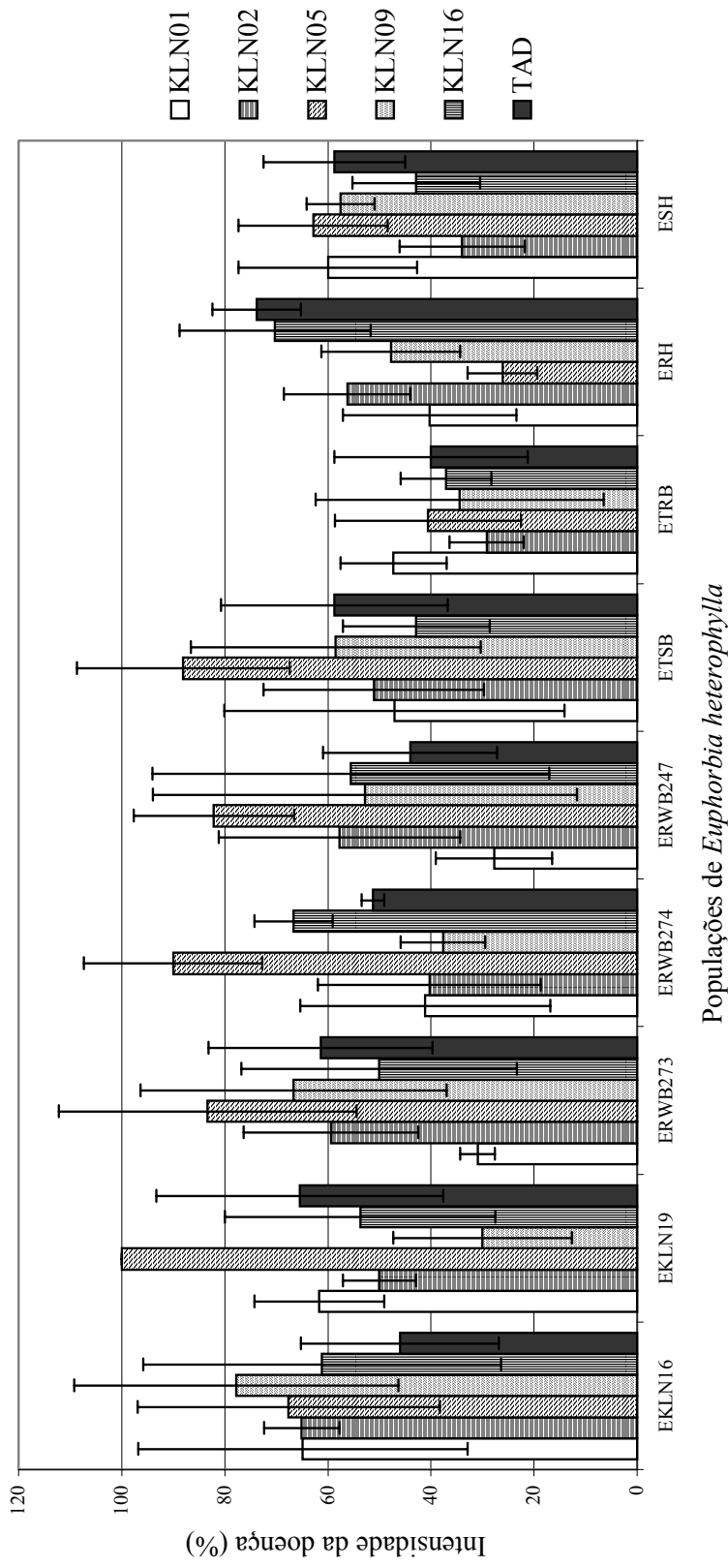


Figura 3: Intensidade da doença, calculada utilizando a porcentagem de folhas com sintomas e de plantas mortas, observada nas populações de *Euphorbia heterophylla*, sete dias após a inoculação com os isolados de *Bipolaris euphorbiae*. No caso de plantas mortas considerou-se 100%. Médias= três repetições; Barra=desvio padrão.

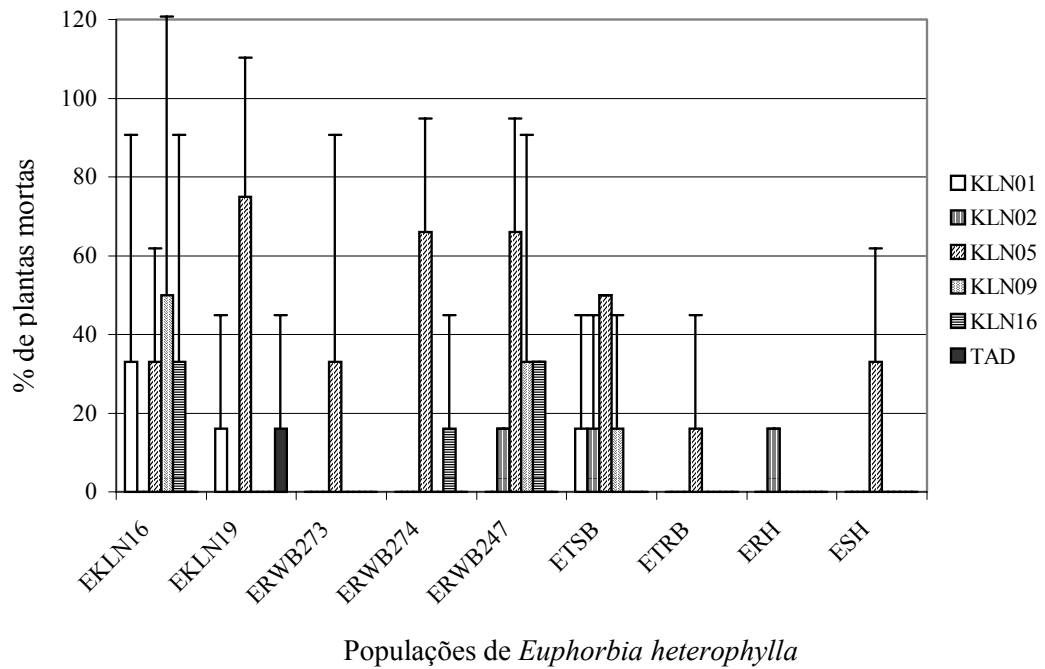


Figura 4: Incidência de plantas mortas observada nas populações de *Euphorbia heterophylla*, sete dias após a inoculação com isolados de *Bipolaris euphorbiae*. Médias= três repetições; Barra=desvio padrão.

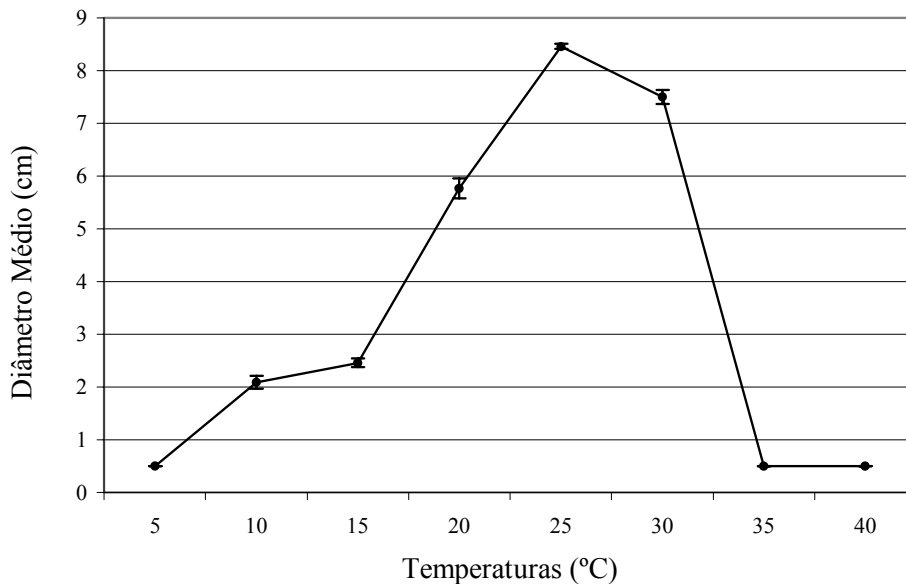


Figura 5: Diâmetro médio de *B. euphorbiae* (KLN05), sete dias após semeio em meio CVA na faixa de temperatura de 5 a 40°C. Médias = cinco repetições; Barra = desvio padrão. Valor 0,5=tamanho inicial do disco de micélio.

placas mantidas anteriormente nas temperaturas 5 e 35°C. Houve ressecamento do meio de cultura e morte do micélio a 40°C. Embora não tenha sido quantificada a produção de esporos, observou-se a presença de conídios de *B. euphorbiae* entre 15 e 30°C. A germinação dos conídios ocorreu entre 5 e 30°C. Na faixa de 20 a 30°C foi observada o maior porcentual de conídios germinados (Figura 6).

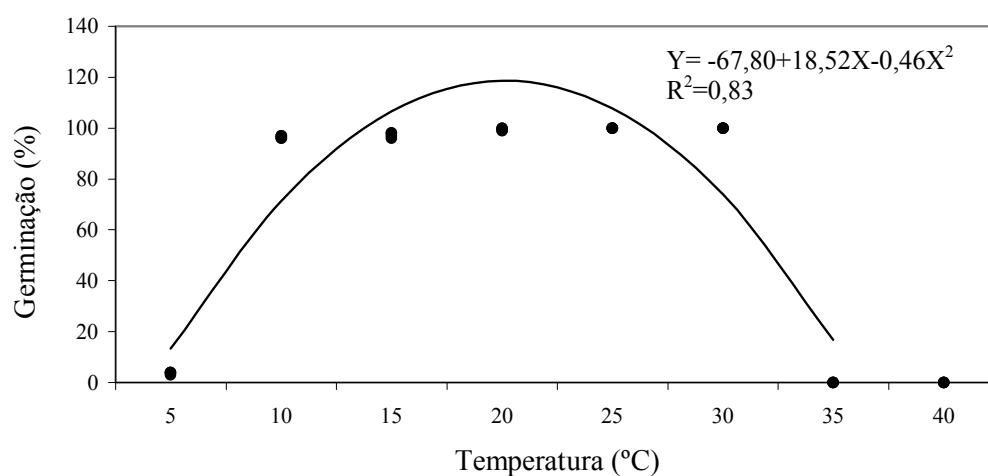


Figura 6: Efeito da temperatura na germinação de conídios de *B. euphorbiae* (KLN05).

Efeito de herbicidas químicos em duas dosagens na germinação *in vitro* de conídios de *B. euphorbiae*

Os conídios de *B. euphorbiae* germinaram em mistura com todos os herbicidas independente da dosagem utilizada. Os valores médios obtidos, incluindo a testemunha, variaram de 99,6 a 100% de conídios germinados.

Efeito de concentrações crescentes de inóculo na severidade da doença em duas populações de *E. heterophylla*

Para as duas populações EKLN19 e ETRB observou-se aumento da intensidade da doença em função do aumento da concentração de inóculo (Figura 7). Maior

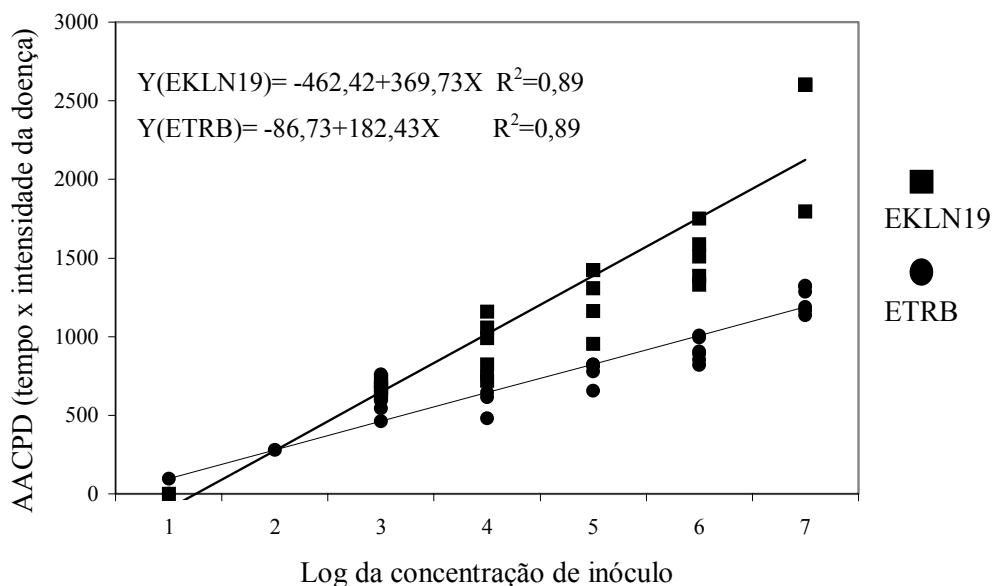


Figura 7: Efeito de concentrações de inóculo de *B. euphorbiae* KLN05 nos valores de área abaixo da curva de progresso da doença nas populações EKLN19 e ETRB de *E. heterophylla*.

intensidade foi observada nas plantas inoculadas com 10^7 conídios/mL para as duas populações. Com a utilização da suspensão de conídios nessa concentração, foi observada a morte de 80 % das plantas da população EKLN19. Nos demais tratamentos nessa população e em ETRB não foi observada morte de plantas. Os valores de intensidade de doença foram maiores em EKLN19 do que em ETRB, com exceção das plantas inoculadas com a concentração mais baixa testada (10^3 conídios/mL) em que não houve diferença entre as populações. O cálculo do intervalo de confiança a 95% de probabilidade, IC=217,93-156,67, (Campbell e Madden, 1990) para o parâmetro inclinação (r) confirmou a diferença significativa entre as estimativas das duas populações

Especificidade de *Bipolaris euphorbiae*

Não foram observados sintomas nas folhas, ramos ou inflorescências das 32 espécies testadas enquanto que as duas populações de *E. heterophylla* incluídas como controle positivo apresentaram sintomas cinco dias após a inoculação,

comprovando-se assim, a virulência do inóculo e a especificidade do fungo *B. euphorbiae* à *E. heterophylla* (Tabela 3).

Tabela 3: Teste de especificidade de *Bipolaris euphorbiae* *

Sub Classe Rosidae			
Ordem	Família	Nome Científico	Resultado ^a
Apiales	Apiaceae	<i>Daucus carota</i> L.	-
Euphorbiales	Euphorbiaceae	<i>Acalypha godseffiana</i> Masters	-
		<i>Acalypha reptans</i> Sw.	-
		<i>Acalypha wilkesiana</i> M. Arg.	-
		<i>Codiaeum variegatum</i> Blume	-
		<i>Chamaesyce hirta</i> (L.) Millsp.	-
		<i>Euphorbia cotinifolia</i> L.	-
		Euphorbia heterophylla população EKLN19	+
		população ETRB	+
		<i>Euphorbia milii</i> des Moulins	-
		<i>Euphorbia pulcherrima</i> Wild. ex Klot.	-
		<i>Euphorbia tirucali</i> L.	-
		<i>Hevea brasiliensis</i> Wild. ex Adr. de Juss.) Muell. & Arg.	-
		<i>Jatropha podagrica</i> Hook	-
		<i>Manihot esculenta</i> Crantz	-
		<i>Pedilanthus tithymaloides</i> Poit.	-
		<i>Phyllanthus corcovadensis</i> Roxb.	-
<i>Ricinus communis</i> L.	-		

Tabela 3, Cont.

Sub Classe Rosidae			
Ordem	Família	Nome Científico	Resultado ^a
Fabales	Fabaceae	<i>Glycine max</i> (L.) Merr. ^c	
		cv. UFV 19	-
		cv. UFV 16	-
		cv. UFV 16 Precoce	-
		cv. UFV 2001	-
		cv. UFV 2006	-
		cv. UFV 2007	-
		cv. UFV 2008	-
		cv. UFV 2009	-
		<i>Phaseolus vulgaris</i> L. ^c	-
Geraniales	Tropaeolaceae	<i>Tropaeolum majus</i> L.	-
Myrtales	Myrtaceae	<i>Eugenia uniflora</i> L.	-
Proteales	Proteaceae	<i>Grevillea banksii</i> R. Br.	-
Rhamnales	Vitaceae	<i>Vitis</i> sp.	-
Rosales	Rosaceae	<i>Rosa sinensis</i> Jacq.	-
Sapindales	Anacardiaceae	<i>Mangifera indica</i> L.	-
	Rutaceae	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	-
Espécies salvaguardas economicamente importantes			
Sub Classe Dilleniidae			
Malvales	Malvaceae	<i>Gossypium</i> sp. ^c	-
Sub Classe Commelinidae			
Cyperales	Poaceae	<i>Oryza sativa</i> L. ^b	-
		<i>Saccharum</i> sp. ^c	-
		<i>Triticum aestivum</i> L. ^b	-
		<i>Zea mays</i> L. ^c	-

^a(+) aparecimento de sintoma da doença.

(-) ausência de sintoma da doença.

^bEspécies hospedeiras do gênero *Bipolaris*.

^cEspécies economicamente importantes que sofrem competição de *Euphorbia heterophylla*.

*: isolado utilizado KLN05.

DISCUSSÃO

O isolado KLN05 destacou-se dentre os isolados testados. Entretanto, a expectativa era de que com o uso de uma suspensão de inóculo apropriada obter-se-ia 100% de controle da invasora. Entretanto, tal efeito foi observado apenas para o isolado KLN05 na concentração de 10^7 conídios/mL quando aplicado na população EKLN19. Para a população ETRB, a utilização de suspensões com concentrações mais elevadas chegou a provocar desfolha total, porém a haste continuou verde e novas folhas foram rapidamente formadas. Houve rebrota também em EKLN19, mas com poucas folhas e mais tardiamente. Para o sistema *E. heterophylla* em plantio de soja, a morte das invasoras não é uma exigência. A injúria causada pelo fungo à invasora poderá permitir que a cultura domine a invasora (abafamento), tornando-a não competitiva.

Gomes e Dianese (1987) relatam que o controle da invasora pelo fungo é obtido apenas em aplicações feitas nos estádios iniciais de desenvolvimento da planta, com até quatro a cinco folhas e apesar de ocorrerem lesões foliares nos outros estádios, as plantas se recuperam e emitem brotações laterais. Em condições naturais ideais, de precipitação anual entre 1000 e 1400 mm e temperatura média maior ou igual a 22°C, o fungo chega a causar severa desfolha e morte da invasora. Entretanto, epidemias naturais ocorrem normalmente quando a maioria das plantas já alcançou a maturidade e produziu sementes viáveis. Portanto, há necessidade de aplicação do fungo nos estádios iniciais de crescimento da planta (Barreto e Evans, 1998). Resultados contraditórios foram obtidos por Marchiori *et al.* (2001) em estudos com o isolado TAD ao verificarem maior suscetibilidade das plantas em estágio mais avançado (12 folhas por planta) quando comparado com os estádios de oito e dez folhas. Essa variação de resultados mesmo quando se usa o mesmo isolado pode refletir a variabilidade genética de *E. heterophylla* e destaca a importância de caracterizar as populações que se está testando para chegar-se a resultados mais consistentes.

Neste trabalho, a variabilidade genética de *E. heterophylla* foi observada também dentro da mesma população. Verificou-se um desvio padrão alto na seleção inicial em função da reação diferenciada de indivíduos da população. Por exemplo, o isolado KLN09 aplicado na população ERWB247 causou morte de plantas em algumas repetições enquanto nas demais apenas sintomas da doença nas folhas. O mesmo foi verificado para outras interações isolado x população. A utilização de suspensões com alta concentração de inóculo poderia uniformizar as reações das populações.

A constatação da necessidade de uma concentração de inóculo muito elevada (10^7 conídios/mL) dificulta o desenvolvimento de um micoherbicida por aumentar o custo da produção massal do fungo. Para a obtenção de esporos utilizou-se nesse trabalho a fermentação difásica (Jackson *et al.*, 1996) comprovadamente eficaz para outros hifomicetos (Walker, 1980). O uso de grãos de cereais para viabilizar a produção de inóculo vem sendo testado bem como a viabilidade de esporos armazenados (Marchiori *et al.*, 2001). Espera-se que avanços neste campo permitam aumentar a produção de inóculo e reduzir o custo de produção de esporos deste fungo.

Em relação às características fisiológicas estudadas, o crescimento micelial do isolado KLN05 seguiu o padrão verificado para *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. in Sorok). Entre 26 a 28°C houve maior crescimento micelial (Prates e Fernandes, 2000). A mistura com herbicidas não teve efeito sobre a germinação *in vitro* dos conídios de *B. euphorbiae* e abre caminho para o seu teste em aplicações sobre plantas. Gazziero e Yorinori (1993) relatam que o herbicida fomesafen inibe a germinação do isolado TAD, o que não foi verificado para o novo isolado selecionado KLN05. A combinação com herbicidas químicos pode aumentar a eficácia e o espectro de controle do micoherbicida e reduzir a dose de herbicida necessária para o controle de invasoras (Hoagland, 1996). O micoherbicida Collego[®], produzido com *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. f.sp. *aeschynomene* para o controle de *Aeschynomene virginica* (L.) Britton, Poggenb & Sterns, é integrado com os herbicidas acifluorfen, bentazon e propanil para o controle de várias invasoras no arroz e a mistura com esses produtos aumenta o espectro de espécies controladas pelo micoherbicida nas culturas da soja e arroz (Smith Jr., 1991).

Os resultados do teste centrífugo-filogenético indicam a elevada especificidade do isolado KLN05 à *E. heterophylla*. Vários procedimentos têm sido propostos para se estabelecer a gama de hospedeiros com segurança, mas sem a necessidade de testar uma lista demasiadamente grande de espécies de plantas. Weidemann e Tebeest (1990) ressaltam a importância da variabilidade e estabilidade genética, tanto da invasora como do agente de controle, sugerindo a inclusão, nestes testes, de taxa que representem a gama total de diversidade genética dentro da área biogeográfica de intenção de uso do agente de controle, logicamente uma tarefa de difícil execução.

Além de *B. euphorbiae* há outros fungos fitopatogênicos associados a essa invasora, que são considerados promissores para futuros estudos, tais como *A. euphorbiicola* (Yorinori, 1985) e *S. poinsettiae* (Barreto e Evans, 1998). A

combinação de *B. euphorbiae* que provoca desfolha em *E. heterophylla* e *A. euphorbiicola* e *S. poinsettiae* que causam lesões e estrangulamento em hastes desta planta pode representar outra alternativa interessante a ser explorada.

A variabilidade dos isolados selecionados, demonstrada pelas reações das plantas, indica que a busca por germoplasma de *B. euphorbiae* não deve ser encerrada. Necessita-se, por exemplo, de isolados com maior agressividade contra a população ETRB que é mais resistente aos isolados disponíveis do fungo até o momento. Além disso, outras estratégias podem ser exploradas para aumentar a eficiência de *B. euphorbiae*, como a combinação do micoherbicida com herbicidas químicos e o uso de adjuvantes em formulação mais apropriada do fungo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Auld, B.A. 1997. Bioherbicides. In: "Biological Control of Weeds: theory and practical application", (Julien, M.; White, G., Eds), pp.129-134. ACIAR Monograph nº49, Australia.
- Barreto, R.W.; Evans, H.C. 1998. Fungal pathogens of *Euphorbia heterophylla* and *E. hirta* in Brazil and their potential as weed biocontrol agents. *Mycopathol.* **141**, 21-36.
- Campbell, C.L.; Madden, L.V. 1990. "Introduction to Plant Disease Epidemiology". John Wiley & Sons, New York. 532p.
- Dhingra, O.D.; Sinclair, J.B. 1995. "Basic Plant Pathology Methods". CRC Press, New York. 434p.
- Charudattan, R. 1990. The mycoherbicide approach with plant pathogens. In "Microbial Control of Weeds", (D. O. TeBeest, Ed.). pp. 24-57. Chapman and Hall, New York.
- Foloni, L.L.; Christoffoleti, P.J. 1999. Chemical weed control in soybean in Brazil using new herbicides and mixtures. In: "Proceedings of the 1999 Brighton Conference Weeds.", (The British Crop Protection Council, Ed.), pp. 315-318, 1999, Brighton British Crop Protection Council, Brighton, UK.
- Gazziero, D.L.P.; Yorinori, J.T. 1993. "Experiência sobre controle biológico de *Euphorbia heterophylla* no Brasil". FCAV, Jaboticabal.
- Gomes, S.M.; Dianese, J.C. 1987. Efeito de *Helminthosporium* sp. sobre estágios de desenvolvimento do leiteiro (*Euphorbia heterophylla* L.). *Fitopatol. Bras.* **12**,138.

- Hoagland, R.E. 1996. Chemical interactions with bioherbicides to improve efficacy. *Weed Technol.* **10**, 651-674.
- Jackson, M.A.; Schisler, D.A.; Slininger, P.J.; Boyette, C.D.; Silman, R.W.; Bothast, R.J. 1996. Fermentation strategies for improving the fitness of a bioherbicide. *Weed Technol.* **10**, 645-650.
- Kissmann, K.G.; Groth, D. 1993. "Plantas infestantes e nocivas. Tomo II". Basf Brasileira, São Paulo, 798p.
- Lorenzi, H.J. 2000. "Plantas Daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais". Nova Odessa, São Paulo.
- Marchiori, R.; Nachtigal, G.F.; Coelho, L.; Yorinori, J.T. Pitelli, R.A. 2001. Comparison of culture media for the mass production of *Bipolaris euphorbiae* and its impact on *Euphorbia heterophylla* dry matter accumulation. *Summa Phytopathol.* **27**, 428-432.
- Melhorança, A.L.; Pereira, F.A.R. 1999. Eficiência do herbicida lactofen no controle de *Euphorbia heterophylla*, resistente aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS). *Documentos-Embrapa Agropecuária Oeste* **3**, 11-14.
- Muchovej, J.J.; Carvalho, A.O. 1989. A new combination for *Helminthosporium euphorbiae*. *Mycotaxon* **35**, 159-162.
- Pereira, J.M.; Barreto, R.W.; Ellison, C.A.; Maffia, L.A. 2003. *Corynespora cassiicola* f. sp. *lantanae*: a potential biocontrol agent for *Lantana camara* from Brazil. *Biol Control.* **26**, 21-31
- Prates, L.G.; Fernandes, J.M.C. 2000. Efeito da temperatura no crescimento micelial de *Bipolaris sorokiniana*. *Fitopatol Bras.* **25**, 661-663.
- Smith Jr., R.J. 1991. Integration of biological control agents with chemical pesticides. In "Microbial Control of Weeds", (D. O. TeBeest, Ed.). pp. 189-208. Chapman and Hall, New York.
- Tebeest, D.O.; Yang, X.B.; Cisar, C.R. 1992. The status of biological control of weeds with fungal pathogens. *Ann. Rev. of Phytopathol.* **30**, 637-657.
- Timossi, A.J. 2002. "I Levantamento de safra 2002/2003 FNP Consultoria & Comércio: Grãos (milho e soja)". FNP Agroinformativos, Brasil.
- Vidal, R.A.; Fleck, N.G. 1997. Three weed species with confirmed resistance to herbicides in Brazil. In: "Meeting of the Weed Science Society of America", WSSA Abstracts, pp.100, 1997.
- Walker, L. 1980. Production of spores for field studies. *Adv. Agric. Technol.* **12**, 1-5.
- Wapshere, A.J. 1974. A strategy for evaluating the safety of organisms for biological weed control. *Ann. App. Biol.* **77**, 201-211.

- Weidemann, G.J.; TeBeest, D.O. 1990. Biology of host range testing for biocontrol of weeds. *Weed Techn.* **4**, 465-470.
- Yorinori, J.T. 1984. Biological control of milkweed (*Euphorbia heterophylla*) with pathogenic fungi. In: "Proceedings of the VI International Symposium on Biological Control of Weeds.", (Delfosse, E.S. Ed.), pp.677-681, 1985, Vancouver Agriculture Canada, Vancouver, Canada.
- Yorinori, J.T. 1987. Controle biológico de ervas daninhas com microrganismos. In: "Anais da II Reunião sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas", (Fundação Cargill. Ed.), pp.20-30, 1987, Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz", Piracicaba, São Paulo.
- Yorinori, J.T.; Gazziero, D.L.P. 1989. Control of milkweed (*Euphorbia heterophylla*) with *Helminthosporium* sp. In: "Proceedings of the VII International Symposium on Biological Control of Weeds.", (Delfosse, E.S. Ed.), pp.571-576, 1989, Rome Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale, Rome, Italy.

**AVALIAÇÃO DE *Sphaceloma poinsettiae*, AGENTE CAUSAL DA VERRUGOSE
EM *Euphorbia heterophylla*, COMO MICOHERBICIDA**

RESUMO

O potencial de *Sphaceloma poinsettiae* como micoherbicida no controle de *Euphorbia heterophylla* foi verificado. As nove populações de *E. heterophylla* apresentaram graus variáveis de suscetibilidade aos 10 isolados de *S. poinsettiae*. Um isolado foi selecionado para estudos de otimização por causar sintoma de verruga com anelamento das hastes na maioria das plantas das populações testadas. Em alguns casos, observou-se a morte das plantas. A utilização de suspensão de conídios como propágulo infectivo resultou em baixa severidade da doença em *E. heterophylla*. Os fragmentos de micélio foram usados como inóculo em substituição aos conídios e sua virulência foi maior quando produzido em meio de cultura líquido de batata dextrose. Entretanto, a viabilidade desses propágulos durante o armazenamento declinou rapidamente, tanto em temperatura ambiente como a 4°C. Após 25 dias, o maior porcentual de ufc viáveis foi de apenas 60% quando o propágulo foi mantido a 4°C em suspensão com água destilada esterilizada ou solução de sacarose 35% esterilizada. O crescimento radial micelial em meio sólido foi observado na faixa de temperatura de 10 a 30°C, sendo máximo a 25°C. A brotação de fragmentos de micélio ocorreu a 20, 25 e 30°C. Maior massa fúngica fresca de *S. poinsettiae* foi obtida em meio líquido de batata dextrose com 12 dias de agitação a 30 rpm a temperatura ambiente. *S. poinsettiae* foi específico a *E. heterophylla*. Existem ainda limitações importantes para o uso de *S. poinsettiae* como agente de controle biológico de *E. heterophylla*.

ABSTRACT

The potential of *Sphaceloma poinsettiae* as mycoherbicide to control of *Euphorbia heterophylla* was studied. The nine populations of *E. heterophylla* differed in susceptibility to 10 isolates of this fungus. One isolate was selected for optimization to cause the blister symptoms with stem girdling in most plants. Plant mortality was

observed in some cases. Utilization of conidial suspension as infective propagules resulted in low disease severity on *E. heterophylla*, therefore mycelial fragments were used as inoculum whose virulence was greater when produced on potato dextrose broth. However, the viability of these propagules declined rapidly during storage at room temperature or at 4°C, reaching 60% after 25 days storage at 4°C in sterile distilled water or 35% sucrose. The radial mycelial growth in solid media occurred in the temperature range of 10 to 30°C, with optimum at 25°C. The mycelial fragments sprouted at 20, 25 and 30°C. The maximum fungal mass of *S. poinsettiae* was obtained on potato dextrose broth after 12 days growth on a shaker at 30 rpm, at room temperature. *S. poinsettiae* was specific to *E. heterophylla*. There are important limitations for the use of *S. poinsettiae* as biological control agent of *E. heterophylla*.

INTRODUÇÃO

Os fungos *Alternaria euphorbiicola* Simmons & Engelhard, *Bipolaris euphorbiae* (Hasnford) Muchovej e *Sphaceloma poinsettiae* Jenkins & Ruehle, comumente associados à *Euphorbia heterophylla* L (conhecida popularmente como leiteiro ou amendoim-bravo) destacam-se como promissores agentes de controle biológico dessa invasora no Brasil (Yorinori, 1985; Barreto e Evans, 1998) e vêm sendo avaliados para o uso como micoherbicida. A verrugose do leiteiro, causada por *S. poinsettiae* é uma das doenças mais freqüentemente observadas nessa espécie em condições naturais. O sintoma característico é o aparecimento de verrugas corticiformes nas folhas e hastes que em alguns casos levam ao anelamento da haste e ocasionam a morte da planta. Inoculações feitas por Barreto e Evans (1998) com suspensão de conídios de *S. poinsettiae* resultaram na infecção e morte rápida de plantas, tanto em estádio cotiledonar como no 1º estádio foliar.

A busca por métodos de controle alternativo é estimulada pela importância de *E. heterophylla* como uma das principais invasoras da cultura da soja no Brasil. O principal dano à produção da soja é sua interferência na colheita mecanizada e transferência de umidade aos grãos colhidos devido ao látex por ela produzido (Kissmann e Groth, 1992). Estima-se que mais de 90 % das áreas de soja no Brasil dependem de aplicações de herbicidas químicos para reduzir a competição de invasoras

(Foloni e Christoffoleti, 1999). Os herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) são as principais ferramentas para o controle de *E. heterophylla* em campos de soja. Entretanto, o uso intensivo resultou na seleção de populações da planta comprovadamente resistentes a esses herbicidas (Gazziero *et al.* 1998; Melhorança e Pereira, 1999).

No primeiro programa visando o desenvolvimento de um micoherbicida no Brasil, a planta alvo escolhida foi *E. heterophylla* (Yorinori, 1985; Yorinori, 1987; Gazziero e Yorinori, 1993). No entanto, observou-se que a variabilidade genética que a planta apresenta também interfere na eficiência de controle de populações pelo fungo escolhido para o estudo (*B. euphorbiae*) (Yorinori e Gazziero, 1989). Os autores verificaram que existem populações com graus variáveis de suscetibilidade ao fungo e uma foi destacada por apresentar todas as plantas resistentes ao fungo. Nesse contexto, a avaliação de *A. euphorbiicola* e *S. poinsettiae* como complementares ou em substituição à *B. euphorbiae* passa a merecer atenção.

Os objetivos desse trabalho foram selecionar um isolado de *S. poinsettiae* baseado na severidade da doença em nove populações de *E. heterophylla* em condições controladas, testar sua especificidade, avaliar a virulência de conídios e do micélio do fungo e verificar a sobrevivência de fragmentos de micélio durante armazenagem.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Obtenção dos isolados de *Sphaceloma poinsettiae*:

Os isolados foram obtidos de plantas de *E. heterophylla* com sintomas de verrugose coletadas nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul, no Brasil (Tabela 1). Esse material foi herborizado e incorporado à coleção micológica do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. A partir das verrugas nas hastes foi feito isolamento indireto em meio BDA (batata dextrose agar) suplementado com sulfato de estreptomicina (1,5 g/L) e rosa de bengala (0,25 mg/L) segundo metodologia descrita por Mungo *et al.* (1998). Os isolados obtidos foram conservados *in vitro* pelo método de preservação em sílica-gel (Dhingra e Sinclair, 1995).

Tabela 1: Origem dos isolados de *Sphaceloma poinsettiae* utilizados na seleção inicial.

Código	Origem
KLN01	Viçosa-MG
KLN12	Italva-RJ
KLN13	Campos-RJ
KLN14	Italva-RJ
KLN16	Niterói-RJ
KLN21	Viçosa-MG
RWB 273	Foz do Iguaçu-RS
RWB274	Nova Laranjeira-PR
RWB280	Nova Petrópolis-RS
RWB281	Mafra-PR

2. Produção de inóculo:

O fungo foi semeado em placas de Petri contendo meio BDA. As placas foram mantidas por 10 dias a 25°C no escuro. Dez discos de micélio provenientes dessas placas foram transferidos para erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio BD (batata dextrose) e colocados em agitador orbital a 30 rpm por 10 dias a temperatura ambiente. Após esse período, o micélio foi triturado dentro do erlenmeyer, utilizando um microtriturador/homogeneizador, e uma parte utilizada como inóculo. A outra parte do micélio triturado foi transferida assepticamente para erlenmeyers contendo 100 mL de meio BD (10 mL de micélio triturado/100 mL de meio) e colocados novamente em agitação a 30 rpm. Após dois dias, fez-se a filtração, utilizando gaze, para a obtenção da suspensão de esporos.

3. Obtenção de sementes das populações de *Euphorbia heterophylla*:

As populações foram diferenciadas pelo local de coleta ou por uma característica particular, como a resistência ao herbicida imazetaphyr (material obtido no Laboratório de Herbicida na Planta da Universidade Federal de Viçosa) e resistência ao fungo *B. euphorbiae* (doação de J.T. Yorinori, Embrapa Soja, provenientes de campos

experimentais do Paraná). As sementes das populações utilizadas (Tabela 2) foram coletadas e armazenadas a 5°C. Sementes pré-germinadas foram transferidas para copos plásticos com capacidade de 500 mL em condições controladas (26±2°C). As inoculações foram realizadas quando as plantas estavam com três a quatro pares de folhas definitivas.

Tabela 2: Origem das populações de *Euphorbia heterophylla* utilizadas nos experimentos.

Código	Origem
EKLN16	Niterói-RJ
EKLN19	Viçosa-MG
ERWB 247	Itabuna-BA
ERWB 274	Nova Laranjeira-PR
ERWB 280	Nova Petrópolis-RS
ETSB	Londrina-PR
ETRB	Londrina-PR (resistente à <i>B. euphorbiae</i>)
ESH	Viçosa-MG
ERH	Viçosa-MG (resistente à imazethapyr)

4. Seleção de isolado de *S. poinsettiae*

Plantas de *E. heterophylla* foram inoculadas com uma suspensão de 10⁴ ufc/mL + Tween 20 0,05% (polioxietileno monolaurático) + Break thru® 0,05% (copolímero poliéter- polimetil siloxano + poliéter) e mantidas em câmara de nevoeiro a 25°C por 48 horas. Após esse período foram levadas para casa de vegetação (26±2°C) e as avaliações da severidade realizadas a cada sete dias, durante 30 dias. A severidade foi baseada numa escala de notas de 0 a 6, onde 0= ausência de sintomas, 1=traço de verruga, 2=mancha, 3=mancha deprimida ou início de verruga, 4=verruga, 5=verruga com estrangulamento da haste e 6=planta morta (Figura 1). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial de 10 isolados, nove



Figura 1: Notas, 1, 2, 3, 4 e 6 da escala utilizada para avaliação da severidade em plantas de *E. heterophylla* inoculadas com os isolados de *S. poinsettiae*.

populações, três repetições, sendo cada repetição um vaso com duas plantas. Plantas pulverizadas com água + Tween 20 (0,05%) + Break thru® (0,05%) constaram como controle.

5. Efeito da temperatura no crescimento radial micelial do fungo e na viabilidade de fragmentos de micélio:

O crescimento radial micelial do fungo foi avaliado nas temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40°C. No centro de placas de Petri contendo meio BDA foi semeado um disco de micélio de *S. poinsettiae* com 5 mm de diâmetro. Após 30 dias, mediu-se o diâmetro da colônia ortogonalmente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo cada placa de Petri considerada uma repetição. Para a avaliação da viabilidade dos fragmentos de micélio utilizou-se uma suspensão de micélio triturado produzido conforme descrito no item 2. Uma alíquota de 500 µL de uma suspensão de 10^4 ufc/mL foi espalhada em placas de Petri contendo ágar-água. As placas foram colocadas em incubadoras ajustadas para as temperaturas citadas acima. A avaliação foi feita após 24 e 48 horas e foram examinados os primeiros 200 fragmentos de micélio em cada placa. Os fragmentos foram considerados viáveis quando a extensão do crescimento da hifa era maior ou

igual ao tamanho do fragmento. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo cada repetição uma placa de Petri.

6. Crescimento micelial de *S. poinsettiae* em meio líquido:

Em erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio BD foram semeados cinco discos de micélio do fungo provenientes de uma cultura de 10 dias formada em meio BDA. Após o semeio, os erlenmeyers foram colocados em agitador orbital a 30 rpm a temperatura ambiente. Avaliou-se a massa fúngica fresca durante 18 dias em intervalos de três dias. A cada avaliação quatro frascos eram retirados e o micélio filtrado e pesado em balança de precisão. A filtração do micélio foi feita em bomba de vácuo, utilizando papel de filtro, até o ponto em que não se observou mais a umidade do papel de filtro. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo cada repetição um erlenmeyer.

7. Viabilidade de fragmentos de micélio durante armazenagem:

Para verificar a vida de prateleira dos fragmentos de micélio, o micélio formado em meio BD após 10 dias foi triturado dentro do erlenmeyer e separado por filtração em bomba de vácuo. Os propágulos obtidos foram processados das três maneiras descritas a seguir: 1) mantidos em água destilada e esterilizada, 2) misturados com talco neutro e colocados no dessecador por 24 horas e 3) mantidos em uma solução de sacarose 35% com agitação por 24 horas antes do armazenamento. Em todos os tratamentos, as amostras foram armazenadas em frascos de vidros tanto no ambiente como a 4°C. As avaliações foram feitas em intervalos de 15 dias suspendendo o material em água destilada e esterilizada. Uma alíquota de 500 µL dessa suspensão foi espalhada em placas de Petri contendo ágar-água contando-se o número de ufc viáveis após 24 horas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial de três tratamentos, duas temperaturas de armazenamento e cinco repetições, sendo cada repetição uma placa de Petri.

8. Efeito da concentração de conídios na severidade da doença em duas populações de *E. heterophylla*:

As populações EKLN19 e ETRB, consideradas como padrão de suscetibilidade e resistência ao fungo, respectivamente, foram inoculadas com suspensões de 0, 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7 conídios/mL + Tween 20 (0,05%) + Break Thru[®] (0,05%) e colocadas em câmara de nevoeiro a 25°C por 48 horas. Após esse período, foram transferidas para condições controladas (26±2°C) e a severidade avaliada a cada sete dias, com base na escala de notas descrita no item 4, durante 35 dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial de seis concentrações, duas populações e cinco repetições, sendo cada repetição um vaso com uma planta.

9. Efeito de quatro meios de cultura líquido na virulência do inóculo produzido:

Os fragmentos de micélio foram obtidos a partir do crescimento nos meios líquidos de BD, Cenoura (decoção de 200 g de cenoura, 20 g dextrose, 1 L de água), Mandioca (decoção de 200 g folha de mandioca, 20 g dextrose, 1 L de água) e CV (meio CVA, caldo de vegetais ágar, Pereira *et al.*, 2003, sem adição de ágar). Plantas das populações EKLN19 e ETRB foram inoculadas com uma suspensão de 1×10^4 ufc/mL de cada tratamento + Tween 20 (0,05 %) + Break Thru[®] (0,05 %) permanecendo um grupo em câmara de nevoeiro a 25°C por 24 horas e outro, por 48 horas. Após esse período, as plantas foram transferidas para casa de vegetação (26±2°C) e a severidade avaliada durante 30 dias, em intervalos semanais, com base na escala de notas descrita no item 4. Plantas pulverizadas com água + Tween 20 (0,05%) + Break Thru[®] (0,05%) serviram como controle. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial de quatro meios de cultura, duas populações, dois períodos de molhamento e cinco repetições, sendo cada repetição um vaso com uma planta.

10. Especificidade de *Sphaceloma poinsettiae*.

As espécies foram escolhidas segundo o método centrífugo-filogenético (Wapshere, 1974). Foram incluídas espécies representantes da Subclasse Rosidae com ênfase no gênero *Euphorbia* e família Euphorbiaceae e, adicionalmente, algumas espécies economicamente importantes, plantas sabidamente hospedeiras de fungos do

gênero *Sphaceloma* e oito cultivares de soja, considerando futura exposição da cultura a um micoherbicida produzido com *S. poinsettiae* (Tabela 3). Para confirmação da virulência do inóculo utilizado foram incluídas as populações EKLN19 e ETRB de *E. heterophylla*. As plantas foram inoculadas com uma suspensão de 1×10^5 ufc/mL + óleo mineral (5%) + Break thru[®] (0,05%) e levadas para câmara de nevoeiro a 25°C por 48 horas. Em seguida, foram transferidas para casa de vegetação (26±2°C). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições, sendo cada repetição um vaso com uma planta. Plantas pulverizadas com água + óleo mineral (5%) + Break thru[®] (0,05%) serviram como controle. As avaliações foram feitas a cada sete dias, durante 35 dias, verificando a presença ou não de sintomas da doença nas folhas e ramos.

11. Análise estatística dos dados:

As notas de severidade obtidas na seleção inicial foram transformadas para valores quantitativos utilizando o Índice de McKinney (McKinney, 1923) para o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (Campbell e Madden, 1990). Os demais dados foram submetidos à análise de variância usando o proc GLM do programa SAS versão 6.12.

RESULTADOS

Seleção de isolado de *S. poinsettiae*

Todos os isolados testados foram patogênicos a *E. heterophylla*, mas houve diferença de virulência entre os isolados (Figura 2). Os maiores valores de AACPD foram observados nas plantas inoculadas com KLN01, RWB274 e KLN21. A reação da maioria das plantas aos isolados KLN01 e RWB274 foi caracterizada pelo sintoma de verruga com estrangulamento da haste e, em alguns casos, morte das plantas. Para a escolha entre esses isolados, adotou-se como critério a severidade observada na população ETRB. Em função disso, RWB 274 foi selecionado por ser o único a causar início de estrangulamento nas plantas dessa população, embora em apenas outras três populações tenha obtido maiores valores de progresso da doença.

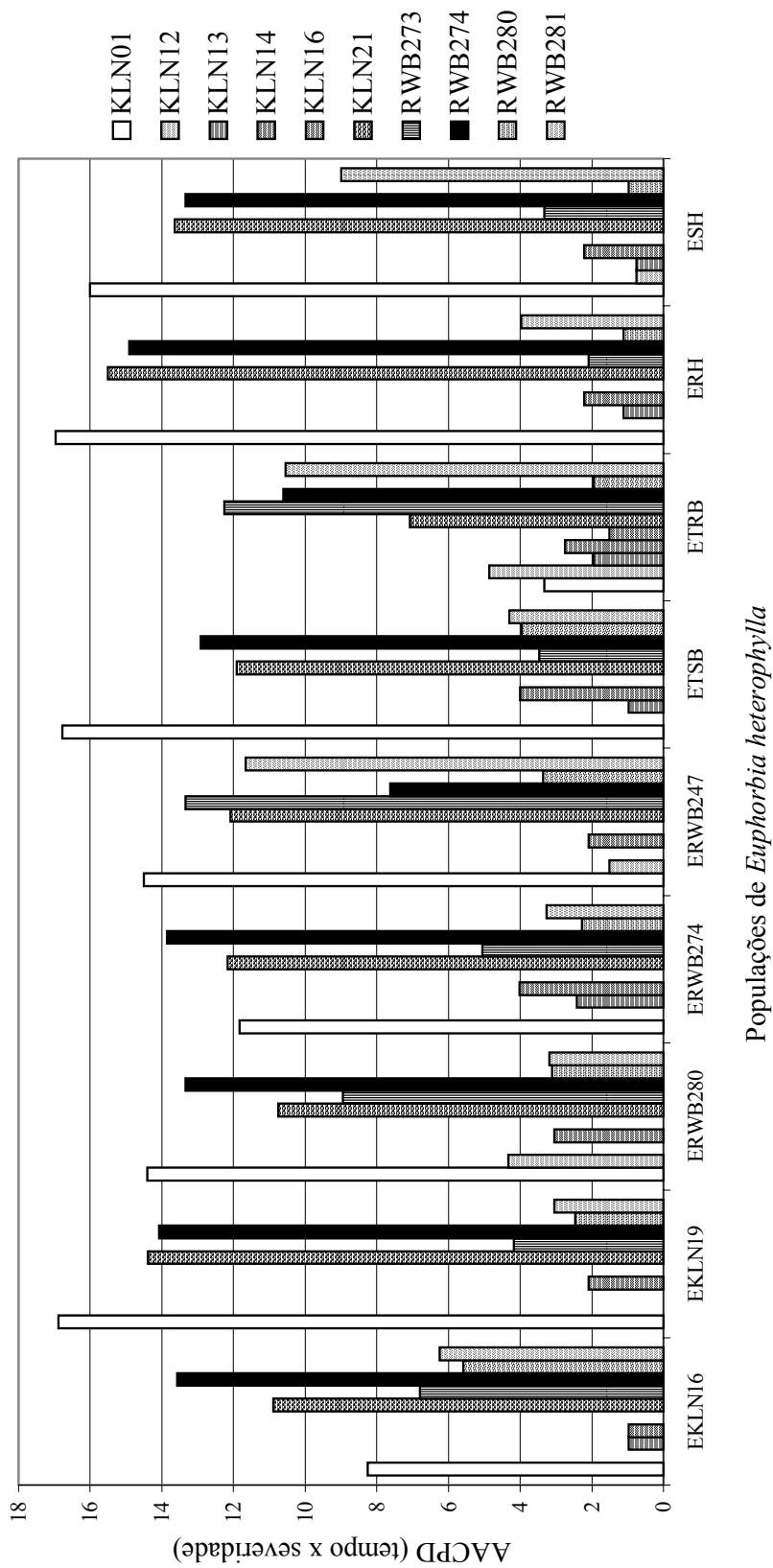


Figura 2: Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de isolados de *Sphaceloma poinsettiae*, calculada utilizando o índice de McKinney, em populações de *Euphorbia heterophylla*.

Efeito da temperatura no crescimento micelial e viabilidade de fragmentos de micélio

O crescimento micelial de *S. poinsettiae* em meio sólido foi lento. O diâmetro máximo foi de 3,38 cm a 25°C. O crescimento micelial decresceu nas temperaturas de 10, 15, 20 e 30°C. Não houve crescimento a 5, 35 e 40°C (Figura 3). As colônias nessas temperaturas retomaram o crescimento quando colocadas a 5°C, indicando que o fungo sobrevive nestas temperaturas. Em nenhuma temperatura foi observada a presença de conídios. A viabilidade de ufc ocorreu a 20, 25 e 30°C (Figura 4).

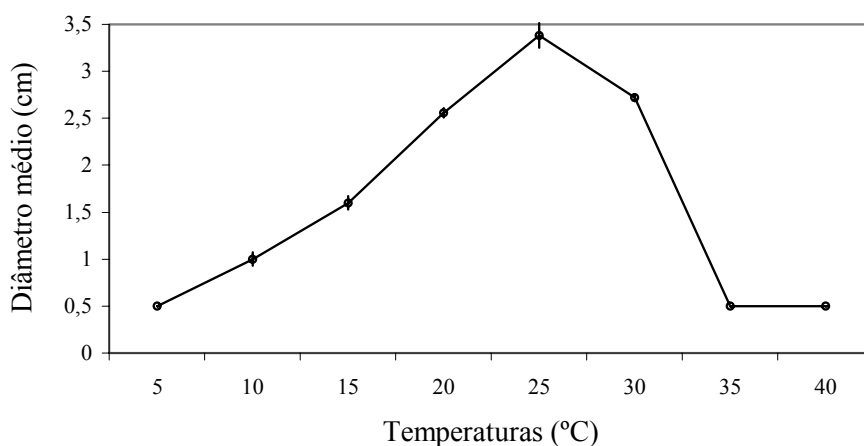


Figura 3: Diâmetro médio da colônia de *Sphaceloma poinsettiae* (RWB274), 30 dias após semente em meio BDA. Médias = cinco repetições; Barras = desvio padrão. Valor 0,5 = tamanho inicial do disco de micélio.

Crescimento micelial de *S. poinsettiae* em meio líquido

O crescimento da massa fúngica de *S. poinsettiae* teve praticamente o mesmo incremento nos intervalos de três a seis (0,86 g) e seis a nove dias (0,8 g) após o semente. O maior ganho de massa foi observado entre nove e 12 dias (2,2 g) seguido de 12 e 15 dias (1,13 g). Apesar de maior massa de micélio fresco ter sido medida aos 18 dias (5,70 g), esse valor não diferiu significativamente da massa medida aos 12 dias (5,45 g). Conclui-se que um período de 12 dias de agitação em meio BD é suficiente para obtenção de máxima massa fúngica em meio líquido de *S. poinsettiae* (Figura 5). Não foi observada a fase de declínio no período de crescimento avaliado.

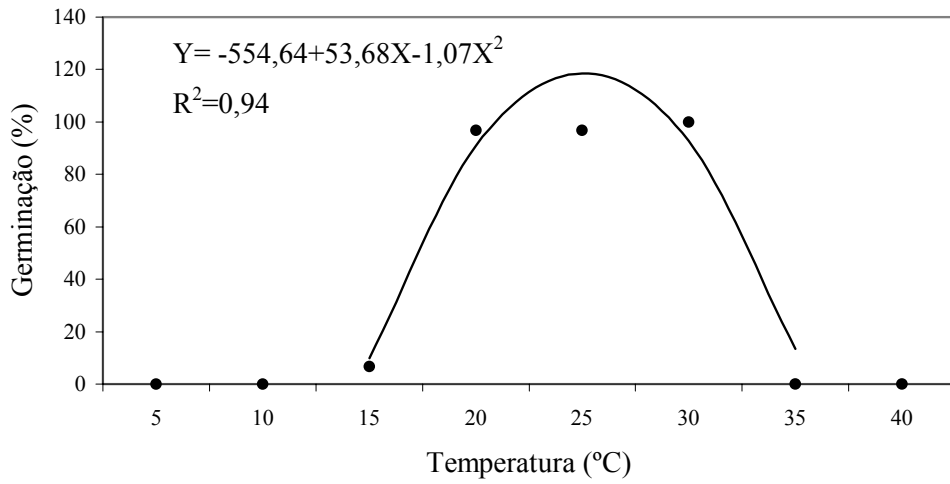


Figura 4: Efeito da temperatura na viabilidade de ufc de *Sphaceloma poinsettiae* RWB274.

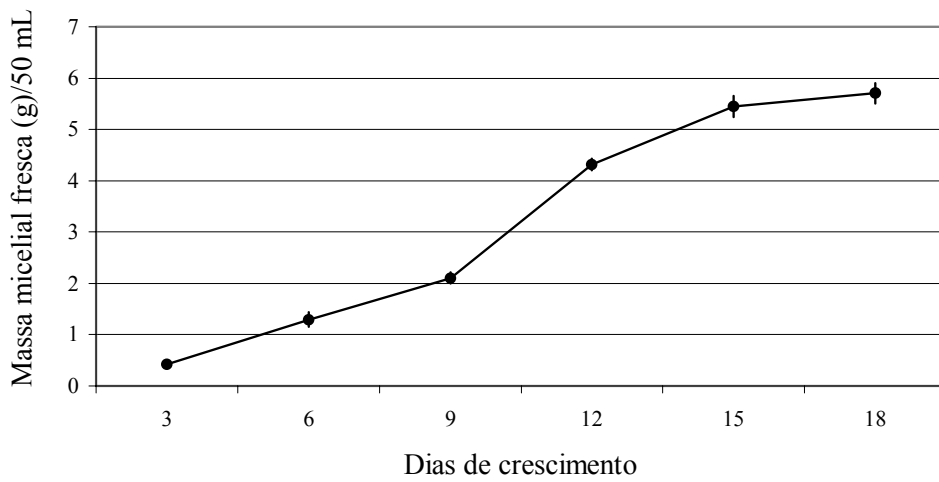


Figura 5: Massa micelial fresca (g) de *S. poinsettiae* aos 3, 6, 9, 12, 15 e 18 dias após semeio em meio líquido de Batata Dextrose. Médias = cinco repetições; Barras = desvio padrão.

Viabilidade de fragmentos de micélio durante a armazenagem

Nenhum dos tratamentos permitiu a preservação de mais de 60% da viabilidade dos propágulos, 27 dias após o armazenamento (Figura 6). A porcentagem de ufc viáveis foi menor no tratamento em que os fragmentos de micélio foram misturados com talco e armazenados tanto em temperatura ambiente como a 4°C. Essa porcentagem aumentou quando os fragmentos foram armazenados em suspensão e não diferiu entre suspensão em água destilada esterilizada ou em solução de sacarose 35% esterilizada. Observou-se que, 27 dias após o armazenamento, a porcentagem de ufc viáveis a temperatura ambiente, em mistura com água e solução de sacarose foi de 32,6 e 30,2%, enquanto a 4°C aumentou para 54,4 e 56,2%, respectivamente.

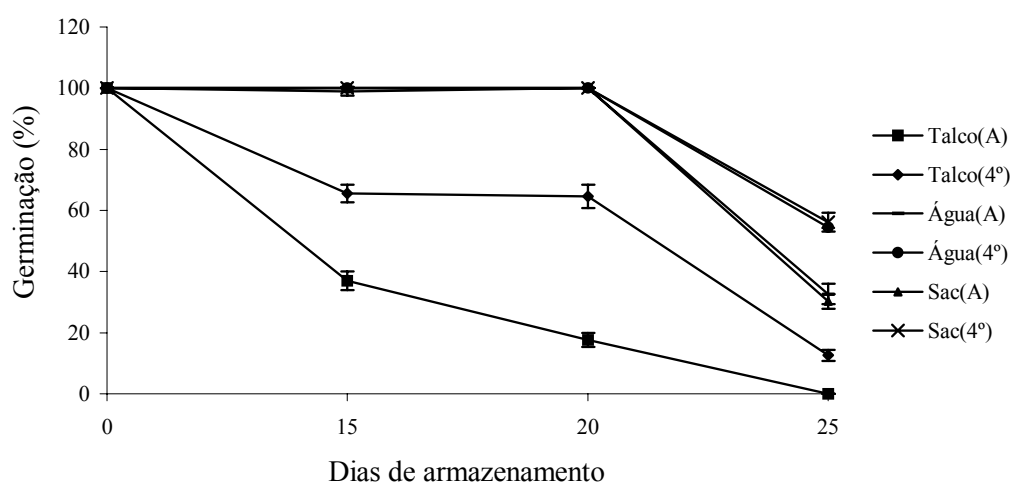


Figura 6: Efeito do armazenamento de fragmentos de micélio de *Sphaceloma poinsettiae* RWB 274 em suspensão de água destilada esterilizada, solução de sacarose 35 % (Sac) e em mistura com talco neutro na porcentagem de ufc viáveis após 25 dias de armazenamento a temperatura ambiente (A) e a 4°C.

Efeito da concentração de conídios na severidade da doença em duas populações de *E.heterophylla*

O aumento da concentração do inóculo de 10^5 para 10^7 conídios/mL não aumentou a severidade da doença em ambas populações testadas, mas uniformizou o

aparecimento de sintomas nas plantas inoculadas com suspensões de concentrações mais altas (10^6 e 10^7 conídios/mL). Não houve diferença significativa entre os tratamentos e entre as populações em função da variação de severidade observada nas plantas inoculadas com 10^5 conídios/mL. O inóculo não foi infectivo nas concentrações de 10^3 e 10^4 conídios/mL. As notas dadas nesse experimento variaram de 0 (ausência de sintomas) a 1 (traço de verruga) e foram menores quando comparadas com as obtidas em plantas inoculadas com fragmentos de micélio, na seleção inicial (Figura 7).



Figura 7: Sintomas em plantas de *E. heterophylla* inoculadas com suspensão de conídios (A) e fragmentos de micélio (B) de *S. poinsettiae*.

Efeito de quatro meios de cultura líquido na virulência do inóculo produzido

O meio de cultura no qual os fragmentos de micélio foram obtidos influenciou a severidade da doença nas populações de leiteiro. Em ambas populações, a maior severidade foi observada nas plantas inoculadas com propágulos obtidos de meio BD seguido do meio de cenoura. O propágulo obtido em CV não foi infectivo a população ETRB, independente do período de molhamento. Enquanto o propágulo obtido de meio de mandioca não foi infectivo às plantas. O aumento da severidade em função do

período de molhamento diferenciou severidade obtida com BD48 dos demais tratamentos na população EKLN19. A diferença de severidade da doença esteve mais relacionada ao meio de cultura no qual o propágulo foi obtido do que ao período de molhamento que as plantas foram submetidas. Para todas as interações meio x molhamento foliar, as plantas de EKLN19 apresentaram maiores valores de severidade do que as de ETRB, o que foi caracterizado pelo aparecimento de verrugas nas hastes das plantas (Figura 8).

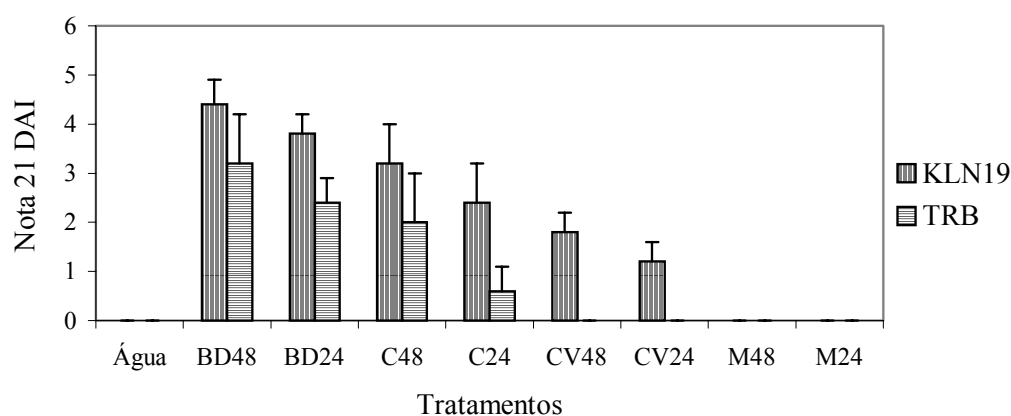


Figura 8: Notas de severidade da doença em duas populações de *Euphorbia heterophylla*, 21 dias após a inoculação (DAI) com fragmentos de micélio de *Sphaceloma poinsettiae* obtidos nos meios BD, C=cenoura, CV, M= mandioca dextrose e submetidos aos períodos de 24 e 48 horas de molhamento. Médias = cinco repetições; Barras = desvio padrão.

Especificidade de *S. poinsettiae*

Sphaceloma poinsettiae foi específico a *E. heterophylla*. Os primeiros sintomas foram observados sete dias após a inoculação. O sintoma inicial foi traço de verruga, evoluindo para verrugas nas hastes das plantas. Nas demais 37 espécies e nas oito cultivares de soja não foram observados quaisquer sintomas da doença nas folhas e hastes, durante os 35 dias de observação (Tabela 3).

Tabela 3: Teste de especificidade de *Sphaceloma poinsettiae**

Sub Classe Rosidae			
Ordem	Familia	Nome Científico	Resultado ^a
Apiales	Apiaceae	<i>Daucus carota</i> L.	-
Euphorbiales	Euphorbiaceae	<i>Acalypha godseffiana</i> Masters	-
		<i>Acalypha reptans</i> Sw.	-
		<i>Acalypha wilkesiana</i> M. Arg.	-
		<i>Codiaeum variegatum</i> Blume	-
		<i>Chamaesyce hirta</i> (L.) Millsp.	-
		<i>Euphorbia cotinifolia</i> L.	-
		<i>Euphorbia heterophylla</i> L.	-
		população KLN19	+
		população ETRB	+
		<i>Euphorbia milii</i> des Moulins	-
		<i>Euphorbia pulcherrima</i> Wild. ex Klot. ^b	-
		<i>Euphorbia tirucali</i> L.	-
		<i>Hevea brasiliensis</i> Wild. ex Adr. de Juss.) Muell. & Arg. ^b	-
		<i>Jatropha podagrica</i> Hook	-
		<i>Manihot esculenta</i> Crantz ^b	-
		<i>Pedilanthus tithymaloides</i> Poit.	-
		<i>Phyllanthus corcovadensis</i> Roxb.	-
		<i>Ricinus communis</i> L.	-
		Fabales	Fabaceae
<i>Canavalia ensiformis</i> (L.) DC. ^b	-		
<i>Desmodium uncinatum</i> (Jacq.)DC. ^b	-		
<i>Glycine max</i> (L.) Merr. ^c	-		
cv. UFV 19	-		
cv. UFV 16	-		
cv. UFV 16 Precoce	-		
cv. UFV 2001	-		
cv. UFV 2006	-		
cv. UFV 2007	-		
cv. UFV 2008	-		
cv. UFV 2009	-		
<i>Phaseolus vulgaris</i> L. ^b	-		
<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp. ^b	-		

Tabela 3, Cont.

Sub Classe Rosidae			
Ordem	Família	Nome Científico	Resultado ^a
Geraniales	Tropaeolaceae	<i>Tropaeolum majus</i> L.	-
Myrtales	Myrtaceae	<i>Eugenia uniflora</i> L.	-
		<i>Psidium guajava</i> L. ^b	-
Proteales	Proteaceae	<i>Grevillea banksii</i> R. Br.	-
Rhamnales	Vitaceae	<i>Vitis</i> sp. ^b	-
Rosales	Rosaceae	<i>Rosa sinensis</i> Jacq. ^b	-
Sapindales	Anacardiaceae	<i>Mangifera indica</i> L. ^b	-
	Rutaceae	<i>Citrus reticulata</i> Blanco ^b	-
Espécies salvaguardas			
Sub Classe Asteridae			
Asterales	Asteraceae	<i>Bidens pilosa</i> L. ^b	-
Solanales	Convolvulaceae	<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam. ^b	-
Sub Classe Commelinidae			
Cyperales	Poaceae	<i>Saccharum</i> sp. ^c	-
		<i>Zea mays</i> L. ^c	-
Sub Classe Dilleniidae			
Violales	Caricaceae	<i>Carica papaya</i> L. ^b	-
Malvales	Malvaceae	<i>Gossypium</i> sp. ^c	-
Sub Classe Magnoliidae			
Laurales	Lauraceae	<i>Persea americana</i> Mill. ^b	-

^a(+) presença de sintoma da doença

(-) ausência de sintoma da doença

^bEspécies hospedeiras do gênero *Sphaceloma*.

^cEspécies economicamente importantes que sofrem competição de *Euphorbia heterophylla*.

*Isolado utilizado RWB274.

DISCUSSÃO

O agente causal da verrugose do leiteiro, apesar de causar um grande impacto no crescimento dessa planta no campo, não foi eficiente, nas condições desse trabalho, e ainda apresenta limitações importantes para ser desenvolvido como micoherbicida.

A primeira dificuldade foi a produção de conídios. Como já citado na literatura, fungos do gênero *Sphaceloma* raramente esporulam *in vitro*, a não ser quando as colônias formadas são parcialmente imersas em água (Whiteside, 1975). Os isolados de *S. poinsettiae* utilizados nesse trabalho não produziram conídios nessas condições, exceto o isolado selecionado RWB274 que esporulou em meio BD após o uso da técnica descrita no item 2. Mesmo para este isolado, a esporulação foi inconsistente. Com a utilização desse método, clamidósporos de *S. poinsettiae* foram observados, uma única vez, mas não se obteve germinação destes clamidósporos em agar-água após 48 horas a 25°C. As populações de *E. heterophylla* inoculadas com a suspensão de conídios obtidos dessa maneira apresentaram a mesma severidade (traço de verruga) independente da concentração de 10^5 a 10^7 conídios/mL. A severidade da doença foi mínima quando as plantas foram inoculadas com suspensão de conídios. Por outro lado, essas mesmas populações quando inoculadas com fragmentos de micélio (10^4 ufc/mL) apresentaram sintomas de verrugas e algumas plantas chegaram a morrer na seleção inicial. Em razão disso, os experimentos foram conduzidos utilizando unicamente fragmentos de micélio como inóculo.

É difícil explicar porque os fragmentos de micélio e não os conídios, que são os propágulos infectivos em condições naturais, causaram maior severidade da doença nas plantas de leiteiro. A importância dos conídios de *Sphaceloma* sp. na infecção de vários hospedeiros, como citros (Whiteside, 1978), caupi (Emechebe, 1980) e mandioca (Alvarez e Molina, 2000) são bem conhecidos e os poucos trabalhos em que se investigou o uso de micélio como inóculo mostram a sua ineficiência. Phillips (1994) relata que o inóculo preparado a partir de fragmentos de colônia de *Elsinoe phaseoli* Jenkins não causou infecção em folhas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Poderia-se supor, então, que os propágulos obtidos com a metodologia adotada no presente trabalho não eram conídios, talvez blastósporos. Blastósporos são produzidos em meio líquido quando se cultiva *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. in Penz f. sp. *aeschynomene*, micoherbicida registrado com o nome de Collego® para o controle de *Aeschynomene virginica* (L.) B.S.P. (Churchill, 1982). No entanto, a medição dos

conídios e as características morfológicas conferem com a descrita para conídios de *S. poinsettiae*. Daigle e Cotty (1994) relatam que conídios de *Colletotrichum truncatum* (Schwein) Andrus & W.D. Moore produzidos em meio líquido são menos virulentos à *Sesbania exaltata* (Ref.) Rybd. ex A. W. Hill do que os obtidos de meio agarizado e esta instabilidade pode impedir seu uso como micoherbicida.

Verificou-se ainda que a capacidade de esporulação pode estar relacionada com a idade da colônia do fungo, pois não houve repetibilidade da produção de conídios para confirmação dos resultados obtidos. Fantin e Kimati (1993) verificaram a mesma tendência para *Elsinoe australis* Bitanc. e Jenkins e *Elsinoe fawcetti* Bitanc. e Jenkins, em diversos métodos para indução de esporulação. Conclui-se que o uso de outras técnicas e meios de cultura líquidos precisam ser explorados para verificar a produção e infectividade dos conídios obtidos. Um método consistente para a produção de clamidósporos e uma técnica adequada para a quebra de sua provável dormência poderia também representar um avanço importante para o uso deste fungo como micoherbicida.

Usualmente, considera-se que somente esporos sejam comercialmente viáveis como propágulos para o desenvolvimento de um micoherbicida, mas a eficiência do micélio de *Fusarium oxysporum* Schlecht e *Fusarium arthrosporioides* Fide, agentes de controle de *Orobanche aegyptiaca* Pers, *Orobanche ramosa* L. e *Orobanche cernua* Loeffl., utilizando formulações apropriadas, foi demonstrada por Amsellem *et al.* (1999). É possível que com o desenvolvimento de metodologia específica, o uso de micélio como inóculo possa substituir os esporos para alguns agentes de biocontrole estéreis ou com baixa esporulação em meio de cultura. Nesse estudo ficou evidente que o meio líquido seria o mais indicado para a obtenção de micélio de *S. poinsettiae*, por sua maior rapidez de crescimento em comparação com o meio agarizado e por tornar mais prática a trituração do micélio. A faixa de temperatura (20-30°C) em que os fragmentos de micélio são viáveis equivale à encontrada para os conídios de *A. euphorbiicola* e *B.euphorbiae* e provavelmente não restringiria seu uso nos períodos mais quentes do ano em que o controle do leiteiro é mais necessário.

Uma observação relevante foi a variação da severidade observada nas populações quando inoculadas com fragmentos de micélio obtidos de diferentes meios de cultura. A maior severidade da doença nas duas populações testadas, foi obtida com a utilização de fragmentos de micélio obtidos em meio BD, independente do período de molhamento. Jackson *et al.* (1996) relatam que mudanças nas condições nutricionais do

meio podem resultar em variação na eficácia do inóculo. A padronização das condições de cultivo do fungo é importante para comparar resultados obtidos com outros isolados. A severidade máxima obtida nesse experimento foi menor que a obtida na seleção inicial, onde algumas plantas dessas mesmas populações morreram, o que pode ser um indício da instabilidade do fungo.

A manutenção da viabilidade do propágulo após um período acima de seis meses de armazenamento é uma característica importante para a aceitação comercial de um micoherbicida (Green *et al.*, 1997). Os tratamentos utilizados neste trabalho com essa finalidade não foram eficientes para manter a viabilidade do micélio de *S. poinsettiae*. O armazenamento em suspensão parece ser mais indicado para manter a viabilidade dos propágulos desse fungo. Em relação à gama de hospedeiros, o fungo foi específico à *E. heterophylla*. Este resultado difere dos obtidos por Zeigler e Lozano (1983) que verificaram que *E. pulcherrima* e *Manihot esculenta* (incluídas no teste) eram suscetíveis à *S. poinsettiae*. Entretanto, é importante ressaltar que os autores usaram outro isolado do fungo e pode haver alguma variação na gama de hospedeiros de outros isolados diferentes de RWB274 usado no presente teste.

A severidade da doença na seleção inicial sugere a reação diferenciada das populações de *E. heterophylla* em função do isolado inoculado. Isso reflete a variabilidade do patógeno e do hospedeiro. Isto pode ser explorado utilizando mistura de isolados para aumentar a gama de populações da invasora controladas. Além disso, em todos os experimentos, a severidade foi menor na população ETRB do que em EKLN19, o que indica que ETRB, já comprovadamente resistente à *B. euphorbiae*, também é resistente à *S. poinsettiae*. A morte de plantas foi observada nas duas populações na seleção inicial, mas enquanto as plantas da população KLN19 apresentaram estrangulamento e morte da haste, nas plantas de ETRB ocorreu a morte da parte aérea enquanto a haste permaneceu verde.

Esta é a primeira vez que um fungo do gênero *Sphaceloma* é avaliado como potencial agente de biocontrole. Este gênero é encontrado associado a várias outras espécies de plantas invasoras (Nechet e Barreto, 2001) e as informações geradas neste trabalho poderão ser úteis em outros programas de controle biológico.

A avaliação de *S. poinsettiae* faz parte de um projeto que visa verificar também a potencialidade de outras duas espécies fúngicas (*A. euphorbiicola* e *B. euphorbiae*) como agente de controle biológico de *E. heterophylla* no Brasil. Até o momento *S. poinsettiae* parece ser o fungo menos promissor quando comparado com *B.*

euphorbiae ou *A. euphorbiicola* para o desenvolvimento de um micoherbicida, em razão das limitações já discutidas. A mistura de fungos pode ser uma alternativa interessante quando nenhum patógeno isoladamente é capaz de controlar uma invasora (Morin *et al.*, 1993) e pela sua característica típica de causar verrugas na haste da planta, *S. poinsettiae* poderia ser associado à *B. euphorbiae*, que causa desfolha, para aumentar a eficiência do controle de *E. heterophylla*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarez, E.; Molina, M.L. 2000. Characterizing the *Sphaceloma* fungus, causal agent of superelongation Disease in cassava. *Plant Disease*, v. 84, n. 4, p. 423-428.
- Amsellem, Z.; Zidack, N.K.; Quimby Jr., P.C.; Gressel, J. 1999. Long-term dry preservation of viable mycelia of two mycoherbicidal organisms. *Crop Protection*, v.18, p. 643-649.
- Barreto, R.W.; Evans, H.C. 1998. Fungal pathogens of *Euphorbia heterophylla* and *E. hirta* in Brazil and their potential as weed biocontrol agents. *Mycopathologia*, v.141, p. 21-36.
- Campbell, C.L.; Madden, L.V. 1990. "Introduction to Plant Disease Epidemiology". John Wiley & Sons, New York. 532p.
- Churchill, B.W. 1982. Mass production of microorganisms for biological control. In: "Biological Control of Weeds with Plant Pathogens", (Charudattan, R.; Walker, H.L. Eds), pp. 134-156.
- Daigle, D.J.; Cotty, P.J. 1994. Stability of *Colletotrichum truncatum* in culture influences mycoherbicide efficacy. *Mycologia*, v. 86, p. 397-400.
- Dhingra, O.D.; Sinclair, J.B. 1995. "Basic Plant Pathology Methods". CRC Press, New York. 434p.
- Emechebe, A.M. 1980. Scab disease of cowpea (*Vigna unguiculata*) caused by *Sphaceloma* a species of the fungus. *Annals of Applied Biology*, v. 96, p. 11-16.
- Fantin, G.M.; Kimati, H. 1993. Obtenção de esporulação *in vitro* de *Elsinoe australis* e *E. fawcetti*. *Summa Phytopathologica*, v. 19, p. 8-9.
- Foloni, L.L.; Christoffoleti, P.J. 1999. Chemical weed control in soybean in Brazil using new herbicides and mixtures. In: "Proceedings of the 1999 Brighton Conference Weeds.", (The British Crop Protection Council, Ed.), pp. 315-318, 1999, Brighton British Crop Protection Council, Brighton, UK.

- Gazziero, D.L.P.; Yorinori, J.T. 1993. "Experiência sobre controle biológico de *Euphorbia heterophylla* no Brasil". FCAV, Jaboticabal.
- Gazziero, D.L.P.; Brighenti, A.M.; Maciel, C.D.G.; Christoffoleti, P.J.; Adegas, F.S.; Voll, E. 1998. Resistência de amendoim-bravo aos herbicidas inibidores da enzima ALS. *Planta Daninha*, v.16, n.2, p.117-125.
- Green, S.; Stewart-Wade, S.M.; Boland, G.J.; Teshler, M.P.; Liu, S.H. 1997. Formulating microorganism for biological control of weeds. In: "Plant Microbe interactions and biological control", (Boland, G.J. Ed.), pp. 249-281, New York.
- Jackson, M.A.; Schisler, D.A.; Slininger, P.J.; Boyette, C.D.; Silman, R.W.; Bothast, R.J. 1996. Fermentation strategies for improving the fitness of a bioherbicide. *Weed technology*, v. 10, p. 645-650.
- Kissmann, K.G.; Groth, D. 1993. "Plantas infestantes e nocivas. Tomo II". Basf Brasileira, São Paulo, 798p.
- McKiney, H.H. 1923. Influence of soil temperature and moisture on infection of heat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Jour. Agr. Res.*, v. 26, p. 195-217.
- Melhorança, A.L.; Pereira, F.A.R. 1999. Eficiência do herbicida lactofen no controle de *Euphorbia heterophylla*, resistente aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS). *Documentos-Embrapa Agropecuária Oeste*, v. 3, p. 11-14.
- Morin, L. Auld, B.A.; Brown, J.F. 1993. Synergy between *Puccinia xanthii* and *Colletotrichum orbiculare* on *Xanthium occidentale*. *Biological Control*, v.23, p.296-310.
- Mungo, C.M.; Emechebe, A.M.; Florini, D.A. 1998. Isolation of *Sphaceloma* sp. from four cowpea plant parts using eight media. *Crop Protection*, v.17, n.4, p.341-343.
- Nechet, K.L.; Barreto, R.W. 2001. Verrugoses associadas a algumas plantas daninhas no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, v.26 (Suplemento), p.365.
- Pereira, J.M.; Barreto, R.W.; Ellison, C.A.; Maffia, L.A. 2003. *Corynespora cassiicola* f. sp. *lantanae*: a potential biocontrol agent for *Lantana camara* from Brazil. *Biological Control*, v.26, n.1, p.21-31.
- Phillips, A.J.L. 1994. A comparison of methods for inoculating bean plants with *Elsinoe phaseoli* and some factors affecting infection. *Annals of Applied Biology*, v.125, n. 1, p. 97-104.
- Wapshere, A.J. 1974. A strategy for evaluating the safety of organisms for biological weed control. *Annals of Applied Biology*, v. 77, p. 201-211.
- Whiteside, J.O. 1975. Biological characteristics of *Elsinoe fawcetti* pertaining to the epidemiology of sour orange scab. *Phytopathology*, v. 68, n. 8, p. 1170-1175.

- Whiteside, J.O. 1978. Pathogenicity of two biotypes of *Elsinoe fawcetti* to sweet orange and some others cultivars. *Phytopathology*, v. 68, n. 8, p. 1128-1131.
- Yorinori, J.T. Biological control of milkweed (*Euphorbia heterophylla*) with pathogenic fungi. 1985. In: “*Proceedings of the VI International Symposium on Biological Control of Weeds.*”, (Delfosse, E.S. Ed.), pp.677-681, 1985, Vancouver Agriculture Canada, Vancouver, Canada.
- Yorinori, J.T. 1987. Controle biológico de ervas daninhas com microrganismos. In: “*Anais da II Reunião sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas*”, (Fundação Cargill. Ed.), pp.20-30, 1987, Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Piracicaba, São Paulo.
- Yorinori, J.T.; Gazziero, D.L.P. 1989. Control of milkweed (*Euphorbia heterophylla*) with *Helminthosporium* sp. In: “*Proceedings of the VII International Symposium on Biological Control of Weeds.*”, (Delfosse, E.S. Ed.), pp.571-576, 1989, Rome Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale, Rome, Italy.
- Zeigler, R.S.; Lozano, J.C. The relationship of some *Elsinoe* and *Sphaceloma* species pathogenic on cassava and other Euphorbiaceae in Central and South America. 1983. *Phytopathology*, v.73,n.2, p.293-300.

***Alternaria euphorbiicola* COMO MICOHERBICIDA PARA O CONTROLE
DE *Euphorbia heterophylla*: SELEÇÃO DE ISOLADO, EFEITO DA
CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO, IDADE DA PLANTA E
PERÍODOS DE MOLHAMENTO**

RESUMO

Um isolado de *Alternaria euphorbiicola*, selecionado com base na intensidade da doença provocada em nove populações de *Euphorbia heterophylla*, destacou-se como potencial micoherbicida. A aplicação de uma suspensão de 2×10^5 conídios/mL e a exposição das plantas inoculadas a um período de seis horas de molhamento foliar foram condições suficientes para que o fungo causasse elevada mortalidade da parte aérea em onze populações de *E. heterophylla* testadas, inclusive na que apresenta resistência aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS), no estágio de seis a oito folhas, em que aplicações dos produtos químicos já não resultam em controle. O atraso no início do período de molhamento foliar não diminuiu a mortalidade da parte aérea do leiteiro, mas aumentou a capacidade de recuperação das plantas em uma das populações testadas. Todos os estádios fenológicos testados: cotiledonar, um a dois pares de folhas, três a quatro pares de folhas, início de brotação floral, plantas com flores e plantas com frutos foram suscetíveis ao patógeno. O binômio temperatura e molhamento foliar influenciou a germinação *in vitro* dos conídios de *A. euphorbiicola*. A 30°C, a germinação não diferiu entre os períodos de 6, 12 e 24 horas de molhamento, enquanto a 18°C, quanto maior o período de molhamento, maior o porcentual de germinação. Os resultados obtidos permitiram identificar que *A. euphorbiicola* apresenta potencial para ser desenvolvido como micoherbicida para o controle de *E. heterophylla*.

ABSTRACT

One isolate of *Alternaria euphorbiicola*, selected on the bases of disease severity in nine populations of *Euphorbia heterophylla*, emerged as a potential mycoherbicide.

The application of a conidial suspension of 2×10^5 /mL, at four to six leaf stage, and exposing the inoculated plants to 6-hour wet period was sufficient to cause high shoot mortality in 11 *E. heterophylla* populations tested, including those resistant to acetolactate synthetas (ALS) inhibitor herbicides, while the application of two herbicides did not give any control. Delaying wet period initiation of the inoculated plants did not reduce shoot mortality of milkweed, but increased recovering capacity of inoculated plants in one of the populations. The plants were susceptible to the pathogen at all the phenological stages tested: cotyledonary, one and two leaf pairs, three and four leaf pairs, beginning of floral bud, flowering, and fruiting. The temperature-wet period binomial affected *in vitro* conidial germination. The germination similar at 6, 12 or 24 h of wetting period at 30°C, but the germination percentage increased by increasing wet-period at 18°C. The data from this study suggest that *A. euphorbiicola* has potential for being developed into a mycoherbicide to control *E. heterophylla*.

INTRODUÇÃO

Euphorbia heterophylla L , popularmente conhecida como amendoim-bravo ou leiteiro, é uma euforbiácea nativa da América tropical e subtropical. (Lorenzi, 2000). No Brasil, é freqüentemente encontrada como invasora de culturas economicamente importantes como milho, cana-de-açúcar, feijão (Instituto Agrônômico do Paraná, 1977; Arevalo e Rozanski, 1991), sendo considerada uma das principais invasoras da cultura da soja no país (Guedes e Wiles, 1976). A redução na produção de soja em função da competição de *E. heterophylla* varia de acordo com a densidade da invasora por área e da cultivar de soja, sendo estimadas perdas de 35% a 62% (Constantin *et al.*, 1997; Voll *et al.*, 2002). A principal ferramenta para o controle de *E. heterophylla* nos campos de soja é o uso de herbicidas químicos inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS). No entanto, devido ao uso contínuo e efeito residual no solo, já foram identificados biótipos de *E. heterophylla* resistentes a esses produtos, o que vem acarretando falhas no controle dessa invasora, nos campos de produção de soja (Gazziero *et al.*, 1998; Melhorança e Pereira, 1999). Este contexto representa uma oportunidade para a utilização de estratégias alternativas para o controle de *E. heterophylla*, como o uso de micoherbicidas (Charudattan, 2001).

Há cerca de vinte anos, iniciou-se no Brasil, o primeiro programa de controle biológico de plantas daninhas visando o desenvolvimento de um micoherbicida, tendo como alvo *E. heterophylla*. O fungo estudado como agente de biocontrole foi *Bipolaris euphorbiae* (Hansford) Muchovej, inicialmente identificado como *Helminthosporium* sp. Os primeiros resultados mostraram que, em condições de campo, o fungo causou severa desfolha em plantas de *E. heterophylla* no estágio de florescimento, época não recomendada para o herbicida químico acifluorfen sódico, e impediu que essas plantas produzissem sementes (Yorinori, 1985). No entanto, uma das limitações encontradas foi a existência de populações de *E. heterophylla* com graus variáveis de suscetibilidade à *B. euphorbiae*, sendo uma destacada como resistente ao fungo (Yorinori e Gazziero, 1989). A busca de isolados com elevada virulência para o controle de uma gama de populações de *E. heterophylla*, que incluía as resistentes à *B. euphorbiae* ainda é necessária para o desenvolvimento de um micoherbicida a partir deste fungo (Gazziero e Yorinori, 1993).

A continuada importância de *E. heterophylla* justifica a busca de novos agentes de biocontrole, como revisto por Barreto e Evans (1998) que apontaram a existência de outros fungos fitopatogênicos associados à *E. heterophylla*, em particular *Sphaceloma poinsettiae* Jenkins & Reuhle e *Alternaria euphorbiicola* Simmons & Engelhard, com aparente potencialidade para serem desenvolvidos como micoherbicidas. A verrugose, causada por *S. poinsettiae*, ocasiona a morte de plantas em condições no campo, mas testes de casa de vegetação, feitos com 10 isolados do fungo, não resultaram em controle da população resistente à *B. euphorbiae*. A produção de conídios de *S. poinsettiae* foi inconsistente e seu uso como inóculo causou danos mínimos em populações de *E. heterophylla*. O micélio deste fungo, apesar de ter sido usado com sucesso como inóculo, perdeu sua viabilidade rapidamente durante o armazenamento.

Alternaria euphorbiicola causa necrose de inflorescência, queima foliar e cancro na haste das plantas em condições naturais, mas seu potencial no controle das populações de *E. heterophylla* ainda não havia sido avaliado. Yorinori (1985) afirma que, em condições de campo, *A. euphorbiicola* tem menor eficiência que *B. euphorbiae* no controle da invasora, por requerer um período de molhamento maior para causar infecção. No entanto, o mesmo autor relatou que, no estágio de plântula, uma única lesão de *A. euphorbiicola* na haste pode matar a planta. O desenvolvimento de doenças de plantas e conseqüente dano ao hospedeiro são influenciados por vários fatores relevantes no desenvolvimento de um micoherbicida, tais como: o período de

molhamento mínimo para ocorrer a infecção, a capacidade do fungo resistir ao atraso do início de molhamento e o estágio fenológico da planta na época da aplicação.

Mais informações são necessárias sobre a interação *A. euphorbiicola* e *E. heterophylla* visando avaliar de forma mais precisa o potencial deste fungo como agente de controle biológico. Assim, o objetivo desse trabalho foi selecionar um isolado de *A. euphorbiicola* com base na intensidade da doença em populações de *E. heterophylla* e verificar o efeito da concentração de inóculo, da idade da planta, do período de molhamento foliar e do atraso no início de molhamento foliar no desenvolvimento da doença e no controle de populações de *E. heterophylla* em condições controladas.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos isolados de *Alternaria euphorbiicola*:

Amostras de *E. heterophylla* com sintomas de ataque de *Alternaria* foram coletadas nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, no Brasil. O material foi herborizado e incorporado à coleção micológica do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. A partir de lesões na haste ou nas folhas foram feitos isolamentos direto ou indireto em meio CVA (caldo de vegetais agar, Pereira *et al.*, 2003) para a obtenção de culturas puras. Os isolados obtidos (Tabela 1) foram conservados *in vitro* pelo método de preservação em sílica-gel (Dhingra e Sinclair, 1995).

Produção de inóculo:

A obtenção de conídios de *A. euphorbiicola* para os experimentos foi feita segundo metodologia de Walker (1980) com modificações que consistiu das seguintes etapas: 10 discos de micélio do fungo provenientes de uma cultura de sete dias cultivada em placa de Petri contendo meio CVA foram transferidos assepticamente para erlenmeyers contendo 100 mL de meio CV (meio CVA sem adição de ágar). Os erlenmeyers foram colocados em agitador orbital a 30 rpm por sete dias. Após esse

Tabela 1: Origem dos isolados de *Alternaria euphorbiicola* obtidos e utilizados na seleção inicial.

Código	Origem
KLN06	Viçosa-MG
KLN09	Araruama-RJ
KLN14	Italva-RJ
KLN15	Niterói-RJ
KLN17	São Miguel do Anta-MG
KLN18	Viçosa-Mg
KLN19	Viçosa-MG
KLN20	Viçosa-MG
RWB280	Nova Petrópolis-RS

período, o micélio foi triturado dentro dos erlenmeyers, utilizando-se um microtritador/homogeneizador, e vertido em bandejas de alumínio de 20x28 cm contendo 100 mL de meio CVA. As bandejas foram mantidas a 26°C em fotoperíodo de 12 horas sob conjunto de duas lâmpadas fluorescentes (40W) e duas lâmpadas negras (40W). Após dois dias, foi feita a coleta de esporos, adicionando-se 50 mL de água esterilizada sobre a superfície das bandejas e raspando-se estas com espátula de borracha. A suspensão obtida foi filtrada em gaze e utilizada nas inoculações.

Obtenção de sementes de diferentes populações de *Euphorbia heterophylla*:

As populações coletadas foram diferenciadas pelo seu local de origem ou por uma característica particular: resistência ao herbicida imazetaphyr (material cedido pelo Laboratório de Herbicida na Planta, Universidade Federal de Viçosa) ou a resistência à *B. euphorbiae* (material doado por J. T. Yorinori, Embrapa Soja, proveniente de campos experimentais do Paraná). As sementes das populações (Tabela 2) foram coletadas e armazenadas a 5°C. Em todos os experimentos foram utilizadas plantas com três a quatro pares de folhas definitivas com exceção do experimento de efeito da idade da

Tabela 2: Origem das populações de *Euphorbia heterophylla* utilizados na avaliação da eficiência de *Alternaria euphorbiicola*.

Código	Origem
EKLN16	Niterói-RJ
EKLN19	Viçosa-MG
EKLN23	Caroebe-RR
EKLN26	Goiania-GO
ERWB 247	Itabuna-BA
ERWB 274	Nova Laranjeira-PR
ERWB 280	Nova Petrópolis-RS
ETSB	Londrina-PR
ETRB	Londrina-PR (resistente à <i>B. euphorbiae</i>)
ESH	Viçosa-MG
ERH	Viçosa-MG (resistente à imazethapyr)

planta no desenvolvimento da doença. Na seleção inicial e no experimento final foram utilizadas 10 e 12 populações, respectivamente. Nos demais experimentos, utilizaram-se apenas as populações EKLN19 e ETRB, selecionadas como populações, respectivamente, mais suscetível e mais resistente aos fungos fitopatogênicos associados ao leiteiro em estudos paralelos (Nechet *et al.*, 2002).

Condições gerais dos experimentos:

As plantas foram inoculadas por meio de atomização, utilizando um minipressurizador.

Seleção de isolado de *A. euphorbiicola*:

Plantas de 10 populações foram inoculadas com uma suspensão de 1×10^4 conídios/mL + Tween 20 0,05% (polioxietileno monolaurático) + Break thru® 0,05% (copolímero poliéter-polimetil siloxano + poliéter) e mantidas por 24 horas em

câmara de nevoeiro a 25°C. Após esse período, foram transferidas para casa de vegetação (26±2°C). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial de 10 isolados, nove populações e três repetições, sendo cada repetição representada por um vaso com duas plantas. Plantas pulverizadas com água + Tween 20 (0,05%) + Break thru® (0,05%) constaram como controle. As avaliações de intensidade da doença foram feitas a cada cinco dias, durante 30 dias.

Efeito da concentração de inóculo:

As plantas foram inoculadas com as suspensões de 0, 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ e 10⁷ conídios/mL + óleo mineral (5%) + Break thru® (0,05%) e levadas para câmara de nevoeiro a 25°C por 24 horas. Em seguida, foram transferidas para casa de vegetação (26±2°C). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial de seis concentrações, duas populações, cinco repetições, sendo cada repetição representada por um vaso com uma planta. Plantas pulverizadas com água + óleo mineral (5%) + Break thru® (0,05%) constaram como controle.

Efeito da idade da planta:

Plantas em seis diferentes estádios de desenvolvimento foram inoculadas com uma suspensão de 2 x 10⁵ conídios/mL + óleo mineral (5%) + Break thru® (0,05%), levadas para câmara de nevoeiro a 25°C por 24 horas e depois transferidas para casa de vegetação (26±2°C). Os estádios utilizados foram: 1) estágio cotiledonar, 2) um a dois pares de folhas, 3) três a quatro pares de folhas, 4) início de brotação floral, 5) Plantas com flores, 6) Plantas com frutos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial de seis estádios, duas populações, cinco repetições, sendo cada repetição representada por um vaso com uma planta. Plantas pulverizadas com água + óleo mineral (5%) + Break thru® (0,05%) serviram como controle.

Efeito de períodos de molhamento foliar:

Plantas inoculadas com uma suspensão de 2x10⁵ conídios/mL + óleo mineral 5%+ Break thru® (0,05%) foram colocadas em câmara de nevoeiro à 25°C por 0, 6, 12, 24 e 48 horas. Após a inoculação as plantas sem molhamento foliar foram

imediatamente transferidas para casa de vegetação ($26\pm 2^{\circ}\text{C}$). Plantas dos demais períodos de molhamento foram retiradas da câmara de nevoeiro após cada período estipulado. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial de seis tratamentos, duas populações e cinco repetições, sendo cada repetição representada por um vaso com uma planta. Plantas pulverizadas com água + óleo mineral (5%) + Break thru® (0,05%) constaram como controle.

Efeito da interação temperatura e período de molhamento na germinação *in vitro* de conídios:

Conídios de *A. euphorbiicola* KLN06, obtidos de culturas de 10 dias em meio CVA foram pincelados a seco em lâminas para microscopia e colocadas em caixa de gerbox forradas com papel de filtro. As caixas foram deixadas em câmaras de crescimento ajustadas para temperaturas de 18, 22, 26 e 30°C em períodos de 0, 6, 12 e 24 horas de molhamento. O molhamento foi simulado umedecendo-se o papel de filtro e fechando-se a caixa. Após cada período, as caixas foram abertas e deixadas dentro da câmara de crescimento. A avaliação foi feita 24 horas após a montagem do experimento contando-se o número de conídios germinados num total de 200 conídios/lâmina. O experimento foi casualizado em arranjo fatorial de quatro temperaturas, quatro períodos de molhamento e quatro repetições, sendo cada repetição representada por uma caixa contendo duas lâminas.

Efeito do atraso no período de molhamento foliar:

Grupos de cinco plantas foram inoculadas com uma suspensão de 2×10^5 conídios/mL + óleo mineral (5%) + Break thru® (0,05%) e um grupo levado imediatamente para câmara de nevoeiro a 25°C e os demais grupos, 6, 12, 24 e 48 horas após a inoculação. Plantas de todos os períodos de molhamento permaneceram por seis horas na câmara de nevoeiro. Em seguida foram transferidas para casa de vegetação ($26\pm 2^{\circ}\text{C}$). Plantas pulverizadas com água + óleo mineral (5%) + Break thru® (0,05%) constaram como controle. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial de cinco períodos de atraso de molhamento, duas populações, cinco repetições, sendo cada repetição um vaso com uma planta.

Efeito da utilização de suspensão de 2×10^5 conídios/mL e seis horas de período de molhamento no controle de 12 populações de *E. heterophylla*:

Plantas de 12 populações no estágio de três a quatro pares de folhas definitivas foram inoculadas com uma suspensão de 2×10^5 conídios/mL + óleo mineral 5% + Break thru[®] (0,05%) e deixadas por períodos de 0 e 6 horas em câmara de nevoeiro a 25°C. Após esse período, foram transferidas para casa de vegetação (26±2°C).

Análise dos Dados:

Nos experimentos de seleção de isolados, efeito da concentração de inóculo e no experimento final avaliou-se a intensidade da doença, com base na porcentagem de folhas com sintomas e no número de plantas mortas. A partir dos dados calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (Campbell e Madden, 1990). Nos demais experimentos avaliaram-se o número de plantas mortas. Os dados foram submetidos à análise de variância usando o proc GLM do programa SAS versão 6.12.

RESULTADOS

Seleção de isolado de *A. euphorbiicola*

Dos 10 isolados testados apenas três foram patogênicos às populações de leiteiro testadas, os demais eram aparentemente formas saprófitas de *Alternaria* comumente associadas a lesões de *B. euphorbiae*. O isolado KLN06 causou doença em maior intensidade o que resultou em maiores valores de AACPD em cinco populações, inclusive na população ERH, resistente ao herbicida imazethaphyr, enquanto nas outras quatro populações não diferiu dos demais isolados (Figura 1). Os primeiros sintomas foram observados aos cinco dias após a inoculação e as primeiras plantas mortas foram notadas aos sete dias nas populações EKLN19, ERWB247, ETSB, ERH e ESH inoculados com KLN06. Esse isolado foi então selecionado para utilização nos experimentos posteriores.

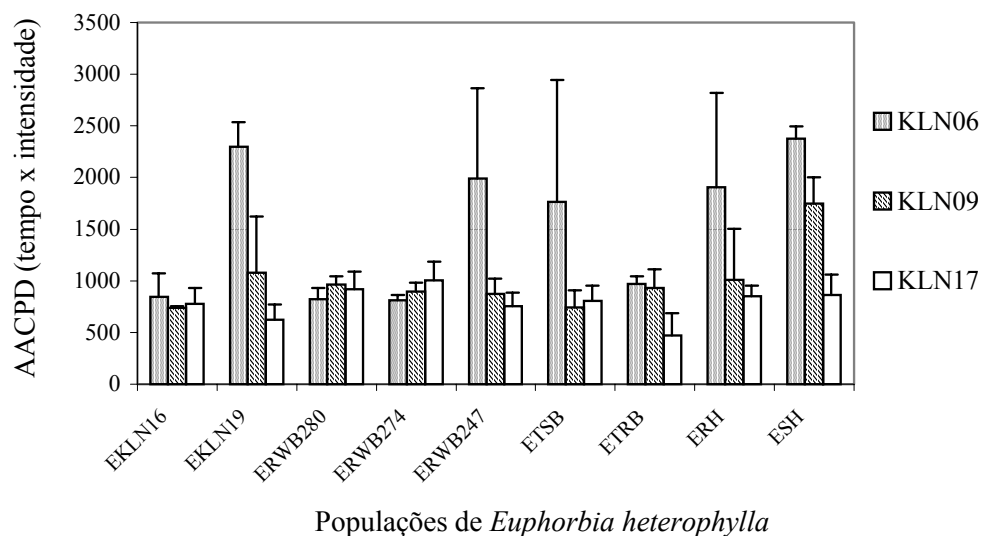


Figura 1: Área abaixo da curva de progresso da doença dos isolados KLN06, KLN09 e KLN17 de *Alternaria euphorbiicola* calculada utilizando a intensidade da doença nas populações de *E. heterophylla*. Os demais isolados de *A. euphorbiicola* testados não incitaram doença nas populações de *E. heterophylla*. Médias = três repetições; Barra = desvio padrão.

Efeito da concentração de inóculo

A utilização da suspensão de 10^5 conídios/mL causou a morte de 80% das plantas em ambas as populações. A utilização de suspensões de conídios com concentrações mais altas resultou na morte de todas as plantas (AACPD = 2600). Embora os valores de AACPD dessa concentração não tenham diferido significativamente da concentração de 10^4 conídios/mL, neste tratamento verificou-se desvio padrão alto (Figura 2), pois enquanto algumas plantas tiveram morte de parte aérea, outras apresentaram apenas lesões foliares. Posteriormente, verificou-se que com a utilização de uma suspensão de 2×10^5 conídios/mL o controle foi total e uniforme nas duas populações.

Efeito da idade da planta

A morte de todas as plantas ocorreu independente do estágio e da população (Figura 3). As plantas morreram cinco dias após a inoculação e não foram observadas rebrotas.

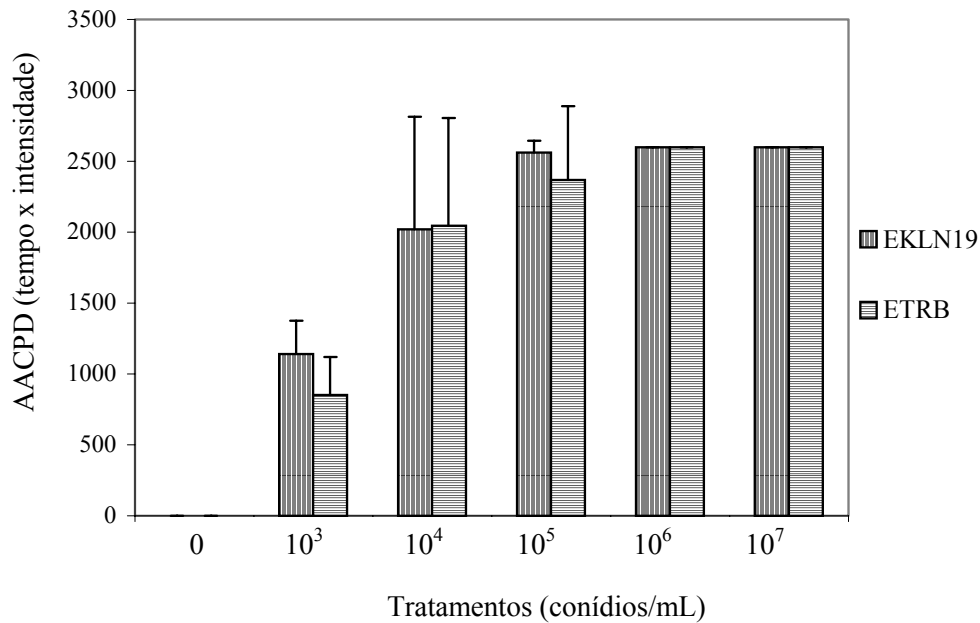


Figura 2: Área abaixo da curva de progresso da doença de *Alternaria euphorbiicola* KLN06 calculada utilizando a intensidade da doença nas populações EKLN19 e ETRB de *Euphorbia heterophylla*. Médias = cinco repetições; Barra = desvio padrão.

Efeito de períodos de molhamento foliar

A exposição das plantas ao período de molhamento foliar de seis horas após a inoculação causou a morte da parte aérea de todas as plantas nas duas populações, não havendo diferença entre os períodos de 12 e 24 horas de molhamento (Figura 4). Em EKLN19 esse mesmo resultado foi observado nas plantas não submetidas a um período de molhamento foliar, porém com 40% de rebrota. Nessas condições em ETRB as plantas apresentaram sintomas típicos, mas não chegaram a morrer. Nos outros períodos de molhamento não houve rebrota das plantas doentes.

Efeito da interação temperatura e período de molhamento na germinação *in vitro* de conídios

Para a germinação dos conídios foi necessário um período mínimo de 6 horas de molhamento, independente da temperatura. A porcentagem de germinação a 18°C foi

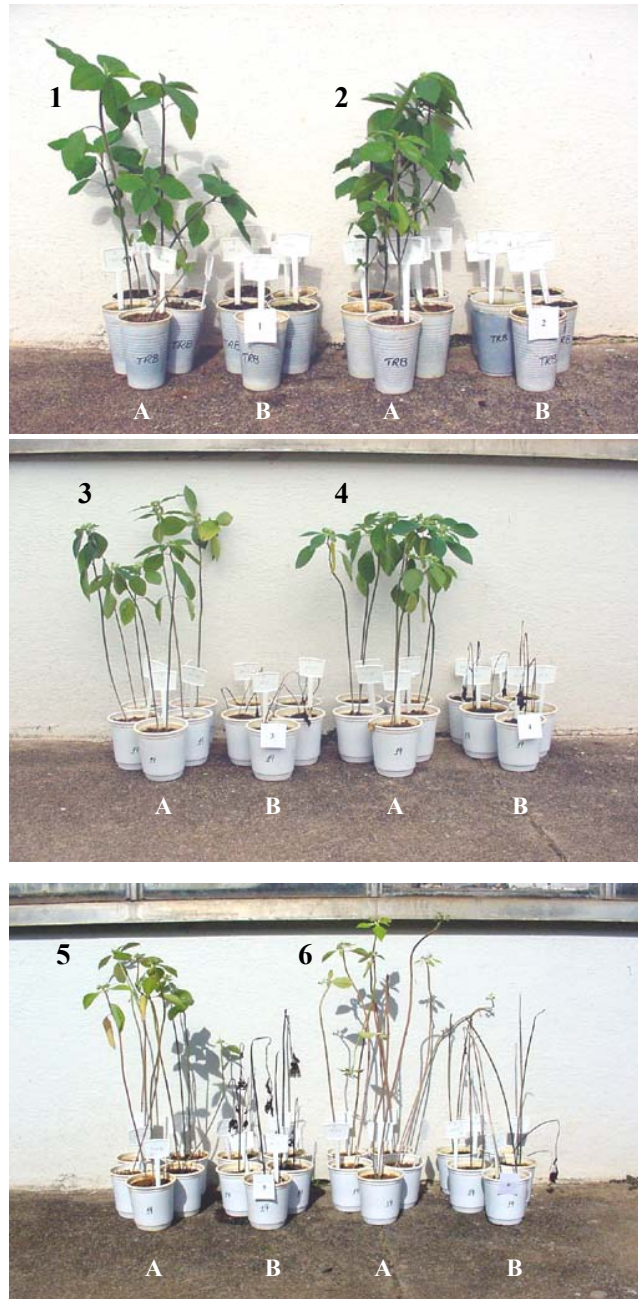


Figura 3: Plantas de *Euphorbia heterophylla* nos estádios de plântula (1), um a dois pares de folhas (2), três a quatro pares de folhas (3), início de brotação floral (4), plantas com flores (5) e plantas com frutos (6) mortas após a inoculação de 2×10^5 conídios de *A. euphorbiicola*/mL. A=Testemunhas; B=Plantas inoculadas.

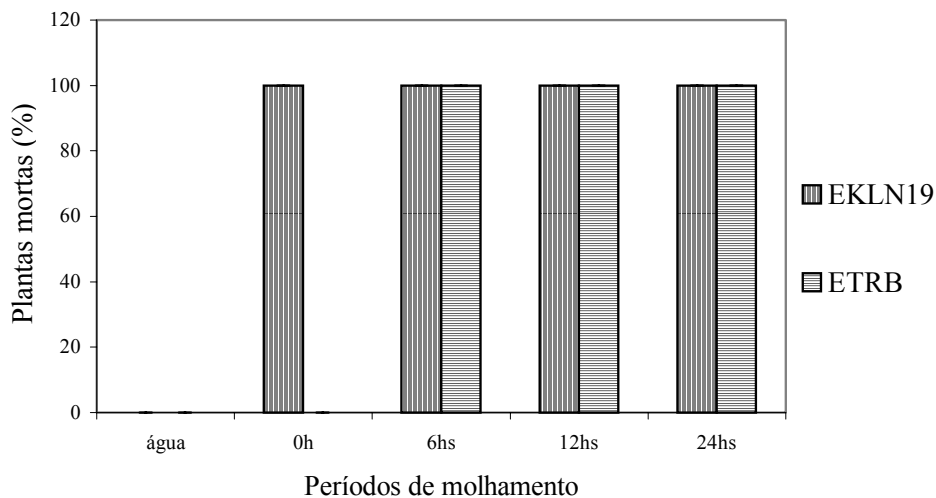


Figura 4: Porcentagem de plantas mortas nas populações EKLN19 e ETRB de *Euphorbia heterophylla* após a inoculação da suspensão de 2×10^5 conídios de *Alternaria euphorbiicola* KLN06/mL submetidas aos períodos de 0, 6, 12 e 24 horas de molhamento foliar. Médias = cinco repetições; Barra = desvio padrão.

diretamente proporcional ao aumento do período de molhamento, mas esses valores foram menores dos que os observados a 22, 26 e 30°C. O maior percentual de germinação a 22 e 26°C ocorreu nos períodos de 12 e 24 horas de molhamento. A 30°C, a germinação não diferiu entre os períodos de 6, 12 e 24 horas de molhamento (Figura 5).

Efeito do atraso no período de molhamento foliar

O atraso do molhamento foliar não afetou a eficiência de controle do isolado nas populações testadas e a parte aérea de todas as plantas inoculadas morreu após cinco dias em todos os tratamentos (Figura 6). Entretanto, houve rebrota de todas as plantas da população ETRB submetidas a 12, 24 e 48 horas de atraso de molhamento e de 60% para as plantas desta população submetidas a 0 e 6 hs de atraso no período de molhamento foliar (Figura 7). Quanto maior o período do atraso no início de molhamento mais rápido foi a recuperação das plantas da população ETRB. A

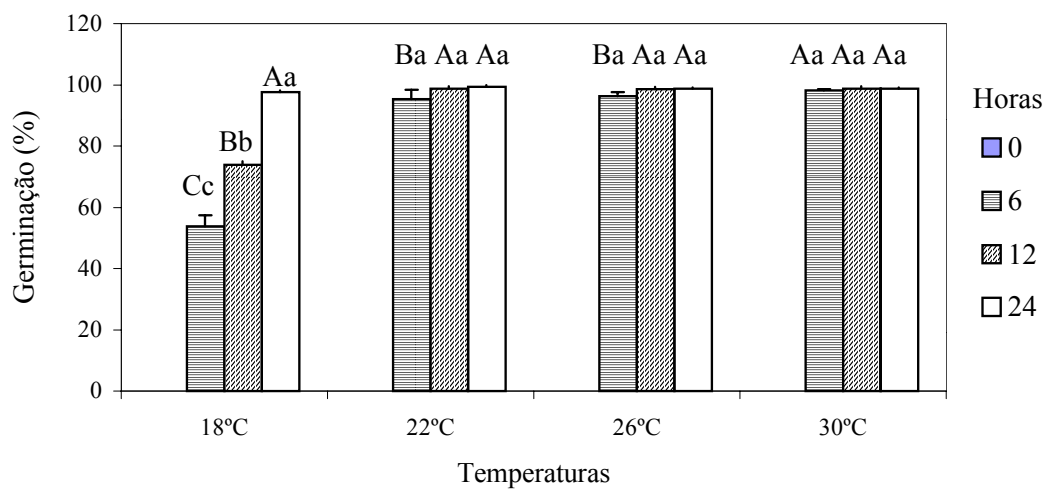


Figura 5: Efeito do binômio temperaturas (18, 22, 26 e 30°C) e períodos de molhamento (0, 6, 12 e 24 horas) na germinação de conídios de *Alternaria euphorbiicola* KLN06 *in vitro*. Médias = cinco repetições; Barra = desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula dentro de cada temperatura e minúscula entre temperaturas e período de molhamento não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5%.



Figura 6: Efeito de 0, 6, 12, 24 e 48 horas de atraso no início do período de seis horas de molhamento foliar, na eficiência de controle da população EKLN19 de *E. heterophylla* por *A. euphorbiicola*.



Figura 7: Recuperação das plantas da população ETRB de *E. heterophylla* submetidas ao atraso de 12, 24 e 48 horas no início do período de seis horas de molhamento, após a inoculação de 2×10^5 conídios de *A. euphorbiicola*/mL.

recuperação das plantas foi observada aos 10 dias para os tratamentos onde houve atraso de molhamento foliar de 24 e 48 horas e aos 15 dias, para os demais tratamentos. Não houve rebrota na população EKLN19.

Efeito da utilização de suspensão de 2×10^5 conídios/mL e 6 horas de período de molhamento no controle de 12 populações de *E. heterophylla*

Os resultados obtidos com as populações EKLN19 e ETRB nos experimentos anteriores foram confirmados com as demais populações de leiteiro testadas. Como observado anteriormente, a parte aérea de todas as plantas morreu cinco dias após a inoculação, quando submetidas a um período de 6 horas de molhamento foliar (AACPD = 2600) (Figura 8). Apenas em ERWB 273, ERWB247 e ETRB foram observadas rebrotas. As plantas não expostas a um período de molhamento após a inoculação apresentaram sintomas de cancro na haste e manchas nas folhas, mas não morreram.

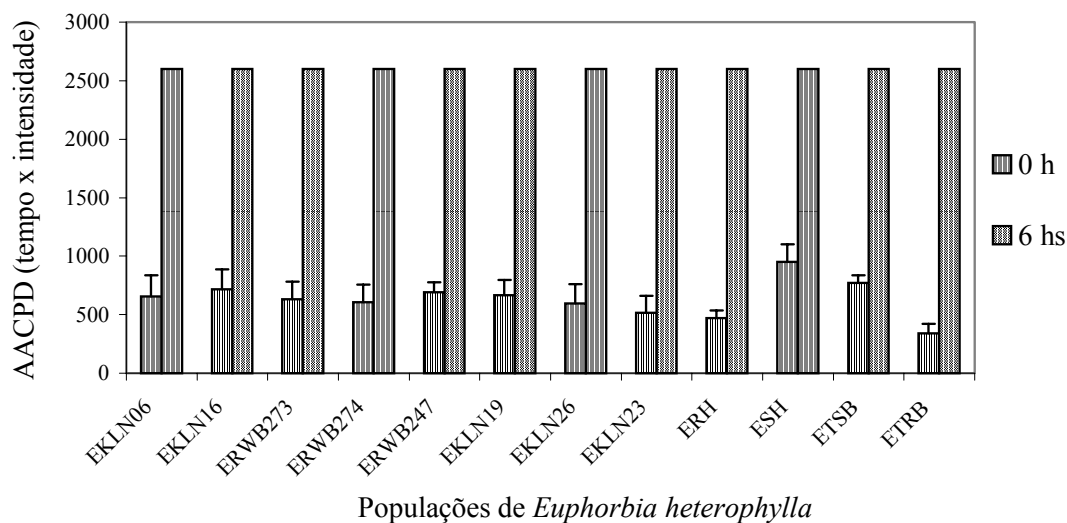


Figura 8: Área abaixo da curva de progresso da doença de *Alternaria euphorbiicola* KLN06 calculada utilizando a intensidade da doença em 12 populações de *Euphorbia heterophylla* submetidas a 0 e 6 horas de molhamento. Médias = cinco repetições; Barra = desvio padrão.

DISCUSSÃO

Nesse trabalho verificou-se que algumas condições ambientais afetam significativamente *A. euphorbiicola* e o desenvolvimento da doença que este fungo provoca em populações de *E. heterophylla*, em condições controladas. O fungo foi capaz, numa concentração baixa (2×10^5 conídios/mL), de matar a parte aérea de todas as plantas com um período apenas de 6 horas de molhamento. A variabilidade genética existente dentro da espécie *E. heterophylla* (ao menos na amostra testada) não interferiu na eficiência de controle do fungo. É importante notar que a população de leiteiro resistente ao herbicida imazethaphyr e que vem causando falhas no controle dessa invasora em campos de produção de soja foi controlada pelo fungo, assim como a população ETRB, destacada em programas anteriores de controle biológico por ser resistente à *B. euphorbiae* e *S. poinsettiae*. Embora nas populações ETRB, ERWB 273 e ERWB247 tenham sido observadas rebrotas, estas, não seriam suficientes para tornar a invasora novamente competitiva com a cultura. A capacidade de regeneração do leiteiro foi observada por Mikusinski-Costa (1987) em estudos envolvendo o corte da planta em

diferentes estádios. Em função das rebrotas observadas nesse trabalho, há evidências de que as plantas também reagem à infecção por *A. euphorbiicola* do mesmo modo.

O período de incubação da doença foi de três dias, sendo observado início de murcha nas plantas associado a manchas tipo anasarca nas folhas e hastes e, após cinco dias, a morte da parte aérea. O resultado final de todos os experimentos foi definido na 1ª avaliação e as demais avaliações tiveram a finalidade de verificar a presença ou não de rebrotas e o desenvolvimento destas. Muitas vezes as novas hastes formadas na rebrota apresentaram sintomas de cancro, mas não chegaram a morrer. Nos experimentos em que se utilizaram apenas duas populações, observou-se, após 30 dias, a incidência da doença nas testemunhas de EKLN19, mantidas na mesma bancada enquanto em ETRB isso não ocorria. Isso pode indicar que, em condições naturais, o fungo se dissemina localmente, mas só infecta populações mais suscetíveis. Estudos sobre a disseminação e sobrevivência do fungo são apresentados em separado.

Outra observação importante foi a eficiência do fungo no controle do leiteiro no estádio de três a quatro pares de folhas. Os herbicidas mais utilizados no controle da invasora, como imazethaphyr e fomesafen, já não são recomendados para plantas nesse estádio. Além disso, o fungo foi capaz de matar as plantas independente do seu estádio quando submetidas a 24 horas de molhamento. Stewart-Wade *et al.* (1998) relatam que *Alternaria crassa* (Sacc.) Rands requer um período de molhamento mínimo de 18 e 6 horas para matar as plantas de *Datura stramonium* L. nos estádios de três a quatro pares de folhas e cotiledonar, respectivamente. Em função disso, plantas de *E. heterophylla* nos estádios 4, 5 e 6, de início de brotação floral a maturação, submetidas a períodos menores de molhamento, podem apresentar controle inferior ao obtido com a exposição das plantas nesses estádios a 24 horas de molhamento após a inoculação do fungo.

A capacidade de matar a parte aérea das plantas independentemente do seu estádio, utilizando-se a mesma concentração de inóculo, diferencia *A. euphorbiicola* das demais espécies de *Alternaria* já estudadas como micoherbicidas. A limitação da suscetibilidade da planta alvo a apenas alguns de seus estádios pode limitar o potencial de um micoherbicida, como observado para *Alternaria cirsinoxia* Simmons & Mortensen. Este fungo é patogênico apenas à folhas velhas ou senescentes de *Cirsium arvense* (L.) Scop. (Green e Bailey, 2000a). Masangkay *et al.* (1999) relatam que todos os estádios de *Sphenoclea zeylanica* Gaertn. (1 a 5) são suscetíveis à *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler f.sp. *sphenocleae*, mas essa suscetibilidade diminui com o aumento da idade da planta, sendo necessária uma concentração maior

(1×10^6 conídios/mL) para se obter 100% de mortalidade nos estádios de 2 a 5. O micoherbicida CASST a base de *Alternaria cassiae* Jurair & Khan é indicado no controle de *Senna obtusifolia* (L.) H.S. Irwin & Barneby em estádios de plântulas ao 1º par de folhas, havendo a exigência de um mínimo 8 horas de molhamento entre 20 e 30°C (Walker e Riley, 1982).

O molhamento é essencial para a germinação dos conídios de *A. euphorbiicola* independente da temperatura, assim como para outras espécies de *Alternaria*. Conídios de *A. cirsinoxia* germinam entre 91 e 100% de umidade relativa independente da temperatura (faixa de 10-30°C) após 24 horas (Green e Bailey, 2000b). O efeito limitante do período de molhamento na germinação de *A. euphorbiicola* foi observado apenas na temperatura mais baixa (18°C). A 18°C, um período de 24 horas de molhamento foi necessário para que se obtivesse a máxima germinação dos conídios, enquanto que a 30°C esse período foi de apenas seis horas. Em casa de vegetação, Walker (1981) verificou que *Alternaria macrospora* Zimm., com 18 horas de molhamento, matou 32 e 92% das plantas de *Anoda cristata* (L.) Schltdl., nas temperaturas de 15 e 25°C, respectivamente. Esse resultado tem sido verificado com outros fungos como, por exemplo, *Curvularia intermediaria* Boedjin para o qual o aumento da temperatura ambiente de 15 para 25°C resulta no aumento em até 50% da porcentagem das plântulas alvo (*Digitaria sanguinalis* [L.] Scop.) mortas sob um mesmo período de molhamento (12 horas) (Tilley e Walker, 2002). Isso pode ser explicado pela teoria da compensação (Rotem, 1994) onde um fator favorável (período de molhamento) compensa o fator menos favorável (temperatura baixa).

Para algumas espécies de *Alternaria*, tem se observado que a temperatura ótima para infecção é similar ao ótimo para germinação (Rotem, 1994). Isso ainda não foi estudado para *A. euphorbiicola*, mas caso se confirme, haverá uma coincidência favorável da época em que o leiteiro é problema no Brasil (10embro a Fevereiro), quando as temperaturas variam de 20 a 30 °C (centro-oeste), 18 a 30°C (sudeste) e 17 a 29°C (sul) (Inmet, 1992) com o período de temperaturas favoráveis para o processo de infecção do fungo. Entretanto, o período mínimo de molhamento necessário para o desenvolvimento da doença pode não ocorrer de forma contínua nessa época. A capacidade dos conídios de *A. euphorbiicola* permanecerem viáveis por um período seco de até 48 horas antes de um período de molhamento sugere perspectivas favoráveis para a eficiência do fungo em condições naturais. A parte aérea das plantas de *E. heterophylla* morreu independente do período de atraso de molhamento testado.

Lawrie *et al.* (2000) mostraram que a redução do crescimento de *Amaranthus retroflexus* L. após a inoculação com *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler foi maior quando as plantas foram submetidas a um período seco de sete horas antes do molhamento do que as plantas imediatamente submetidas ao molhamento. Provavelmente, isto ocorreu em consequência de um aumento da adesão dos conídios à folha. Entretanto, o efeito de períodos intermitentes de molhamento deve ser avaliado, uma vez que a duração do período seco pode influenciar negativamente no desenvolvimento da doença, como observado em outros patossistemas. Hong e Fitt (1995) relatam que a severidade de *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc. diminuiu com o aumento do período seco (três a oito horas).

Alternaria euphorbiicola aparentemente não precisou de um período de exposição ao molhamento para matar a parte aérea das plantas da população EKLN19. Entretanto, em um segundo experimento, isso não se repetiu (Figura 8). Também não se observou mortalidade nas demais populações testadas. Essa variação observada em EKLN19 pode ser devida ao manejo de irrigação ou a condições ambientais de umidade relativa potencialmente elevada na casa de vegetação que teria permitido a germinação e infecção do fungo. Mabbayad e Watson (1995) observaram que *Alternaria* sp. não precisou de molhamento para matar plantas de *S. zeylanica*. No entanto, estudos posteriores feitos com esse patossistema não confirmaram estas primeiras observações. A germinação de conídios e conseqüentemente a infecção, ocorrem na ausência de molhamento quando se utiliza formulações apropriadas como por exemplo uma emulsão ou emulsão invertida (água em óleo) (Auld, 1993; Yang *et al.*, 1993; Shabana, 1996). O desenvolvimento de formulações apropriadas para reduzir essa dependência do molhamento é um dos principais desafios na área de micoherbicidas (Boyette *et al.*, 1996).

Os resultados aqui apresentados abrem novas perspectivas de se retomar o programa pioneiro de controle biológico de *E. heterophylla* no Brasil, uma vez que os fungos estudados até o momento como potenciais micoherbicidas, *B. euphorbiae* e *S. poinsettiae*, apresentaram limitações significativas. No momento, parece improvável que *B. euphorbiae* e *S. poinsettiae* possam ter um bom desempenho como micoherbicidas. Os resultados obtidos mostraram que *A. euphorbiicola* pode ser desenvolvido como micoherbicida para o controle de *E. heterophylla*, principalmente por ser capaz de atuar em estádios e populações em que os herbicidas não são eficientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arevalo, R.A.; Rozanski, A. 1991. Plantas Daninhas na cultura do feijão. In: “*Anais do 4º Seminário sobre Pragas e Doenças do Feijoeiro*”, pp. 33-43. Campinas: Secretaria da Agricultura e Abastecimento. Campinas, São Paulo.
- Auld, B.A. 1993. Vegetable oil suspension emulsions reduce dew dependence of a mycoherbicide. *Crop Protection*, v.12, n.6, p. 477-479.
- Barreto, R.W.; Evans, H.C. 1998. Fungal pathogens of *Euphorbia heterophylla* and *E. hirta* in Brazil and their potential as weed biocontrol agents. *Mycopathologia*, v. 141, p. 21-36.
- Boyette, C.D.; Quimby Jr., P.C.; Caesar, A.J.; Birdsall, J.L.; Connick Jr., W.J.; Daigle, D.J.; Jackson, M.A.; Egley, G.H.; Abbas, H.K. 1996. Adjuvants, formulations, and spraying systems for improvement of mycoherbicides. *Weed Technology*, v.10, p. 637-644.
- Campbell, C.L.; Madden, L.V. 1990. “Introduction to plant disease epidemiology”. John Wiley & Sons, New York, 532p.
- Charudattan, R. 2001. Biological Control of weeds by means of plant pathogens: Significance for integrated weed management in modern agro-ecology. *BioControl*, v.46, p.229-260.
- Constantin, J.; Contiero, R.L.; Demeis, M.; Ita, A.G.; Maciel, C.D. de G. 1997. Controle de *Euphorbia heterophylla* e fitotoxicidade dos herbicidas imazamox e imazethaphyr na cultura da soja (*Glycine Max* L. Merrill). In: “*Resumos do XXI Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas*”, pp. 451, Caxambu, Minas Gerais
- Dhingra, O.D.; Sinclair, J.B. 1995. Basic Plant Pathology Methods. CRC Press, Inc., New York, 434p.
- Gazziero, D.L.P.; Brighenti, A.M.; Maciel, C.D.G.; Christofolleti, P.J.; Adegas, F.S.; Voll, E. 1998. Resistência de amendoim-bravo aos herbicidas inibidores da enzima ALS. *Planta Daninha*, v.16, n.2, p.117-125.
- Gazziero, D.L.P.; Yorinori, J.T. 1993. Experiência sobre controle biológico de *Euphorbia heterophylla* no Brasil. FCAV, UNESP, Jaboticabal, 11p.
- Guedes, L.V.; Wiles, T.L. 1976. Controle de plantas daninhas em plantio direto de soja: avaliação em escala comercial em fazendas. In: “*Resumos do XI Seminário Brasileiro de Herbicidas e Ervas Daninhas*”, pp.131, Londrina, Paraná.
- Green, S.; Bailey, K.L. 2000a. Effects of leaf maturity, infection site, and application rate of *Alternaria cirsiinxia* conidia on infection of Canada thistle (*Cirsium arvense*). *Biological Control*, v.19, 167-174.
- Green, S.; Bailey, K.L. 2000b. Influence of moisture and temperatures on infection of Canada thistle by *Alternaria cirsiinxia*. *Plant Disease*, v. 84, n.10, 1126-1132.

- Hong, C.X.; Fitt, B.D.L. 1995. Effects of inoculum concentration, leaf age and wetness period on the development of dark leaf and pod spot (*Alternaria brassicae*) on oilseed rape (*Brassica napus*). *Annals of Applied Biology*, v. 127, 283-295.
- INMET 1992. Normais Climatológicas (1961-1990), Brasília, DF.
- Instituto Agrônomo do Paraná. 1977. Recomendações técnicas para a cana-de-açúcar no estado do Paraná, n.6, 96p
- Lawrie, J.; Down, V.M.; Greaves, M.P. 2000. Factors influencing the efficacy of the potential microbial herbicide *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler on *Amaranthus retroflexus* (L.). *Biocontrol Science and Technology*, v.10, 81-87.
- Lorenzi, H. 2000. Plantas Daninhas do Brasil : terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. Instituto Plantarum: Nova Odessa, SP, 648p.
- Mabbayad, M.O.; Watson, A.K. 1995. Biological control of gooseweed (*Sphenoclea zeylanica* Gaertn.) with an *Alternaria* sp. *Crop Protection*, v.14, n.5, p. 429-433.
- Masangkay, R.F.; Paulitz, T.C.; Hallett, S.G.; Watson, A.K. 1999. Factors influencing biological control of *Sphenoclea zeylanica* with *Alternaria alternata* f.sp. *sphenocleae*. *Plant Disease*, v. 83, n.11, p. 1019-1024.
- Melhorança, A.L.; Pereira, F.A.R. 1999. Eficiência do herbicida lactofen no controle de *Euphorbia heterophylla*, resistente aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS). *Documentos-Embrapa Agropecuária Oeste*, v. 3, p.11-14.
- Mikusinski Costa, O.M. 1987. Ocorrência de regeneração adventícia na leiteira (*Euphorbia heterophylla* L.). *Agronomia sulriograndense*, v.23, n.2, p.157-165.
- Nechet, K.L.; Barreto, R.W.; Mizubuti, E.S.G. 2002. Seleção de isolados de fungos patogênicos à *Euphorbia heterophylla* para o uso em controle biológico. *Fitopatologia Brasileira*, v.27, suplemento, p.141.
- Pereira, J.M.; Barreto, R.W.; Ellison, C.A.; Maffia, L.A. 2003. *Corynespora cassiicola* f. sp. *lantanae*: a potential biocontrol agent for *Lantana camara* from Brazil. *Biological Control*, v.26, n.1, p.21-31.
- Rotem, J. 1994. The Genus *Alternaria*. Biology, Epidemiology, and Pathogenicity. APS Press, St. Paul, MN, 326p.
- Shabana, Y.M. 1996. Formulation of *Alternaria eichhorniae*, a mycoherbicide for waterhyacinth, in invert emulsion averts dew dependence. *Journal of Plant Disease and Protection*, v. 104, p.231-238.
- Stewart-Wade, S.M.; Lawrie, A.C.; Bruzzese, E. 1998. An Australian isolate of *Alternaria crassa* shows potential as a mycoherbicide to control the weed *Datura stramonium*. *Australasian Plant Pathology*, v. 27, p.186-197.

- Tilley, A.M.; Walker, H.L. 2002. Evaluation of *Curvularia intermedia* (*Cochliobolus intermedius*) as a potential microbial herbicide for large crabgrass (*Digitaria sanguinalis*). *Biological control*, v. 25, p.12-21.
- Voll, E.; Gazziero, D.L.P.; Brighenti, A.A.M.; Adegas, F.S. 2002. Competição relativa de espécies de plantas daninhas com dois cultivares de soja. *Planta Daninha*, v.20, n.1, p.17-24.
- Walker, L. 1980. Production of spores for field studies. *Advances in Agricultural Technology*, v. 12, p.1-5.
- Walker, H.L. 1981. Factors affecting biological control of spurred anoda (*Anoda cristata*) with *Alternaria macrospora*. *Weed Science*, v. 29, p.505-507.
- Walker, H.L.; Riley, J.A. 1982. Evaluation of *Alternaria cassiae* for the bicontrol of sicklepod (*Cassia obtusifolia*). *Weed Science*, v. 30, p.651-654.
- Yang, S.; Johnson, D.R.; Dowler, W.M.; Connick Jr., W.J. 1993. Infection of leafy spurge by *Alternaria alternata* and *A. angustiovoidea* in the absence of dew. *Phytopathology*, v. 83, n.9, p. 953-958.
- Yorinori, J.T. 1985. Biological control of milkweed (*Euphorbia heterophylla*) with pathogenic fungi. In: "Proceedings of the VI International Symposium on Biological Control of Weeds.", (Delfosse, E.S. Ed.), pp.677-681, 1985, Vancouver Agriculture Canada, Vancouver, Canada.
- Yorinori, J.T.; Gazziero, D.L.P. 1989. Control of milkweed (*Euphorbia heterophylla*) with *Helminthosporium* sp. In: "Proceedings of the VII International Symposium on Biological Control of Weeds.", (Delfosse, E.S. Ed.), pp.571-576, 1989, Rome Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale, Rome, Italy.

**ESPECIFICIDADE, SOBREVIVÊNCIA E TRANSMISSÃO DE
Alternaria euphorbiicola, POTENCIAL AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO
DO LEITEIRO (*Euphorbia heterophylla*)**

RESUMO

O fungo *Alternaria euphorbiicola* é um potencial micoherbicida capaz de causar mortalidade da parte aérea de populações de *Euphorbia heterophylla*. Sua especificidade, sobrevivência e transmissão foram avaliadas em condições controladas. O fungo foi restrito às euforbiáceas *Chamaesyce hirta*, *C. hyssopifolia*, *E. heterophylla*, *E. cotinifolia*, *E. milii*, *E. pulcherrima* e *E. tirucali*. A severidade da doença variou de acordo com a espécie, mas a morte do hospedeiro foi verificada apenas em populações de *E. heterophylla*. *A. euphorbiicola* causou desfolha total em *C. hirta* e pode ser também explorada para o controle dessa invasora. O fungo sobreviveu em hastes de leiteiro colonizadas localizadas na superfície do solo úmido e seco e, quando enterradas, apenas em solo seco durante os dois meses de avaliação. As hastes colonizadas mantidas na superfície do solo úmido serviram como fonte de inóculo do patógeno para as plântulas de *E. heterophylla* emergentes. O hipocótilo dessas plântulas apresentou sintoma típico de cancro de *Alternaria*, 25 dias após a emergência. No entanto, a transmissão e infecção natural não foram suficientes para o controle das populações de *E. heterophylla*. A aplicação de uma suspensão de 2×10^5 conídios/mL foi necessária para o controle uniforme de todas as populações. A aplicação de uma suspensão de conídios numa concentração mais baixa (2×10^4 conídios/mL) não controlou a maioria das plantas previamente infectadas (emergência próximo a uma fonte de inóculo) e a intensidade da doença verificada nessas plantas não diferiu da observada em plantas saudáveis.

ABSTRACT

The fungus *Alternaria euphorbiicola* is a potential mycoherbicide capable of causing shoot mortality of *Euphorbia heterophylla*. Its host specificity, survival, and

transmission were evaluated under controlled conditions. The fungus was restricted to the euphorbiaceous species: *Chamaesyce hirta*, *C. hyssopifolia*, *E. heterophylla*, *E. cotinifolia*, *E. milii*, *E. pulcherrima* and *E. tirucali*. The disease severity varied on different species, but mortality occurred only in the populations of *E. heterophylla*. *A. euphorbiicola* caused total defoliation in *C. hirta* and can be explored for the control of this weed also. The fungus survived at least for two months in the previously colonized milkweed stems left over the dry or wet soil surface or buried in dried soil. The colonized stems kept on the wet soil surface served as the inoculum source for the emerging seedlings of *E. heterophylla*. The hypocotyls of these seedlings showed typical canker symptoms 25 days after emergence. However, the natural transmission and infection was not sufficient to control the *E. heterophylla* populations. The application of a 2×10^5 /mL conidial suspension of was essential for uniform control of all the populations. The use of lower concentrations of (2×10^4 /mL) conidial inoculum did not control most of the previously infected plants (emergence near the inoculum source) and the disease intensity on these plants did not differ from that on the control plants.

INTRODUÇÃO

Euphorbia heterophylla L. é uma euforbiácea popularmente conhecida como leiteiro, leiteira ou amendoim-bravo e sua importância agrícola deve-se à sua frequente presença como invasora de culturas economicamente importantes, entre elas milho, cana-de-açúcar, feijão, sendo considerada uma das principais invasoras da cultura da soja no Brasil (Kissmann e Groth, 1993). A competição de *E. heterophylla* após a emergência da cultura resulta em estimativas de até 35 % de redução na produção da soja (Voll *et al.*, 2002), considerada o principal produto agrícola de exportações brasileiras (Timossi, 2002). Além da elevada agressividade e competitividade da invasora, seu controle tem sido dificultado pela seleção de populações da planta resistente aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS), o principal grupo de herbicidas aplicados na cultura da soja (Gazziero *et al.*, 1997; Melhorança e Pereira, 1999). Neste contexto, o uso de agentes de controle biológico, isoladamente ou

em mistura com os produtos químicos, pode representar mais uma estratégia no manejo dessa invasora no campo.

A ocorrência do fungo *Alternaria euphorbiicola* Simmons & Engelhart, agente causal do cancro em *E. heterophylla* foi descrita pela primeira vez no Brasil por Barreto e Evans (1998) e a incidência e severidade dessa doença no campo despertaram o interesse em se estudar o potencial desse fungo como um micoherbicida. Anteriormente a esse relato, Yorinori (1985) já havia demonstrado que no campo uma única lesão de *Alternaria* sp. na haste era capaz de causar a morte de plântulas de leiteiro. Mais recentemente, demonstrou-se que em condições controladas com seis horas de molhamento a 26°C, diferentes populações da planta, inclusive uma representando as resistentes ao herbicida inibidor da ALS (imazethaphyr) foram controladas eficientemente por *A. euphorbiicola* e até mesmo em estádio (três a quatro pares de folhas) em que os herbicidas químicos já não são recomendados.

Micoherbicida é definido como um fungo fitopatogênico usado para o controle de invasoras através da aplicação massal e repetida de seu inóculo (Charudattan e Dinoor, 2000), da mesma forma que um herbicida químico. Mas, enquanto os herbicidas químicos podem deixar resíduos no solo, provocando problemas ambientais e efeito tóxico para as culturas sucessivas, sofrer deriva durante a aplicação, afetando plantas em áreas próximas, em alguns casos prejudicar organismos não alvos e mesmo a saúde humana, os micoherbicidas, em geral, são considerados seguros. O conceito geral de micoherbicidas como substitutos dos herbicidas químicos leva à atribuição de importância ao estabelecimento de um alto nível de infecção primária e uma negligência geral para os ciclos secundários da doença e seu efeito no controle de invasoras (Yang e TeBeest, 1993). Isso se deve ao fato de que o controle de invasoras, para ser efetivo, deve produzir efeito na época de maior interferência, nas primeiras três a quatro semanas de crescimento da cultura e, portanto a infecção primária seria decisiva para o sucesso do agente de controle biológico (Masangkay *et al.*, 1999). Por outro lado, a capacidade do fungo sobreviver no campo e se disseminar, produzindo ciclos secundários da doença, pode ter grande importância e ser explorada num programa de manejo sustentável da invasora. Plantas já infectadas poderiam ser controladas eficientemente pela aplicação complementar do micoherbicida em concentrações mais baixas a cada estação. Isto poderia resultar em uma diminuição de custo a longo prazo para o produtor, tornando o produto mais atraente para uso no controle da planta invasora, no caso o leiteiro. Além desse aspecto, em programas visando o

desenvolvimento de um micoherbicida, assim como nos programas de controle biológico clássico (Weidmann, 1991), é fundamental que se determine a especificidade do fungo a ser usado, de modo a se avaliar o risco para culturas, que podem ser suscetíveis, e verificar se outras invasoras podem ser controladas pelo mesmo agente de biocontrole.

Neste trabalho foram investigados a gama de hospedeiros de *A. euphorbiicola*; a capacidade de sobrevivência e transmissão dos conídios do fungo em diferentes condições de umidade ao longo do tempo e o efeito da aplicação de suspensão de conídios do micoherbicida em uma concentração mais baixa no controle de plantas de leiteiro já infectadas durante ciclo secundário da doença.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Produção de inóculo:

Os esporos de *A. euphorbiicola* KLN06 foram obtidos segundo metodologia de Walker (1980) com modificações. Dez discos de micélio do fungo cultivados em placas de Petri contendo meio CVA (caldo de vegetais agar, Pereira *et al.*, 2003) foram semeados assepticamente em erlenmeyers contendo 100 mL de meio CV (meio CVA sem adição de agar) e colocados em agitador orbital a 30 rpm por sete dias a temperatura ambiente. Após esse período, o micélio foi triturado dentro dos erlenmeyers, utilizando-se um microtriturador/homogeneizador, e vertido em bandejas de alumínio de 20x28 cm contendo 100 mL de meio CVA. Em seguida, as bandejas foram mantidas a 26°C em fotoperíodo de 12 horas sob um conjunto de duas lâmpadas fluorescentes (40 W) e duas lâmpadas negras (40 W). Após dois dias, foi feita a coleta de esporos vertendo-se 50 mL de água destilada e esterilizada sobre a superfície das bandejas e raspando-se estas com espátula de borracha. A suspensão obtida foi filtrada através de gaze e ajustada para a concentração a ser utilizada.

2. Avaliação da especificidade:

Para verificar a gama de hospedeiros de *A. euphorbicola* KLN06, as plantas foram escolhidas segundo a seqüência colocada no método centrífugo-filogenético

(Wapshere, 1974). Foram incluídas espécies pertencentes à Subclasse Rosidae, com concentração no gênero Euphorbiae e na família Euphorbiaceae e, adicionalmente, incluíram-se espécies economicamente importantes, plantas hospedeiras de fungos do gênero *Alternaria* e oito cultivares de soja, considerando-se a possível exposição futura desta cultura a um micoherbicida produzido a base de *A. euphorbiicola* (Tabela 1). Para confirmação da virulência do inóculo utilizado foram incluídas também representantes de duas populações de *E. heterophylla*. A idade das plantas testadas variou de acordo com a espécie, mas todas apresentavam folhas em todos os estádios de desenvolvimento. As plantas foram inoculadas com uma suspensão de 2×10^5 conídios/mL + óleo mineral (5%) + Break thru[®] 0,05% (copolímero poliéter-polimetil siloxano + poliéter) até o ponto de escorrimento, levadas para câmara de nevoeiro a 25°C por 24 horas e, em seguida, transferidas para casa de vegetação (26±2°C). Foram utilizadas três repetições, sendo cada repetição representada por um vaso com uma planta. Plantas inoculadas com água + óleo mineral (5%) + Break thru[®] (0,05%) constaram como controle. As avaliações foram feitas a cada cinco dias, durante 30 dias, verificando a presença ou não de sintomas nas folhas, ramos e inflorescências. O reisolamento do patógeno foi feito sempre que alguma planta apresentava aparente sintoma de colonização pelo fungo.

3. Sobrevivência:

As hastes de leiteiro infectadas foram obtidas de plantas mortas em função da aplicação anterior de uma suspensão de 2×10^5 conídios de *A. euphorbiicola*/mL. Hastes de leiteiro obtidas de plantas sadias serviram como controle. Dez hastes foram cortadas em um mesmo tamanho (8 cm) e colocadas sobre a superfície ou enterradas a 2,0 cm da superfície de vasos de 1,0 L, contendo uma mistura de quatro partes de terra, duas de esterco e uma de areia. A mistura foi esterilizada com brometo de metila. Em cada situação foi simulado um ambiente úmido (regado diariamente) e um ambiente seco (não regado).

Para verificar a porcentagem de germinação dos conídios antes da montagem do experimento, 50 hastes colonizadas foram colocadas em um Becker contendo água destilada e esterilizada e agitadas para obtenção de uma suspensão de esporos de *A. euphorbiicola*. Uma alíquota de 500 µl dessa suspensão foi depositada no centro de uma placa de Petri contendo agar-água, espalhada com auxílio da alça de Drigalski, e

colocadas em incubadoras a 25°C por seis horas em fotoperíodo de 12 horas sob um conjunto de duas lâmpadas fluorescentes (40 W) e duas lâmpadas negras (40 W). A avaliação dos esporos germinados foi feita contando-se os primeiros 200 conídios em cada placa. Os esporos foram considerados germinados quando o comprimento do tubo germinativo era igual ou maior que o comprimento do conídio. A sobrevivência do fungo foi avaliada após um e dois meses. Três hastes de cada tratamento foram coletadas, lavadas em água corrente, colocadas por dois minutos em solução de hipoclorito de cálcio (2%) e em seguida em água destilada esterilizada. A seguir, as hastes foram colocadas em câmara úmida por 24 e 48 horas para verificação da presença ou não de conídios de *A. euphorbiicola*. Em caso de presença, os conídios foram raspados da superfície da haste, com auxílio de um bisturi, e colocados em uma gota de água destilada esterilizada no centro de placas de Petri contendo agar-água. A suspensão foi espalhada com alça de Drigalski e as placas mantidas a 26°C por seis horas para verificar a viabilidade dos conídios. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial de dois tratamentos (hastes sadias e colonizadas), duas localizações das hastes (superfície ou enterrada), dois ambientes (solo úmido e seco) e cinco repetições, sendo cada repetição considerada como um vaso.

4. Transmissão:

O estudo envolvendo a avaliação da transmissão do fungo para as plantas emergentes foi conduzido nas mesmas condições descritas no item 3, com as duas localizações de hastes previamente infectadas (superfície do solo ou enterradas a 2,0 cm), mas apenas em condições de umidade. Após a montagem, duas sementes de leiteiro e uma de soja da cultivar UFV 2001 foram semeadas por vaso e a incidência da doença nas plantas foi avaliada após um mês. As sementes de leiteiro foram obtidas da mistura de 20 diferentes populações coletadas em localidades dos estados da Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e Roraima, no Brasil.

5. Efeito da aplicação de uma suspensão de conídios do micoherbicida numa concentração mais baixa no controle de plantas de leiteiro infectadas em ciclo secundário da doença:

Um grupo de plantas de leiteiro infectadas a partir de inóculo proveniente de haste de leiteiro previamente colonizadas, obtidas segundo a metodologia descrita no item 4, e um grupo de plantas sadias foram pulverizados com uma suspensão de 2×10^4 conídios/mL + óleo mineral 3% + Break Thru® 0,05% e colocadas em câmara de nevoeiro a 25°C por seis horas. Em seguida, foram transferidas para casa de vegetação ($26 \pm 2^\circ\text{C}$). Um grupo de plantas infectadas e um de plantas sadias foram pulverizados com água óleo mineral 3% + Break thru® 0,05% servindo como controle. A intensidade da doença foi avaliada a cada cinco dias, durante 30 dias, e comparada com a intensidade da doença em plantas sadias inoculadas com a suspensão de 2×10^5 conídios/mL. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos e cinco repetições, sendo cada repetição representada por um vaso com duas plantas de leiteiro no estágio de três a quatro pares de folhas.

6. Análise dos dados:

A partir dos dados de intensidade da doença foi calculada a AACPD (área abaixo da curva de progresso da doença, Campbell e Madden, 1990). Os dados foram submetidos à análise de variância usando o proc GLM do programa SAS versão 6.12.

RESULTADOS

Avaliação de especificidade:

Alternaria euphorbiicola foi patogênico à maioria das espécies dos gêneros *Euphorbia* e *Chamaesyce* (Euphorbiaceae), mas a morte da parte aérea das plantas em função da aplicação do fungo ocorreu apenas nas populações de *E. heterophylla*, dois dias após a inoculação (Tabela 1).

Tabela 1: Teste de especificidade de *Alternaria euphorbiicola**

Subclasse Rosidae			
Ordem	Família	Nome Científico	Resultado ^a
Apiales	Apiaceae	<i>Daucus carota</i> L. ^b	0
Euphorbiales	Euphorbiaceae	<i>Acalypha godseffiana</i> Masters	0
		<i>Acalypha reptans</i> Sw.	0
		<i>Acalypha wilkesiana</i> M. Arg.	0
		<i>Codiaeum variegatum</i> Blume	0
		<i>Chamaesyce hirta</i> (L.) Millsp.	2
		<i>Chamaesyce hyssopifolia</i> (L.) Small	1
		<i>Euphorbia cotinifolia</i> L.	3
		<i>Euphorbia heterophylla</i>	
		população KLN19	4
		população TRB	4
		<i>Euphorbia milii</i> des Moulins	1
		<i>Euphorbia pulcherrima</i> Wild. ex Klot.	2
		<i>Euphorbia tirucali</i> L.	1
		<i>Hevea brasiliensis</i> Wild. ex Adr. de Juss.) Muell. & Arg.	1
		<i>Jatropha podagrica</i> Hook	0
		<i>Manihot esculenta</i> Crantz	0
		<i>Pedilanthus tithymaloides</i> Poit.	0
		<i>Phyllanthus corcovadensis</i> Roxb.	0
		<i>Ricinus communis</i> L.	0
Fabales	Fabaceae	<i>Glycine max</i> (L.) Merr. ^c	
		cv. UFV 19	0
		cv. UFV 16	0
		cv. UFV 16 Precoce	0
		cv. UFV 2001	0
		cv. UFV 2006	0
		cv. UFV 2007	0
		cv. UFV 2008	0
		cv. UFV 2009	0
		<i>Phaseolus vulgaris</i> L. ^{bc}	0
Geraniales	Tropaeolaceae	<i>Tropaeolum majus</i> L.	0
Myrtales	Myrtaceae	<i>Eugenia uniflora</i> L.	0
Proteales	Proteaceae	<i>Grevillea banksii</i> R. Br.	0

Tabela 1, Cont.

Subclasse Rosidae			
Ordem	Família	Nome Científico	Resultado ^a
Rhamnales	Vitaceae	<i>Vitis</i> sp.	0
Rosales	Rosaceae	<i>Rosa sinensis</i> Jacq.	0
Sapindales	Anacardiaceae	<i>Mangifera indica</i> L.	0
	Rutaceae	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	0
Espécies salvaguardas economicamente importantes			
Sub Classe Asteridae			
Asterales	Asteraceae	<i>Helianthus annuus</i> L. ^b	0
Solanales	Solanaceae	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. ^b	0
		<i>Solanum tuberosum</i> L. ^b	0
Sub Classe Dilleniidae			
Capparales	Brassicaceae	<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>acephala</i> ^b	0
Malvales	Malvaceae	<i>Gossypium</i> sp. ^{bc}	0
Sub Classe Liliidae			
Liliales	Alliaceae	<i>Allium cepa</i> L. ^b	0
Sub Classe Commelinidae			
Cyperales	Poaceae	<i>Saccharum</i> sp. ^c	0
		<i>Zea mays</i> L. ^c	0

^a(0) ausência de sintomas; (1) pinta preta nas folhas; (2) desfolha da planta; (3) desfolha da planta com rebrota e (4) morte da parte aérea da planta.

^bEspécies hospedeiras do gênero *Alternaria*.

^cEspécies economicamente importantes que sofrem competição de *Euphorbia heterophylla*.

*Isolado utilizado KLN06.

A severidade da doença variou de acordo com a espécie. Os sintomas iniciais nas espécies de *Chamaesyce* e de *Euphorbia* foram observados cinco dias após a inoculação. A severidade mais alta, observada abaixo da obtida para o *E. heterophylla*, foi para *C. hirta* e *E. pulcherrima* que apresentaram desfolha completa. Em *C. hirta*, antes da queda das folhas, foram observadas manchas circulares púrpuras nas folhas e irregulares no pecíolo. Na espécie *E. pulcherrima* houve manchas circulares escuras nas

folhas que antes da queda ficavam amareladas e encarquilhadas. No pecíolo foram observadas manchas escuras. A desfolha foi observada também em *E. cotinifolia*, mas após 15 dias observaram-se folhas sadias nessas plantas. As demais plantas afetadas, *E. tirucali*, *E. milii* e *C. hyssopifolia*, apresentaram sintomas de pinta preta nas folhas, mas isto não afetou o crescimento dessas plantas, pois novas folhas sadias foram surgindo ao longo do tempo de avaliação. Em folhas de plantas que não apresentaram sintomas foi constatada, em observação sob microscópio estereoscópio, a presença de conídios de *A. euphorbiicola* e a partir dessas áreas foi feito isolamento indireto. Como não se obtiveram colônias do patógeno foi confirmada a não colonização do tecido foliar pelo fungo. Para as plantas sintomáticas, citadas anteriormente, foi feito o reisolamento do fungo a partir das lesões de folhas e hastes e confirmada a presença de *A. euphorbiicola*.

Sobrevivência

Alternaria euphorbiicola foi capaz de sobreviver nas hastes de leiteiro em ambas condições de umidade testadas durante os dois meses de avaliação (Tabela 2). Apenas quando as hastes colonizadas foram enterradas e umedecidas diariamente não se observou a sobrevivência do fungo. Nessa situação, o material já apresentava adiantada deterioração e outras espécies fúngicas, entre elas *Aspergillus* sp. e *Cladosporium*, haviam crescido sobre as hastes. Uma diferença relevante observada entre a sobrevivência em ambiente úmido e seco foi o período de câmara úmida necessário para a formação dos conídios de *A. euphorbiicola* nas hastes. Em 24 horas, os conídios foram verificados nas hastes provenientes de ambiente úmido, enquanto nas de ambiente seco, somente após 48 horas de câmara úmida. A viabilidade dos conídios, verificada pela porcentagem de germinação, foi acima de 80% no primeiro mês e de 70% no segundo mês (Tabela 2).

Transmissão

Sintomas típicos de cancro de *Alternaria* em plantas de leiteiro com 25 dias de emergência foram observados apenas no tratamento onde as hastes colonizadas com *A. euphorbiicola* estavam localizadas na superfície do vaso e que foram umedecidas

Tabela 2: Sobrevivência e viabilidade de conídios de *A. euphorbiicola* em hastes de *E. heterophylla*, após 1 e 2 meses, em diferentes localizações e condições de umidade do solo.

Ambiente	Localização	Sobrevivência ^a		Germinação de conídios ^b	
		1 mês	2 meses	1 mês	2 meses
Úmido	Superfície	+	+	90,4a	84,6b
	Enterrado	+	-	-	-
Seco	Superfície	+	+	97,4a	86,8b
	Enterrado	+	+	88,8a	75,2b

^a+ = esporulação de *A. euphorbiicola* em todas as repetições e - = ausência de *A. euphorbiicola*

^bMédias seguidas pela mesma letra na horizontal não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% entre os meses avaliados.

diariamente (Figura 1). Plantas nas quais se aplicaram os demais tratamentos e as testemunhas não apresentaram sintomas da doença. A incidência da doença foi de 100%, mas não causou a morte das plantas, que continuaram a apresentar crescimento aparentemente normal. Não foi observado sintoma da doença na cultivar de soja testada.

Efeito da aplicação de uma suspensão de conídios do micoherbicida numa concentração mais baixa no controle de plantas de leiteiro infectadas em ciclo secundário da doença

Não houve diferença significativa da intensidade da doença durante o período de avaliação entre as plantas infectadas e as sadias inoculadas com a suspensão de 2×10^4 conídios de *A. euphorbiicola*/mL (Figura 2).

A morte da parte aérea foi observada tanto em plantas sadias como nas previamente infectadas inoculadas com suspensão de 2×10^4 conídios/mL. Entretanto, plantas previamente infectadas morreram após dez dias, enquanto as sadias somente 20 dias após a inoculação. A parte aérea de todas as plantas inoculadas com a suspensão de 2×10^5 conídios/mL morreu cinco dias após a inoculação (Figura 3). As plantas infectadas pulverizadas com água não apresentaram diferença de crescimento e estágio



Figura 1: Sintoma do cancro de *Alternaria* em hipocótilo de *E. heterophylla* como resultado da transmissão a partir de hastes de leiteiro colonizadas localizadas na superfície do vaso em solo úmido.

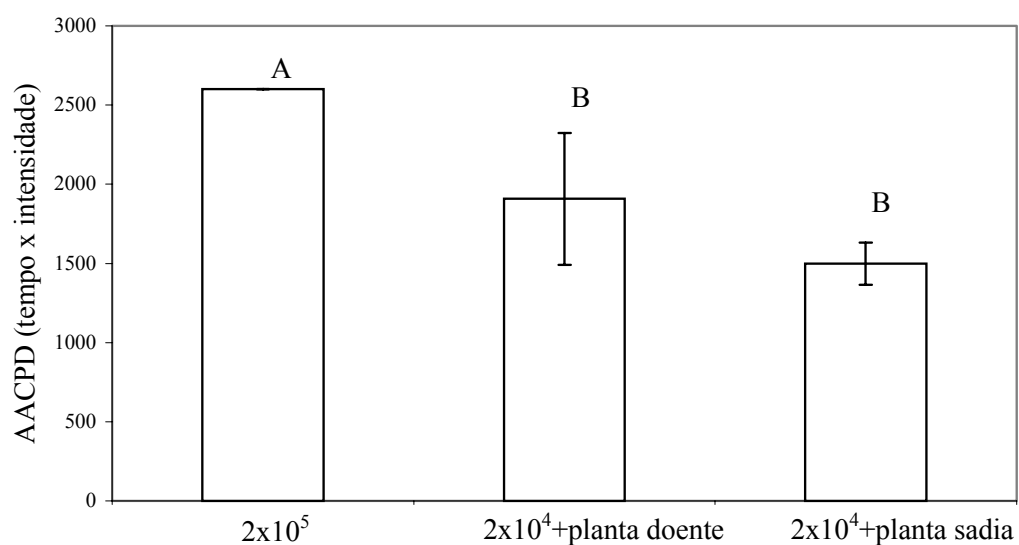


Figura 2: Área abaixo da curva de progresso da doença calculada utilizando a intensidade da doença em plantas saudias de *E. heterophylla* inoculadas com suspensões de 2×10^5 e 2×10^4 e plantas previamente infectadas inoculadas com 2×10^4 conídios de *A. euphorbiicola*/mL. Médias = cinco repetições; Barra = desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5%.

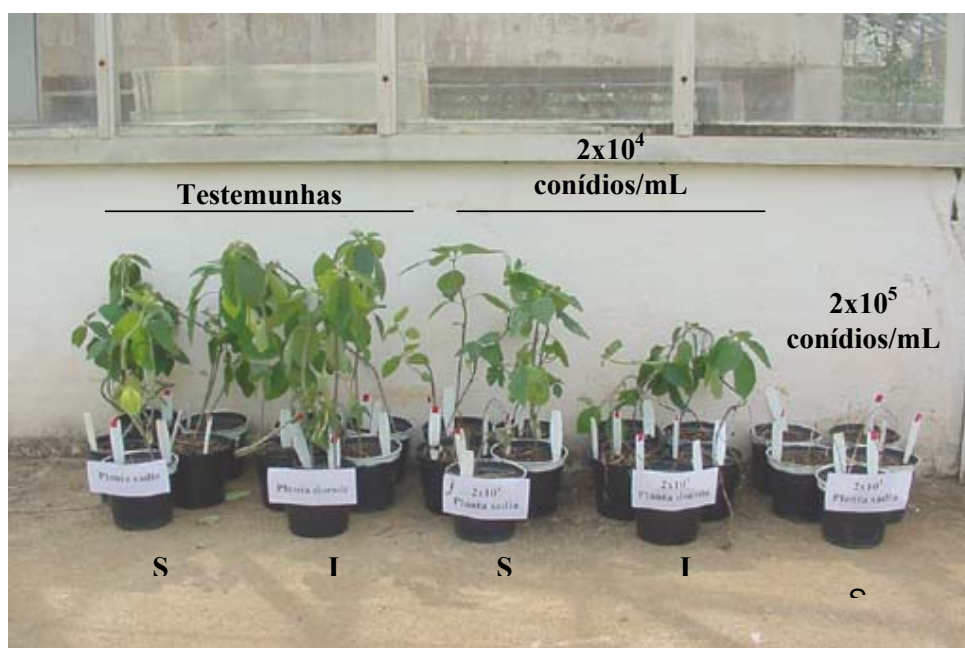


Figura 3: Intensidade da doença observada em plantas de *E. heterophylla*, 30 dias após a inoculação das suspensões de conídios (2×10^4 e 2×10^5 conídios/mL) em plantas saudas (S) e previamente infectadas (I).

fenológico em relação à testemunha (plantas saudas e pulverizadas com água), confirmando assim, que apenas a presença de sintoma da doença resultante da transmissão da doença a partir de uma fonte de inóculo não teve efeito sobre o desenvolvimento de *E. heterophylla* (Figura 3).

DISCUSSÃO

Algumas espécies pertencentes aos gêneros *Chamaesyce* e *Euphorbia* foram suscetíveis a *A. euphorbiicola*. A infecção natural dessas euforbiáceas pelo fungo nunca foi registrada na literatura e talvez não ocorra ou seja rara em condições naturais. A especificidade de um fungo é comumente considerada como um ponto favorável para um candidato ao desenvolvimento de um micoherbicida, por indicar um risco baixo para plantas não alvos. No entanto, essa característica pode representar grande desvantagem

quando se compara o alcance de um micoherbicida com o espectro de ação dos herbicidas químicos, capazes de controlar várias espécies de invasoras ao mesmo tempo. Atualmente, tem sido visto como favorável a perspectiva de se usar um micoherbicida em diversas culturas e com menos especificidade, possibilitando o controle de várias invasoras. O interesse comercial dessa tecnologia pode ser aumentado desta forma (Charudattan e Dinooor, 2000). Portanto, a capacidade de *A. euphorbiicola* ser patogênico à *C. hirta* e *C. hyssopifolia*, poderia aumentar a viabilidade comercial desse fungo como micoherbicida criando-se um mercado maior para o produto, uma vez que essas invasoras também têm importância na agricultura (Lorenzi, 2000). Precauções devem ser tomadas para se evitar a infecção de plantas ornamentais tais como *E. pulcherrima*, *E. milli* e *E. tirucali*. Estas, no entanto, não são normalmente encontradas próximas a plantações onde o micoherbicida seria utilizado. A inespecificidade observada em *A. euphorbiicola* dentro da família Euphorbiaceae é também conhecida para outras espécies de *Alternaria* e espécies pertencentes a gêneros próximos, estudadas como micoherbicidas. *Nyctelia alternantherae* Holcomb & Antonopoulos (= *Alternaria alternantherae* Holcomb & Antonopoulos) patógeno de *Alternanthera phylloxeroides* (Mart.) Griseb. infecta várias espécies da família Amaranthaceae (Holcom, 1977). *Alternaria crassa* (Sacc.) Rands controla a invasora *Datura stramonium* L. e causa doença também em outras plantas da família Solanaceae (Stewart-Wade *et al.*, 1998) e *Alternaria cassiae* Jurair & Khan, investigada como controle para *Senna obtusifolia* (L.) H.S. Irwin & Barneby, é patogênico também às espécies *Cassia occidentalis* L. e *Crotalaria spectabilis* Roth, todas pertencentes à família Fabaceae (Walker, 1982). Apenas *Alternaria zinniae* M.B. Ellis testada no controle de espécies de *Xanthium* na Austrália tem uma gama de hospedeiros que extrapola o limite de família sendo patogênica também a plantas de outras 10 famílias, além da família Asteraceae (Auld *et al.*, 1992).

Alternaria euphorbiicola sobreviveu em hastes de leiteiro colonizadas tanto em ambiente com alta ou baixa umidade do solo. Assim, existe o potencial de persistência de uma fonte de inóculo do patógeno após a inoculação e morte de plantas de *E. heterophylla* no campo. Nas condições desse experimento, concluiu-se que a transmissão da doença a partir das hastes ocorre apenas em condições de alta umidade do solo e quando a fonte de inóculo está na superfície do solo. As hastes localizadas abaixo da superfície do solo, em ambiente úmido, degradaram-se rapidamente e o fungo não pareceu sobreviver em hastes mantidas nestas condições. A alta umidade e a

atividade microbiana tendem a reduzir a longevidade dos propágulos de espécies de *Alternaria* e a degradação é mais rápida abaixo do que na superfície do solo (Rotem, 1994).

Nemoto *et al.* (1997) estudando o efeito da incorporação de esporos de *A. cassiae* e a influência da umidade do substrato sobre a emergência e mortalidade de plântulas de *S. obtusifolia*, verificaram que a partir de 40% de umidade, ocorreu a mortalidade de plântulas em função da transmissão do fungo a partir do substrato. *Alternaria cirsinoxia* Simmons & Mortensen mantém a capacidade infectiva e produz conídios viáveis em folhas senescentes de *Cirsium arvense* (L.) Scop., invasora perene de culturas na América do Norte, por no mínimo dois a três meses após sua inoculação em condições de campo (Green *et al.*, 2001).

A infecção natural de plântulas de leiteiro a partir de uma fonte de inóculo não foi suficiente para o controle das populações dessa planta. Os resultados obtidos neste estudo apontam para a necessidade de aplicação de suspensão com concentração equivalente à estabelecida em trabalhos anteriores (2×10^5 conídios/mL) para que um controle uniforme seja obtido. Entretanto, a observação de algumas plantas mortas após a inoculação de uma concentração mais baixa de inóculo (2×10^4 conídios/mL) sugere que para algumas populações de *E. heterophylla* mais suscetíveis, este tratamento produza resultados satisfatórios. Uma diferença relevante observada entre o desenvolvimento da doença em plantas naturalmente infectadas e não infectadas previamente inoculadas com a suspensão de conídios numa concentração mais baixa foi a antecipação em dez dias da morte para plantas previamente infectadas. Esse desenvolvimento mais rápido da doença pode ser importante na redução da competição de populações de leiteiro com as culturas.

A sobrevivência e transmissão de *A. euphorbiicola* a partir de uma fonte de inóculo merece estudos complementares, pois pode ter importância no prolongamento do controle efetuado pelo fungo. Sua associação com outras técnicas deve ser explorada para o controle de plantas de *E. heterophylla* que germinam e emergem após a aplicação do fungo. Outra indicação sugerida por este estudo é a de que formulações sólidas contendo substrato pré-colonizado pelo fungo para aplicação na superfície do solo poderiam ser úteis para o controle de *E. heterophylla*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Auld, B.A.; Heather, E.; Talbot, E.; Radburn, K.B. 1992. Host range of three isolates of *Alternaria zinniae*, a potential biocontrol agent for *Xanthium* spp. *Plant Protection Quarterly*, v.7, n.3, p.114-116.
- Barreto, R.W.; Evans, H.C. 1998. Fungal pathogens of *Euphorbia heterophylla* and *E. hirta* in Brazil and their potential as weed biocontrol agents. *Mycopathologia*, v.141, p. 21-36.
- Campbell, C.L.; Madden, L.V. 1990. "Introduction to Plant Disease Epidemiology". John Wiley & Sons, New York, 532p.
- Charudattan, R.; Dinooor, A. 2000. Biological control of weeds using plant pathogens: accomplishments and limitations. *Crop Protection*, v.19, p. 691-695.
- Gazziero, D.L.P.; Brighenti, A.M.; Maciel, C.D.G.; Christofolleti, P.J.; Adegas, F.S.; Voll, E. 1997. Resistência de amendoim-bravo aos herbicidas inibidores da enzima ALS. *Planta Daninha*, v.16, n.2, p.117-125.
- Green, S.; Mortensen, K.; Bailey, K.L. 2001. Host range, temperature response, survival, and overwintering of *Alternaria cirsinoxia*. *Biological Control*, v.20, p.57-64.
- Holcomb, G.E. 1977. *Alternaria alternantherae* from alligatorweed also is pathogenic on ornamental Amaranthaceae species. *Phytopathology*, v. 68, n.3, p. 265-269.
- Kissmann, K.G.; Groth, D. 1993. "Plantas infestantes e nocivas. TomoII". São Paulo: Basf Brasileira, 798p.
- Lorenzi, H. 2000. Plantas Daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. Instituto Plantarum: Nova Odessa, SP.
- Masangkay, R.F.; Paulitz, T.C.; Hallett, S.G.; Watson, A.K. 1999. Factors influencing biological control of *Sphenoclea zeylanica* with *Alternaria alternata* f.sp. *sphenocleae*. *Plant Disease*, v.83, n.11, p.1019-1024.
- Melhorança, A.L.; Pereira, F.A.R. 1999. Eficiência do herbicida lactofen no controle de *Euphorbia heterophylla*, resistente aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS). *Documentos-Embrapa Agropecuária Oeste*, n.3, p.11-14.
- Nemoto, M.C.M.; Piteli, R.A.; Nemoto, L.R.P. 1997. Efeitos da incorporação de esporos de *Alternaria cassiae* sobre a emergência e mortalidade de plântulas de *Senna obtusifolia*: Influência da umidade do substrato e da dose de inoculo. In: "Resumos do XXI Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas", pp. 451, Caxambú, Minas Gerais.
- Pereira, J.M.; Barreto, R.W.; Ellison, C.A.; Maffia, L.A. 2003. *Corynespora cassicola* f.sp. *lantanae*: a potential biocontrol agent for *Lantana camara* from Brazil. *Biological Control*, v.26, n.1, p.21-31.

- Rotem, J. 1994. "The Genus *Alternaria*. Biology, Epidemiology and Pathogenicity". APS Press, St. Paul., MN.
- Stewart-Wade, S.M.; Lawrie, A.C.; Bruzzese, E. 1998. An Australian isolate of *Alternaria crassa* shows potential as a mycoherbicide to control the weed *Datura stramonium*. *Australasian Plant Pathology*, v. 27, p. 186-197.
- Timossi, A.J. 2002. "I Levantamento de safra 2002/2003 FNP Consultoria & Comércio: Grãos (milho e soja)". FNP Agroinformativos, Brasil.
- Voll, E.; Gazziero, D.L.P.; Brighenti, A.A.M.; Adegas, F.S. 2002. Competição relativa de espécies de plantas daninhas com dois cultivares de soja. *Planta Daninha*, v.20, n.1, p.17-24.
- Yang, X.B.; TeBeest, D.O. 1993. Epidemiological mechanisms of mycoherbicide effectiveness. *Phytopathology*, v. 83, n,9, p. 891-893.
- Yorinori, J.T. 1985. Biological control of milkweed (*Euphorbia heterophylla*) with pathogenic fungi. In: "Proceedings of the VI International Symposium on Biological Control of Weeds", (Delfosse, E.S. Ed.). pp. 677-681, 1985, Vancouver Agriculture Canada, Vancouver, Canada.
- Walker, L. 1980. Production of spores for field studies. *Advances in Agricultural Technology*, v. 12, p.1-5.
- Walker, H.L. 1982. Seedling blight of sicklepod caused by *Alternaria cassiae*. *Plant Disease*, v. 66, n. 5, p. 426-428.
- Wapshere, A.J. 1974. A strategy for evaluating the safety of organisms for biological weed control. *Annals of Applied Biology*, v. 77 , p. 201-211.
- Weidemann, G. J. 1991. Host range testing: safety and science. In: "Microbial Control of Weeds", (Te Beest, D.O. Ed.), pp.83-96. Chapman and Hall, New York.

***Alternaria euphorbiicola* COMO MICOHERBICIDA PARA O CONTROLE DE
Euphorbia heterophylla: EFEITO DE APLICAÇÕES ISOLADAS OU EM
MISTURA COM HERBICIDAS**

RESUMO

Comparou-se a eficiência do fungo *Alternaria euphorbiicola*, dos herbicidas atrazine, carfentrazone, fomesafen, glyphosate e imazethaphyr e das misturas de *A. euphorbiicola* com cada herbicida em controlar populações de *Euphorbia heterophylla* sensíveis e resistentes aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) em dois estádios fenológicos da planta. Os herbicidas testados não inibiram a germinação *in vitro* dos conídios de *A. euphorbiicola*. O fungo controlou eficientemente todas as populações de *E. heterophylla* testadas, sem restrições ao estágio fenológico da planta. O controle obtido com a aplicação de *A. euphorbiicola* foi equivalente aos dos herbicidas fomesafen, carfentrazone e atrazine em plantas com até cinco folhas e equivalente ao do herbicida glyphosate em plantas com cinco a 10 folhas. Nesse estágio, o fungo apresentou nível de controle superior aos dos herbicidas imazethaphyr e fomesafen. O efeito do herbicida fomesafen foi melhorado pela mistura com o fungo e a mistura controlou as plantas em estágio de cinco a 10 folhas, quando isoladamente, o herbicida não o faria. O controle das populações foi mais rápido e eficiente quando se utilizou *A. euphorbiicola* isolado do que em mistura com o herbicida imazethaphyr. Esse herbicida interferiu negativamente no desenvolvimento da doença nas plantas nos dois estádios fenológicos testados e reduziu a eficiência do fungo em controlar as plantas com até cinco folhas da população resistente à ALS. A mistura *A. euphorbiicola* + imazethaphyr causou a morte das plantas de soja. A mistura do fungo com fomesafen foi seletivo para a soja e as misturas do fungo com carfentrazone e atrazine foram seletivas para as plantas de milho.

ABSTRACT

Efficacy of the fungus *Alternaria euphorbiicola*, and of the herbicides atrazine, carfentrazone, fomesafen, glyphosate and imazethaphyr and two mixtures of *A. euphorbiicola* with each herbicide were evaluated to control acetolactate synthases (ALS) inhibitor herbicides sensitive or resistant *Euphorbia heterophylla* populations at different plant phenological stages. The herbicides did not inhibit *in vitro* conidia germination. The fungus efficiently controlled the populations of *E. heterophylla*, independent of their phenological stage. The control obtained by *A. euphorbiicola* application was similar to that with herbicides fomesafen, carfentrazone and atrazine in plants up to five leaves and similar to glyphosate in plants with 5 to 10 leaves. At these stages, the fungus showed higher level of control than the herbicides imazethaphyr and fomesafen. The effect of fomesafen was improved by mixing with the fungus and the mixture controlled the plants at 5 to 10-leaf stage, which did not happen with herbicide alone. The control of the populations was more rapid and efficient when *A. euphorbiicola* was used alone, compared to mixture with imazethaphyr. This herbicide interfered negatively in the disease development at both the phenological stages, and reduced the efficiency of the fungus in controlling the ALS resistant plants at 5-leaf stage. The mixture also caused soybean plant mortality. The mixture of the fungus with fomesafen was selective for soybean and the mixture with carfentrazone and atrazine were selective for maize plants.

INTRODUÇÃO

Euphorbia heterophylla L., popularmente conhecida como amendoim-bravo ou leiteiro, é uma invasora freqüente em culturas economicamente importantes como milho, cana-de-açúcar, feijão e soja, no Brasil. A cultura da soja ocupa 17,4 milhões de hectares, o que resultará em uma produção de até 48,5 milhões de toneladas de grãos na safra 2002/03, gerando recursos de bilhões de dólares, resultantes da exportação de grãos, farelo e óleo (Timossi, 2002). *E. heterophylla* é uma das principais invasoras da cultura da soja (Kissmann e Groth, 1993) podendo ser responsável por estimativas de redução de 35 % (Voll *et al.*, 2002) a 62 % na produção dessa cultura (Constantin *et al.*,

1997). A utilização de herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) é fundamental para o controle de *E. heterophylla* na cultura da soja. Produtos com este mecanismo de ação vêm sendo usados em larga escala, pois são eficientes em baixas doses, apresentam baixa toxicidade para mamíferos e seletividade para várias culturas (Saari *et al.*, 1994). No entanto, já foram identificados biótipos de *E. heterophylla* resistentes a estes produtos, em função do uso contínuo desses herbicidas (Gazziero *et al.*, 1997; Melhorança e Pereira, 1999).

A emergência de problemas de resistência a herbicidas oferece oportunidades para o uso de micoherbicidas, tanto isoladamente como em mistura com os herbicidas químicos, permitindo o aumento da eficiência de controle nessas populações (Charudattan, 2001). A estratégia de micoherbicida é baseada na multiplicação massal e aplicações periódicas de um patógeno, à semelhança dos herbicidas químicos (TeBeest *et al.*, 1992). Um isolado de *Alternaria euphorbiicola*, Simmons & Enghel foi selecionado como potencial micoherbicida, sendo capaz de produzir elevada mortalidade em doze populações de *E. heterophylla*, incluindo uma que apresenta comprovada resistência aos herbicidas inibidores da ALS. Aplicações de *A. euphorbiicola* em plantas no estágio de seis a oito folhas, em que aplicações dos produtos químicos já não resultam em controle, foram igualmente eficazes. Demonstrou-se, também, que o fungo é específico para os gêneros *Euphorbia* e *Chamaesyce*, da família Euphorbiaceae e que oito cultivares de soja testadas foram imunes ao patógeno.

Dentro do aspecto de manejo integrado de invasoras, a combinação do herbicida químico com o agente de controle biológico visa reduzir a dose do herbicida necessária para o controle da planta-alvo ou aumentar o espectro e a eficiência de controle de um herbicida químico, ineficaz para o controle de uma determinada espécie, pela combinação com um micoherbicida (Hoagland, 1996). No caso do leiteiro, a seleção de biótipos resistentes aos inibidores de ALS restringe o uso desses herbicidas químicos e a associação com o fungo poderia ter efeito sinérgico no controle dessas populações.

O objetivo desse trabalho foi comparar o efeito de *A. euphorbiicola*, dos herbicidas atrazine, carfentrazone, fomesafen, glyphosate e imazethapyr, isoladamente e em mistura com o patógeno, no controle de populações de *E. heterophylla* sensíveis e resistentes aos herbicidas inibidores de ALS, em dois estádios fenológicos da planta e avaliar a seletividade dessas misturas para as culturas da soja e do milho.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Isolado de *Alternaria euphorbiicola* e populações de *E. heterophylla*

O isolado KLN06 de *A. euphorbiicola* foi selecionado em etapa anterior (Nechet *et al.*, 2002) dentre seis isolados, em função da intensidade da doença provocada em nove populações de *E. heterophylla*. Esse isolado vinha sendo conservado *in vitro* pelo método de preservação em sílica-gel (Dhingra e Sinclair, 1995).

Três populações distintas dentre as 26 disponíveis de *E. heterophylla* foram selecionadas para utilização nesse estudo: EKLN19, selecionada em trabalhos anteriores como suscetível à *A. euphorbiicola*, *Bipolaris euphorbiae* (Hansford) Muchovej e *Sphaceloma poinsettiae* Jenkins & Ruehle; ETRB, população caracterizada como resistente à *B. euphorbiae* e *S. poinsettiae* coletada em campos experimentais do Paraná (doação de J. T. Yorinori, Embrapa Soja) e população ERH, resistente ao herbicida imazetaphyr, inibidor da enzima ALS, obtido no Laboratório de Herbicida na Planta da Universidade Federal de Viçosa. As sementes coletadas foram armazenadas a 5°C e transferidas pré-germinadas para copos plásticos de 500 mL em condições controladas (26±2°C).

2. Produção de inóculo de *A. euphorbiicola*

A produção de conídios de *A. euphorbiicola* para uso nos testes foi feita segundo metodologia de Walker (1980) com modificações. O fungo foi semeado em placas de Petri contendo meio CVA (caldo de vegetais agar, Pereira *et al.*, 2003) e as placas foram mantidas a 26°C em fotoperíodo de 12 horas sob um conjunto de duas lâmpadas fluorescentes (40W) e duas lâmpadas negras (40W). Após sete dias, cinco discos de micélio do fungo foram transferidas assepticamente em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio CV (meio CVA sem adição de agar) e colocados em agitador orbital a 30 rpm por sete dias a temperatura ambiente. Após esse período, o micélio foi triturado dentro do erlenmeyer, utilizando um microtriturador/homogeneizador, e vertido em bandejas de alumínio de 20x28 cm contendo 100 mL de CVA. Em seguida as bandejas foram colocados em incubadora a 26°C sob fotoperíodo de 12 horas, como mencionado anteriormente. Após dois dias, foi feita a coleta de esporos adicionando-se água esterilizada e raspando a superfície da bandeja com espátula de borracha para

obtenção da suspensão de esporos. A suspensão foi filtrada, utilizando gaze, e ajustada para a concentração de 2×10^5 conídios/mL.

3. Herbicidas utilizados

Formulações comerciais de herbicidas químicos de diferentes mecanismos de ação e a mistura glyphosate + carfentrazone, todos comumente indicados para o controle do leiteiro foram usadas nos experimentos (Tabela 1).

Tabela 1: Herbicidas químicos utilizados nos experimentos.

Nome Técnico	Mecanismo de ação	Nome Comercial	Dosagem
Imazethaphyr	inibidor da enzima ALS	Pivot	106 g i.a/L
Glyphosate	inibidor da enzima EPSPs	Round up WG	720 g i.a/L
Fomesafen	inibidor de Protox	Flex	250 g i.a/L
Carfentrazone	inibidor de Protox	Aurora 400CE	400 g i.a/L
Atrazine	inibidor do fotossistema II (FSII)	Gesaprim 500	500 g i.a/L

4. Efeito *in vitro* dos herbicidas químicos na germinação de conídios de *A. euphorbiicola*

Soluções dos herbicidas foram preparadas na dose recomendada pelo fabricante e diluídas em água destilada para obtenção de um equivalente a metade da dose recomendada. A suspensão de conídios foi obtida pela adição da solução do herbicida a placas de Petri com meio CVA semeado com *A. euphorbiicola* por 10 dias sob fotoperíodo de 12 horas a 25°C. Após ser filtrada em gaze, uma alíquota dessa suspensão foi depositada em placas contendo agar-água, espalhadas com alça de Drigalski e mantidas a 25°C sob fotoperíodo de 12 horas. A avaliação foi feita após seis horas, examinando-se 200 esporos/placa. Os esporos foram considerados germinados quando o tubo germinativo era igual ou maior que o comprimento do conídio. Uma suspensão de conídios de *A. euphorbiicola* em água constou como controle. O

delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 13 tratamentos e cinco repetições, cada repetição correspondendo a uma placa de Petri.

5. Eficiência de *A. euphorbiicola*, dos herbicidas químicos e das misturas fungo/herbicidas no controle do leiteiro (três a quatro pares de folhas) em condições controladas

Para esse experimento foram utilizados apenas os herbicidas que no ensaio anterior não inibiram a germinação de conídios do fungo na dosagem recomendada. Plantas das três populações foram pulverizadas no estágio de três a quatro pares de folhas (30 dias após o transplântio) com os herbicidas, o isolado de *A. euphorbiicola* na concentração de 2×10^5 conídios/mL + óleo mineral (3%) + Break thru® 0,05% (copolímero poliéter-polimetil siloxano + poliéter), com as misturas do fungo com cada herbicida e com água + óleo mineral (3%) + Break thru® (0,05%). As pulverizações foram feitas ao final da tarde. As plantas permaneceram uma noite ao relento e depois foram transferidas para casa de vegetação ($26 \pm 2^\circ\text{C}$). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial de 12 tratamentos, três populações e cinco repetições, sendo cada repetição representada por um vaso com uma planta.

As avaliações foram feitas aos cinco, 10, 15 e 20 dias após a aplicação dos tratamentos utilizando uma escala de notas de 0 a 10 (Tabela 2). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância usando o proc GLM do programa SAS versão 6.12. A descrição dos conceitos de controle (Tabela 3) seguiu os critérios da Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas (SBCPD, 1995).

6. Eficiência de *A. euphorbiicola*, dos herbicidas químicos e misturas fungo/herbicidas no controle do leiteiro (um a dois pares de folhas) em condições controladas e seletividade para as culturas do milho e da soja

Esse experimento seguiu a mesma metodologia descrita no item 5, mas as plantas foram inoculadas no estágio de um a dois pares de folhas (aproximadamente 20 dias após o transplântio). Em cada vaso foram colocadas uma semente de leiteiro e uma de soja ou uma de leiteiro e uma de milho. Os vasos com soja e leiteiro foram pulverizados com água, *A. euphorbiicola*, herbicidas fomesafen e imazethapyr, e as misturas *A. euphorbiicola* com fomesafen e *A. euphorbiicola* com imazethapyr.

Tabela 2: Escala de notas utilizadas para avaliação do controle das populações de *E. heterophylla*.

Nota	Descrição da nota	Porcentagem de Controle
0	Planta sem sintoma	0
1	Planta com amarelecimento	10
2	Planta sem morte de ponteira com menos de 20% das folhas com injúria	20
3	Planta sem morte de ponteira com 20-50% das folhas com injúria	30
4	Planta sem morte de ponteira com mais de 50% das folhas com injúria	40
5	Planta sem morte de ponteira com todas as folhas com injúria	50
6	Planta com morte de ponteira com folhas saudáveis	60
7	Planta com morte de ponteira com mais de 2 folhas injuriadas*	70
8	Planta com morte de ponteira com até 2 folhas injuriadas*	80
9	Planta com haste ainda verde sem folhas com morte de ponteira	90
10	Planta Morta	100

* total de folhas das plantas= 10 folhas (1º experimento), 5 folhas (2º experimento).

Tabela 3: Descrição de conceitos aplicados na avaliação de controle*

Conceitos	Descrição
A	Controle excelente ou total da espécie em estudo.
B	Controle bom, aceitável para a infestação da área.
C	Controle moderado, insuficiente para a infestação da área.
D	Controle deficiente ou inexpressivo.
E	Ausência de controle.

*SBCPD (1995).

Os vasos com milho e leiteiro foram pulverizados com água, *A. euphorbiicola*, herbicidas atrazine e carfentrazone, e as misturas *A. euphorbiicola* com atrazine e *A. euphorbiicola* com carfentrazone. O herbicida glyphosate não foi utilizado por não apresentar seletividade para essas culturas. A avaliação foi feita como descrito no item 5 e, adicionalmente, verificou-se a presença ou não de injúria nas culturas.

RESULTADOS

Efeito *in vitro* dos herbicidas químicos na germinação de conídios de *A. euphorbiicola*

A maioria dos herbicidas, na dose recomendada, não inibiu a germinação dos conídios de *A. euphorbiicola*. A porcentagem de conídios germinados foi acima de 90% nas misturas do fungo com os herbicidas atrazine, carfentrazone, fomesafen, glyphosate e imazethaphyr nessa dosagem. Apenas 67% de conídios germinaram no tratamento glyphosate+carfentrazone, entretanto essa redução não foi observada quando os conídios foram misturados com os herbicidas em ½ dose. Todos os tratamentos apresentaram porcentual de germinação acima de 98% quando se utilizou a ½ dose (Figura 1). Para estudos em casa de vegetação, optou-se por usar a dose recomendada dos herbicidas e, tendo em vista a redução de germinação observada para a mistura de conídios com glyphosate+carfentrazone, esta não foi então utilizada nos demais experimentos.

Eficiência de *A. euphorbiicola*, dos herbicidas e das misturas fungo/herbicidas no controle do leiteiro (três a quatro pares de folhas) em condições controladas

A parte aérea de todas as plantas da população EKLN19 morreu cinco dias após a pulverização com *A. euphorbiicola*, com os herbicidas atrazine, carfentrazone e com as misturas destes herbicidas com o fungo. Níveis de controle equivalentes foram observados para as populações ERH e ETRB submetidas aos mesmos herbicidas e às misturas com o fungo (Tabela 4). O controle obtido com a aplicação de *A. euphorbiicola* nessas populações foi menor quando comparado com o verificado para EKLN19, mas em condições de infestações ainda seria um controle aceitável. As três populações não

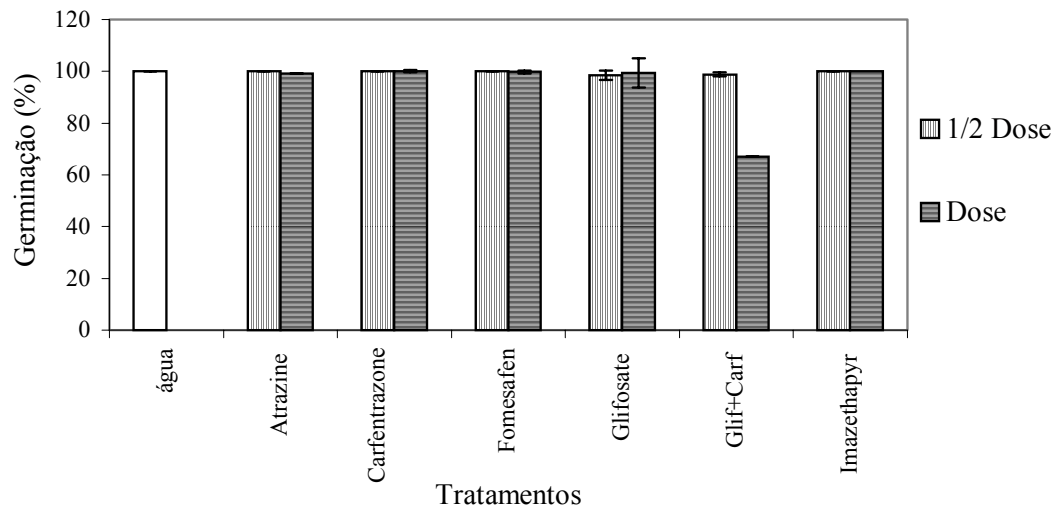


Figura 1: Efeito *in vitro* de herbicidas na dose recomendada e em meia dose na germinação de conídios de *Alternaria euphorbiicola*. Médias = cinco repetições; Barra = desvio padrão.

foram adequadamente controladas pela aplicação dos herbicidas fomesafen e imazethapyr, confirmando assim a ineficiência desses produtos para o controle de estádios mais avançados de *E. heterophylla*. No entanto, 100 % de controle foi obtido quando fomesafen foi misturado com *A. euphorbiicola*. O herbicida imazethapyr associado ao fungo apresentou porcentagem de controle das plantas maior do que quando aplicado isoladamente. Dez dias após a inoculação, o controle foi considerado aceitável para a população EKLN19 e para a população resistente aos inibidores da ALS (ERH), mas insuficiente em ETRB. Por outro lado, em mistura com imazethapyr, a eficiência de controle foi reduzida quando comparada à aplicação deste herbicida isoladamente. O herbicida glyphosate quando aplicado isoladamente proporcionou controle total das plantas somente após 10 dias. Todavia, quando misturado com o fungo, esse controle foi antecipado em cinco dias.

Tabela 4: Porcentagem de controle de populações de *E. heterophylla* no estágio de três a quatro pares de folhas, 5 e 10 dias após a aplicação de herbicidas em mistura ou não com *A. euphorbiicola*.

Tratamentos	Populações					
	5 DIAS			10 DIAS		
	EKLN19	ERH	ETRB	EKLN19	ERH	ETRB
<i>A. euphorbiicola</i>	100Aa	84Bb	78Bb	100Aa	80Bb	78Ba
Atrazine	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa
Atrazine + <i>A. euphorbiicola</i>	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa
Carfentrazone	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa
Carfentrazone + <i>A. euphorbiicola</i>	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa
Fomesafen	34Ec	42Dd	34Ed	34Ec	42Ec	34Ed
Fomesafen + <i>A. euphorbiicola</i>	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa
Glyphosate	10Ed	10Ed	10Ed	10Ed	10Ed	10Ed
Glyphosate + <i>A. euphorbiicola</i>	100Db	100Db	100Db	100Db	100Db	100Db
Imazethaphyr	10Ee	10Ee	10Ee	10Ee	10Ee	10Ee
Imazethaphyr + <i>A. euphorbiicola</i>	60Db	74Cc	62Dc	92Bb	83Bab	70Cc
Testemunha (Água)	0 Ee	0 Ee	0 Ee	0 Ee	0 Ee	0Ef
CV	2,3	6,4	5,1	4,5	6,7	4,7

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. A letra maiúscula refere-se à descrição do controle segundo SBCPD (1995) (ver Tabela 3 no texto). CV= coeficiente de variação.

Eficiência de *A. euphorbiicola*, dos herbicidas químicos e misturas fungo/herbicidas no controle do leiteiro (um a dois pares de folhas) em condições controladas e seletividade para as culturas do milho e da soja.

Controle total foi verificado nas plantas pulverizadas com *A. euphorbiicola*, atrazine, carfentrazone e fomesafen isolados e em combinação com o fungo em todas as três populações, cinco dias após a aplicação desses tratamentos. Estes não provocaram injúrias nas plantas de soja e milho. A população resistente aos inibidores da ALS (RH) não foi controlada pelo imazethaphyr isolado e em mistura com *A. euphorbiicola*, enquanto na população KLN19 o controle foi acima de 90 %, mas somente 15 dias após a sua aplicação. Nesse mesmo período, observou-se o controle total das plantas da população TRB pulverizadas apenas com imazethaphyr + *A. euphorbiicola* (Tabela 5). Como observado anteriormente, a mistura com o imazethaphyr retardou o processo de infecção do fungo e, conseqüentemente, sua eficiência de controle. Além disso, imazethaphyr e a mistura imazethaphyr + *A. euphorbiicola* foram as únicas que resultaram em danos que levaram à morte das plantas de soja.

Tabela 5: Porcentagem do controle de populações de *E. heterophylla* no estágio de um a dois pares de folhas, 5, 10 e 15 dias após a aplicação dos herbicidas em mistura ou não com *Alternaria euphorbiicola*.

Tratamentos	Populações								
	5 DIAS			10 DIAS			15 DIAS		
	EKLN19	ERH	ETRB	EKLN19	ERH	ETRB	EKLN19	ERH	ETRB
<i>A. euphorbiicola</i>	98Aa	100Aa	96Aa	100Aa	100Aa	96Aa	100Aa	100Aa	100Aa
Atrazine	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa
Atrazine+ <i>A. euphorbiicola</i>	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa
Carfentrazone	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa
Carfentrazone+ <i>A. euphorbiicola</i>	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa
Fomesafen	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa
Fomesafen+ <i>A. euphorbiicola</i>	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa
Imazethaphyr	10Ec	10Ec	10Ec	46Ec	26Ec	34Ec	92Ab	32Ec	34Eb
Imazethaphyr+ <i>A. euphorbiicola</i>	74Cb	50Eb	72Cb	74Cb	60Eb	78Bb	100Aa	60Eb	98Aa
Testemunha (Água)	0Ed	0Ed	0Ed	0Ed	0Ed	0Ed	0Ec	0Ed	0Ec
CV	2,8	0	2,8	2,9	2,2	4,4	3,8	1,7	2,6

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. A letra maiúscula refere-se à descrição do controle segundo SBCPD (1995) (ver Tabela 3 no texto). CV= coeficiente de variação.

DISCUSSÃO

Alternaria euphorbiicola controlou eficientemente as populações de *E. heterophylla* sensíveis e resistentes aos inibidores da ALS, sem restrições ao estágio fenológico da planta, quando submetidas a uma noite de orvalho após a aplicação dos tratamentos. A porcentagem de controle obtida com sua aplicação variou de acordo com a população da planta, mas quando em combinação com vários dos herbicidas testados, o controle foi maior. Entretanto, os efeitos da mistura foram verificados apenas em aplicações feitas em plantas de estágio mais avançado de desenvolvimento (três a quatro pares de folhas). Para plantas com um a dois pares de folhas, independente da população, obteve-se acima de 90% de controle com a aplicação de *A. euphorbiicola*. Níveis menores de controle das populações pelo fungo foi observada nestes experimentos quando comparado com os resultados obtidos em condições controladas. Quando as plantas eram submetidas a seis horas de molhamento contínuo verificava-se 100 % de controle, cinco dias após a inoculação. No entanto, os resultados foram ainda muito favoráveis, indicando a possibilidade de controle eficaz da invasora pelo fungo no campo, uma vez que o período de molhamento a que as plantas foram submetidas (água da pulverização + orvalho de uma noite) foi o mais próximo das encontradas em condições de campo.

Outro aspecto interessante verificado foi o aumento da eficiência de herbicidas químicos quando em mistura com o fungo e, em particular, a ampliação da capacidade destes produtos em controlarem as plantas em estágio mais avançado, quando isoladamente não o fariam. A eficiência de controle do herbicida fomesafen, único produto registrado para o controle de *E. heterophylla* na cultura do feijão, está restrita à aplicação nos estádios mais jovens da planta, mas o controle total nos estádios mais avançados da planta ocorreu quando o produto foi misturado com *A. euphorbiicola* (Figura 2). O fungo em mistura com glyphosate também permitiu a antecipação do controle do leiteiro efetuado por este produto. Essa característica do fungo contribui para melhor desempenho do herbicida químico e, é um enfoque novo, no manejo de invasoras e que pode atrair investimentos pelas empresas de agroquímicos em pesquisas com micoherbicidas. Esse trabalho aparentemente é o primeiro a enfatizar esse aspecto no desenvolvimento de um micoherbicida.

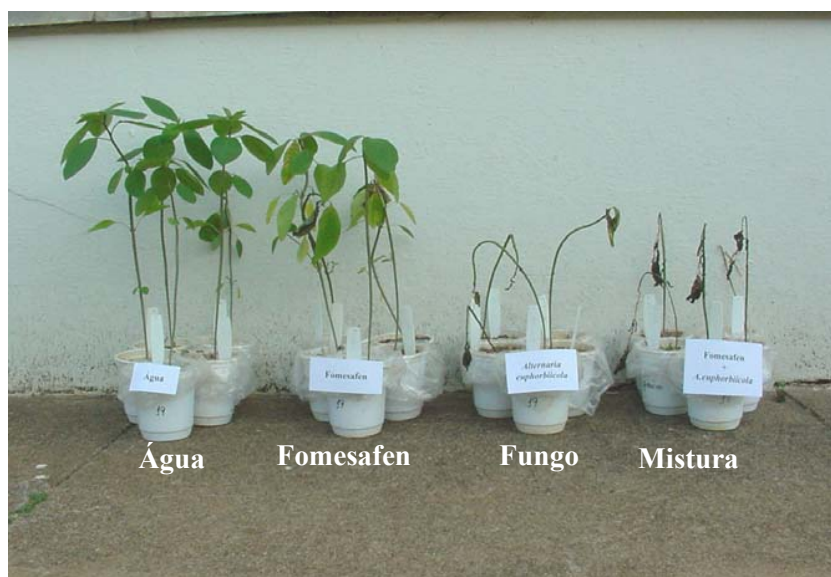


Figura 2: Controle da população EKLN19 de *E. heterophylla*, cinco dias após a pulverização com água, fomesafen, *Alternaria euphorbiicola* e da mistura fomesafen + *A. euphorbiicola*.

O herbicida imazethaphyr não controlou a população RH (sabidamente resistente à esse produto) e a população TRB em ambos estádios. A população TRB foi incluída neste trabalho por apresentar resistência ao fungo *B. euphorbiae* e pelos resultados obtidos aqui, aparentemente, também é resistente ao imazethaphyr. Esse fato ainda precisa ser confirmado. O controle das populações foi mais rápido e eficiente quando se utilizou *A. euphorbiicola* isolado do que em mistura com imazethaphyr. O herbicida interferiu negativamente no desenvolvimento da doença nos dois experimentos, reduzindo a eficiência de controle do fungo na população RH no estágio de um a dois pares de folhas (Figura 3). Interações desfavoráveis de produtos em mistura são conhecidas para herbicidas químicos inibidores da ALS em pulverizações de glyphosate (Hydrick e Scaw, 1994). Por exemplo, o glyphosate é mais eficiente quando aplicado isoladamente do que em mistura com imazethaphyr no controle de *Setaria faberi* Herrm. (Li *et al.*, 2002).

A incompatibilidade em mistura de micoherbicida e herbicidas químicos é um aspecto ainda pouco estudado, mas sabe-se que pode haver interferência de herbicidas no desenvolvimento de doenças, seja em função do efeito direto da interação sobre o



Figura 3: Plantas de *E. heterophylla* resistente aos herbicidas inibidores da ALS e de soja, 15 dias após a pulverização com *A. euphorbiicola* (1), imazethapyr (2) e com a mistura *A. euphorbiicola* + imazethapyr (3).

patógeno, seja pelo efeito indireto via respostas de defesa da planta ativadas pelo herbicida (Sanogo *et al.*, 2000). O efeito do imazethapyr sobre *A. euphorbiicola* foi indireto, uma vez que a germinação de conídios não foi inibida pela mistura com o produto na dose recomendada. Possivelmente, algum mecanismo de defesa da planta é ativado após a aplicação do imazethapyr e isto tornou mais lento o processo inicial de infecção do fungo, retardando o desenvolvimento da doença. Outra evidência pode ser o fato de que no estágio mais avançado da planta, em que a aplicação do imazethapyr não é eficiente, sua interferência na eficiência do fungo foi menor (Tabelas 4 e 5). Herbicidas de outros mecanismos de ação, como o acifluorfen estimula o aumento da produção de metabólitos secundários, principalmente compostos fenólicos e fitoalexinas de algumas plantas. Estudos preliminares com espinafre indicaram que os níveis de etileno e etano e da enzima PAL (fenilalanina amonialiase) aumentaram 10 e quatro vezes, respectivamente após a aplicação do produto (Komives e Casida, 1983). Altos níveis de gliceolina são acumulados em folhas de soja que sofreram injúrias devido a aplicação do herbicida lactofen, e isto está envolvido com a supressão do mofo branco da haste, incitada por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, na cultura (Dann *et al.*, 1999).

Poucas publicações relatam interações adversas entre agente de controle biológico e produtos químicos. Wyss e Scharer (2001) verificaram que os herbicidas 2,4-D, glyphosate, linuron e MCPP nas doses recomendadas apresentam efeito tóxico aos eciosporos de *Puccinia lagenophorae* Cooke e a mistura com doses menores não é recomendada, pois não houve aumento de controle de *Senecio vulgaris* L. O herbicida bentazon em mistura com uredíniosporos de *Puccinia canaliculata* (Schw.) Lagerh afeta o desenvolvimento da doença (Phatak *et al.*, 1982) e reduz em 50% a eficiência desse agente de controle biológico de *Cyperus esculentus* L. em condições de campo (Bruckart *et al.*, 1988). Alguns herbicidas aplicados em mistura inibem a germinação do patógeno, mas se a aplicação for em seqüência, o produto não interfere na atividade do agente de biocontrole (Smith Jr., 1991). O primeiro micoherbicida registrado, DeVine®, produzido com clamidósporos de *Phytophthora palmivora* Butler não pode ser misturado com agentes espalhantes, fertilizantes ou outros pesticidas, pois perde a eficácia de controle de *Morrenia odorata* Hort.ex Kunze. Para assegurar o controle, o patógeno deve ser aplicado seqüencialmente ao herbicida (Charudattan, 1993).

A mistura de *A. euphorbiicola* com imazethaphyr, além de interferir na eficiência de controle das populações de *E. heterophylla* pelo patógeno, causou interação antagônica nas plantas de soja, tornando-as suscetíveis à *A. euphorbiicola* (Figura 3). Para as plantas de soja com sintomas foi feito o isolamento do fungo a partir de folhas e confirmada a presença de *A. euphorbiicola*. As plantas podem ficar predispostas à rápida colonização fúngica em função do stress imposto pela aplicação de herbicidas (Altman e Campbell, 1977; Altman e Rovira, 1989). Canaday *et al.* (1986) relatam que o stress induzido pelos herbicidas chloramben e 2,4-DB aumentou a severidade da podridão negra da raiz na cultura da soja, por torná-la predisposta à colonização rápida por *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Em condições controladas, Sanogo *et al.* (2000) verificaram que a severidade da síndrome da morte súbita e a frequência de isolamento de seu agente causal, *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f.sp. *glycines* das raízes de cultivares de soja tolerante e não tolerantes ao glyphosate, aumentou após a aplicação de imazethaphyr ou glyphosate quando comparado com o controle, onde esses produtos não foram utilizados. Esses mesmos resultados foram confirmados em experimentos de campo (Sanogo *et al.*, 2001). Recentemente, foi confirmado que a aplicação do imazethaphyr também aumentou a severidade de *Rhizoctonia solani* Khun tanto em cultivares de soja resistente como suscetível ao patógeno (Bradley *et al.*, 2002).

Alternaria euphorbiicola pode se tornar uma ferramenta importante no manejo de populações de *E. heterophylla* resistentes aos inibidores da ALS, mas sua interação com imazethaphyr ainda precisa ser esclarecida. Outras opções podem ser exploradas visando o controle sinérgico de *E. heterophylla* e a seletividade para a cultura da soja, como a mistura do fungo com doses mais baixas do herbicida, a aplicação sequencial desses produtos ou a interação com outros herbicidas inibidores da ALS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altman, J.; Campbell, C.L. 1977. Effect of herbicides on plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*, v.15, p.361-385.
- Altman, J.; Rovira, A.D. 1989. Herbicide-pathogen interactions in soil-borne diseases. *Canadian Journal of Plant Pathology*, v.11, p.166-172.
- Bradley, C.A.; Hartman, G.L.; Wax, L.M.; Pedersen, W.L. 2002. Influence of herbicides on *Rhizoctonia* root and hypocotyl rot of soybean. *Crop Protection*, v.21, p. 679-687.
- Bruckart, W.L.; Johnson, D.R.; Frank, J.R. 1988. Bentazon reduces rust-induced disease in yellow nutsedge, *Cyperus esculentus*. *Weed Technology*, v.2, p. 299-303.
- Canaday, C.H; Helsel, D.G.; Wyllie, T.D. 1986. Effects of herbicide-induced stress on root colonization of soybeans by *Macrophomina phaseolina*. *Plant Disease*, v.70, n.9, p. 863-865.
- Charudattan, R. 1993. The role of pesticides in altering biocontrol efficacy. In: "Pesticides Interactions in Crop Production. Beneficial and deleterian effects", (Praman, F.), pp. 421-432. CRC Press, Boca Raton.
- Charudattan, R. 2001. Biological control of weeds by means of plant pathogens: Significance for integrated weed management in modern agro-ecology. *BioControl*, v.46, p. 229-260.
- Constantin, J.; Contiero, R.L.; Demeis, M.; Ita, A.G.; Maciel, C.D. de G. 1997. Controle de *Euphorbia heterophylla* e fitotoxicidade dos herbicidas imazamox e imazethaphyr na cultura da soja (*Glycine max* L. Merrill). In: "Resumos do XXI Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas", pp. 451, Caxambu, Minas Gerais.
- Dann, E.K.; Diers, B.W.; Hammerschmidt. 1999. Supression of *Sclerotinia* stem rot of soybean by lactofen herbicide treatment. *Phytopathology*, v.89, n.7, p.589-602.
- Dhingra, O.D.; Sinclair, J.B. 1995. "Basic Plant Pathology Methods". CRC Press, Inc., New York, 434p.

- Gazziero, D.L.P.; Brighenti, A.M.; Maciel, C.D.G.; Christofolleti, P.J.; Adegas, F.S.; Voll, E. 1997. Resistência de amendoim-bravo aos herbicidas inibidores da enzima ALS. *Planta Daninha*, v.16, n.2, p.117-125.
- Hoagland, M R.E. 1996. Chemical interactions with bioherbicides to improve efficacy. *Weed Technology*, v.10, p. 651-674.
- Hydrick, D.E.; Schaw, D.R. 1994. Effects of tank-mix combinations of non-selective foliar and selective soil applied herbicides on three weed species. *Weed Technology*, v.8, p. 129-133.
- Kissmann, K.G.; Groth, D. "Plantas infestantes e nocivas". Tomo II. São Paulo: Basf Brasileira, 1993. 798p.
- Komives, T.; Casida, J.E. 1983. Acifluorfen increases the leaf content of phytoalexins and stress metabolites in several crops. *Journal of Agriculture Food Chemical*, v.31, p.751-755.
- Li, J.; Johnson, W.G.; Smeda, R.J. 2002. Interactions between glyphosate and imazethphyr on four annual weeds. *Crop Protection*, v. 21, p.1087-1092.
- Melhorança, A.L.; Pereira, F.A.R. 1999. Eficiência do herbicida lactofen no controle de *Euphorbia heterophylla*, resistente aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS). *Documentos-Embrapa Agropecuária Oeste*, v.3, 11-14.
- Pereira, J.M.; Barreto, R.W.; Ellison, C.A.; Maffia, L.A. 2003. *Corynespora cassiicola* f.sp. *lantanae*: a potential biocontrol agent for *Lantana camara* from Brazil. *Biological Control*, v.26, n.1, p.21-31.
- Phatak, S.C.; Sumner, D.R.; Wells, H.D.; Bell, D.K.; Glaze, N.C.1982. Biological control of yellow nutsedge with the indigenous rust fungus *Puccinia canaliculata*. *Science*, v.219, p.1446-1447.
- Saari, L.L.; Cotterman, J.C.; Thill, D.C. 1994. Resistance to acetolactate syntase inhibiting herbicides. In: "Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry", (Powles, S.B. e Holtum, J.A.M., Eds), pp.83-142. CRC Press, Boca Raton.
- Sanogo, S.; Yang, X.B.; Scherm, H. 2000. Effects of herbicides on *Fusarium solani* f.sp. *glycines* and development of sudden death syndrome in glyphosate-tolerant soybean. *Phytopathology*, v.90, n.1, p.57-65.
- Sanogo, S.; Yang, X.B.; Lundeen, P. 2001. Field response of glyphosate-tolerant soybean to herbicides and sudden death syndrome. *Plant Disease*, v.85, n.7, p.773-779.
- Smith Jr., R.J. 1991. Integration of Biological control agents with chemical pesticides. In: "Microbial control of weeds", (TeBeest, D.O. ed), pp.189-208. Chapman and Hall, New York.

- Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas. 1995. Procedimentos para instalação, avaliação e análise de experimentos com herbicidas. Londrina: SBCPD, 42p.
- TeBeest, D.O.; Yang, X.B.; Cisar, C.R.; 1992. The status of biological control of weeds with fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, v. 30, p. 637-657.
- Timossi, A.J. 2002. “I Levantamento de safra 2002/2003 FNP Consultoria & Comércio: Grãos (milho e soja)”. FNP Agroinformativos, Brasil.
- Voll, E.; Gazziero, D.L.P.; Brighenti, A.A.M.; Adegas, F.S. 2002. Competição relativa de espécies de plantas daninhas com dois cultivares de soja. *Planta Daninha*, v.20, n.1, p.17-24.
- Walker, L. 1980. Production of spores for field studies. *Adv. Agric. Technol.* v.12, p.1-5.
- Wyss, G.S.; Muller-Scharer, H. 2001. Effects of selected herbicides on the germination and infection process of *Puccinia lagenophora*, a biocontrol pathogen of *Senecio vulgaris*. *Biological Control*, v.20, p.160-166.

***Alternaria euphorbiicola* UM POTENCIAL MICOHERBICIDA PARA
Euphorbia heterophylla: TEMPERATURA PARA CRESCIMENTO, PRODUÇÃO
MASSAL E SOBREVIVÊNCIA DURANTE O ARMAZENAMENTO**

RESUMO

A produção de conídios do fungo *Alternaria euphorbiicola*, estudado como micoherbicida para o controle de *Euphorbia heterophylla*, foi avaliada nos métodos de fermentação líquida, difásica, utilizando cinco meios de cultura e na fermentação sólida. Avaliou-se também a viabilidade do fungo durante três meses de armazenamento a temperatura ambiente e a 4°C. O crescimento radial micelial de *A. euphorbiicola* ocorreu na faixa de 5 a 40°C, sendo máximo a 25°C. A porcentagem de conídios germinados foi acima de 97% na faixa de temperatura de 15 a 30°C. Não houve esporulação de *A. euphorbiicola* na técnica de fermentação líquida. A técnica difásica foi apropriada para a produção de inóculo do fungo. A adição de extrato de folha de *E. heterophylla* estimulou a esporulação de *A. euphorbiicola* em meio agarizado e o aumento da massa micelial fresca em meio líquido. A maior produção de conídios/g de substrato foi observada nos substratos resíduo de café (8×10^4 /g) e folha de mamona triturada ($6,9 \times 10^4$ /g). A obtenção da suspensão de esporos do fungo utilizando-se solução de sacarose 35 % esterilizada, seguida de secagem a 26°C, por 24 horas foi capaz de manter a viabilidade dos conídios acima de 90% após três meses de armazenamento em temperatura ambiente.

ABSTRACT

The production of conidia of the fungus *Alternaria euphorbiicola*, studied as mycoherbicides for controlling *Euphorbia heterophylla*, was evaluated in liquid diphasic fermentation, using five culture media, and solid fermentation. Viability of the fungus during three-month storage at room temperature and 4°C was also studied. The radial mycelial growth occurred in the range of 5 to 40°C, being maximum at 25°C. The conidia germination above 97% occurred in the temperature range of 15 to 30°C.

Alternaria euphorbiicola did not sporulate in liquid fermentation. Use of diphase technique was most appropriate for production of the inoculum of this fungus. Addition of *E. heterophylla* leaf extract stimulated sporulation of *A. euphorbiicola* in agar medium and the mycelial mass increase in the liquid medium. The maximum production of conidia/g substrate was occurred on coffee residue (8×10^4 /g) and sliced castor leaves. Collecting the conidia with sterile 35% sucrose solution followed by 24 h drying at 26°C, maintained conidial viability over 90% after three-month storage at room temperature.

INTRODUÇÃO

O fungo *Alternaria euphorbiicola* Simmons & Engelhard está sendo investigado como possível micoherbicida para o controle do leiteiro (*Euphorbia heterophylla* L.), uma das principais invasoras da cultura da soja no Brasil (Lorenzi, 2000). A soja é o principal produto agrícola de exportação brasileiro gerando recursos de bilhões de dólares na exportação de grãos, farelo e óleo (Timossi, 2002). A interferência de invasoras é o principal fator que restringe a produção da cultura, o que faz com que mais da metade do volume total de herbicidas utilizados no país seja pulverizada em campos de soja (Foloni e Christoffoleti, 1999). Os principais herbicidas aplicados na cultura para o controle de leiteiro são os inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS). No entanto, o uso contínuo tem levado à seleção e dominância de populações de leiteiro resistentes a estes produtos em áreas cultivadas com soja (Gazziero *et al.*, 1997; Melhorança e Pereira, 1999).

Resultados prévios demonstraram que *A. euphorbiicola* é capaz de matar plantas de todas as populações de *E. heterophylla* no estágio de seis a oito folhas, inclusive a população resistente a ALS, em apenas cinco dias, sendo necessário um período de seis horas de molhamento foliar, iniciado até 48 horas após a aplicação do fungo. Estes e outros resultados obtidos indicam o potencial de *A. euphorbiicola* como micoherbicida tanto isoladamente como em mistura com herbicidas químicos, no controle do leiteiro.

Em um programa de pesquisa visando o desenvolvimento de um micoherbicida, a investigação das possibilidades de produção massal dos propágulos do fungo é uma etapa intermediária entre os experimentos de casa de vegetação e os testes preliminares

de campo (Auld, 1997). A existência de um método eficiente de produção massal de inóculo, tanto para experimentos de campo como para produção comercial do micoherbicida é uma pré-condição que nem sempre tem sido atendida, levando ao abandono de vários agentes que se apresentam inicialmente promissores (Charudattan e Dinooor, 2000). Um exemplo é *Alternaria cassiae* Jurair and Khan patenteado como CASST para o controle de *Senna obtusifolia* (L.) H.S. Irwin & Barneby, nos Estados Unidos e que ainda não se tornou disponível comercialmente, entre outras causas, devido a falta de um método eficiente e econômico de produção em larga escala de inóculo (Te Beest, 1996). Em geral, três métodos têm sido usados para a produção massal na fabricação de micoherbicidas: fermentação em substrato sólido, fermentação difásica e fermentação líquida. Este último é considerado o mais econômico, mas não é apropriado para a esporulação da maioria das espécies de *Alternaria* (Jackson *et al.*, 1996).

Um método eficiente para a produção de inóculo de *Alternaria macrospora* Zimm. é a combinação de substrato sólido e fermentação líquida, na chamada técnica difásica, adaptada por Walker (1980) e que tem como vantagens a redução do risco de contaminação e do tempo de incubação, por permitir a rápida colonização do substrato sólido e formação de conídios (Jenkins *et al.*, 1998). Na fase inicial do atual programa, esse método foi adotado para a obtenção de inóculo de *A. euphorbiicola* para uso nos experimentos conduzidos em casa de vegetação. A otimização dessa produção ainda não havia sido investigada em detalhe e nem a substituição do meio agarizado por um meio barato, de fácil obtenção e apropriado para a produção de conídios para uso em larga escala. Outra condição importante para viabilizar *A. euphorbiicola* como micoherbicida é o desenvolvimento de um método de preservação dos propágulos do fungo que garanta a viabilidade após o armazenamento. Alguns autores têm sugerido que o “tempo de prateleira” de um micoherbicida deve ser de no mínimo seis meses à temperatura ambiente para que o produto seja comercialmente viável (Green *et al.*, 1997).

Os objetivos desse trabalho foram o de testar a produção de conídios de *A. euphorbiicola* em fermentação líquida, difásica e sólida, selecionar um substrato para fermentação sólida e comparar alguns métodos de preservação da viabilidade de conídios durante o armazenamento.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Obtenção do isolado

O isolado de *A. euphorbiicola* KLN06 utilizado nos testes foi obtido de *E. heterophylla* naturalmente infectada coletada em Viçosa-MG, tendo sido anteriormente selecionado. KLN06 encontra-se incorporado à coleção micológica do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. O fungo foi semeado em placas de Petri contendo meio CVA (caldo de vegetais agar, Pereira *et al.*, 2003) e mantido por sete dias em incubadora a 26°C em fotoperíodo de 12 horas, sob um conjunto de duas lâmpadas fluorescentes (40W) e duas lâmpadas de luz negra (40W). Essas culturas serviram como fonte de micélio para a realização dos experimentos descritos a seguir.

2. Efeito da temperatura no crescimento micelial e germinação de *A. euphorbiicola*

Para avaliação do crescimento micelial, um disco de micélio de 5 mm foi semeado no centro de placas contendo meio CVA. As placas foram colocadas em incubadoras sob temperaturas constantes de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40°C. Após sete dias, fizeram-se medições ortogonais dos diâmetros das colônias. A germinação dos conídios foi avaliada, espalhando-se com auxílio da alça de Drigalski, 500µL de uma suspensão de 1×10^5 conídios/mL em placas de Petri contendo agar-água. A suspensão de conídios foi obtida de culturas em placas de Petri em meio CVA por sete dias. Adicionaram-se 10 mL de água destilada esterilizada em cada placa e com auxílio de um pincel os conídios foram raspados das colônias. A suspensão obtida foi filtrada, utilizando gaze e ajustada para 1×10^5 conídios/mL. Após 24 horas, foi verificada a germinação de 200 esporos/placa, sob microscópio óptico, considerando esporos germinados aqueles que apresentavam tubo germinativo igual ou maior que o comprimento do conídio. Os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri.

3. Esporulação de *A. euphorbiicola* em diferentes meios de cultura pela técnica difásica

Nesse experimento, foi testada a técnica de fermentação difásica (Walker, 1980) utilizando-se os seguintes meios de cultura: CV (meio CVA sem adição de agar); caldo de abóbora (decoção de 200 g de abóbora, 20 g de sacarose, 1 L de água); abóbora triturada (200 g de abóbora cozida e triturada, 1 L de água); Richard (10 g sacarose, 10 g KNO₃, 5 g MgSO₄, 0,02 g FeCl₃, 150 mL de suco V-8[®], 1 L de água) e folha de leiteiro (FL, decoção de 200 g de folhas frescas de leiteiro trituradas, 20 g de sacarose, 1 L de água).

Inicialmente foram distribuídos 50 mL de meio em erlenmeyers de 125 mL e autoclavados por 15' à 121°C. Após resfriamento do meio, três discos de micélio do fungo, obtido da margem de colônias cultivadas por sete dias em meio CVA, foram semeados em cada erlenmeyer. Os erlenmeyers foram colocados em agitador orbital com velocidade de 30 rpm por 10 dias a temperatura ambiente. Após esse período, o micélio foi triturado dentro dos erlenmeyers, utilizando um microtritador/homogeneizador, e em seguida 10 mL de suspensão de micélio triturado foram vertidos em placas de Petri de 9 mm, contendo os respectivos meios agarizados. Essas placas foram colocadas em incubadora a 25°C sob fotoperíodo de 12 horas sob um conjunto de duas lâmpadas fluorescentes (40W) e duas lâmpadas de luz negra (40W). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo cada repetição representada por duas placas de Petri.

As avaliações foram feitas após 10 dias. Em cada placa ou erlenmeyers foram adicionados 10 mL de água destilada e esterilizada e a suspensão obtida filtrada em gaze. Uma alíquota de 20 µL da suspensão foi depositada em lâmina para microscopia e contou-se o número de conídios produzidos em cada meio.

4. Crescimento micelial de *A. euphorbiicola* em diferentes meios de cultura líquidos

Com o objetivo de se escolher um meio líquido adequado para o aumento da massa micelial do fungo foram testados os meios de cultura BD (decoção de 200 g de batata; 20 g de sacarose; 1 L de água), BC (decoção de 20 g de batata e 20 g de cenoura, 1 L de água), CV, extrato de levedura e malte (3 g de extrato de malte, 0,5 g KH₂PO₄, 2 g de extrato de levedura, 0,5 g MgSO₄·7H₂O, 1 L de água), FL e Richard. Em cada erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL do meio foram semeados cinco discos

de micélio do fungo, obtidos da margem de uma colônia cultivada em meio CVA por sete dias. Os erlenmeyers foram colocados em agitador orbital a 30 rpm por 10 dias a temperatura ambiente. A cada dois dias, avaliou-se a massa micelial fresca totalizando cinco avaliações. O micélio crescido nos erlenmeyers foi filtrado em bomba de vácuo, utilizando papel de filtro, até o ponto em que não se observou mais a umidade do papel de filtro. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições, sendo cada repetição representada por um erlenmeyer.

5. Esporulação de *A. euphorbiicola* em substratos selecionados

Foram testados os seguintes substratos: palhas de arroz, resíduo de café (mistura de palha e casca de café), folha de mamona triturada e grão de arroz e os materiais inertes: Biodac[®] e vermiculita. Amostras dos substratos foram pesadas (10 g de grão de arroz e Biodac[®] e 3 g dos demais substratos), colocados em erlenmeyers de 125 mL, umedecidos a 80 % com água destilada esterilizada e autoclavados por 30' à 121°C por dois dias consecutivos. Foram adicionados quatro mL de meio FL nos erlenmeyers que continham vermiculita e Biodac[®].

Cinco discos de micélio foram semeados assepticamente nos erlenmeyers e colocados em incubadora a 25°C sob fotoperíodo de 12 horas sob um conjunto de duas lâmpadas fluorescentes (40 W) e duas lâmpadas de luz negra (40 W). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo cada repetição um erlenmeyer. Após 10 dias, foi realizada a primeira coleta de esporos adicionando-se 10 mL de água destilada esterilizada em cada erlenmeyer e, em seguida, foi feita uma agitação vigorosa manualmente. A suspensão obtida foi filtrada em gaze e o número de conídios quantificado como descrito no item 3. Os erlenmeyers foram colocados novamente na incubadora e o procedimento para a obtenção da suspensão foi feito a cada três dias, totalizando três coletas.

6. Comparação da virulência do inóculo de *Alternaria euphorbiicola* obtido pela técnica difásica e de substratos sólidos selecionados no controle de *Euphorbia heterophylla* em condições controladas

Plantas de leiteiro com três a quatro pares de folhas foram inoculadas com uma suspensão de conídios (2×10^5 /mL) obtida em folha de mamona triturada, resíduo de café e pela técnica de fermentação difásica utilizando meio FL. Após a inoculação, as plantas

permaneceram em câmara de nevoeiro a 25°C por seis horas e em seguida foram transferidas para casa de vegetação (26±2°C). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo cada repetição representada por um vaso com uma planta. Após cinco dias avaliou-se o número de plantas mortas por tratamento.

7. Sobrevivência de esporos de *Alternaria euphorbiicola* durante a armazenagem

Nesse experimento, os conídios foram obtidos a partir da utilização da fermentação difásica em meio FL. Após a esporulação do fungo, a suspensão de conídios foi obtida adicionando-se um dos três diluentes: a) água destilada e esterilizada, b) solução de sacarose 35% esterilizada e c) leite desnatado 10 % esterilizado. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas a 15000 g para sedimentação dos esporos que foram retirados do eppendorf com auxílio de uma espátula, misturados com talco neutro e colocados em placas de Petri abertas no dessecador a 18 e 26°C por 48 e 24 horas, respectivamente. Após isso, as misturas foram colocadas em frascos de vidro e, em seguida, vedados e armazenados tanto em temperatura ambiente como a 4°C. A viabilidade foi avaliada, mensalmente, pela porcentagem de germinação dos conídios. Uma amostra de cada frasco foi retirada e misturada com água destilada esterilizada para a obtenção da suspensão de conídios. 500µl da suspensão foi distribuída em placas de Petri contendo meio Agar-água que foram mantidas a 25°C. Após seis horas, a avaliação da germinação foi feita como já descrito no item 2. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial de três suspensões, duas temperaturas de secagem, duas temperaturas de armazenamento e cinco repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri.

8. Análise dos dados

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste da mínima diferença significativa protegido (Fisher-LSD), com o auxílio do programa SAS versão 6.12.

RESULTADOS

Efeito da temperatura no crescimento micelial e germinação de *Alternaria euphorbiicola*

O crescimento radial micelial de *A. euphorbiicola* ocorreu na faixa de 5 a 40°C, com máximo diâmetro a 25°C, seguido de 30 °C (Figura 1). Nas temperaturas extremas, 5, 35 e 40°C, o diâmetro da colônia foi pequeno. Células clamidospóricas foram observadas a 35°C e a esporulação do fungo ocorreu entre 15 e 30°C. Os conídios germinaram entre 5 e 35°C (Figura 2). Entre 15 a 30°C, a porcentagem de conídios germinados foi acima de 97%. A 35 e 5°C verificou-se 12 e 1% de conídios germinados, respectivamente. Os esporos não germinaram a 40°C.

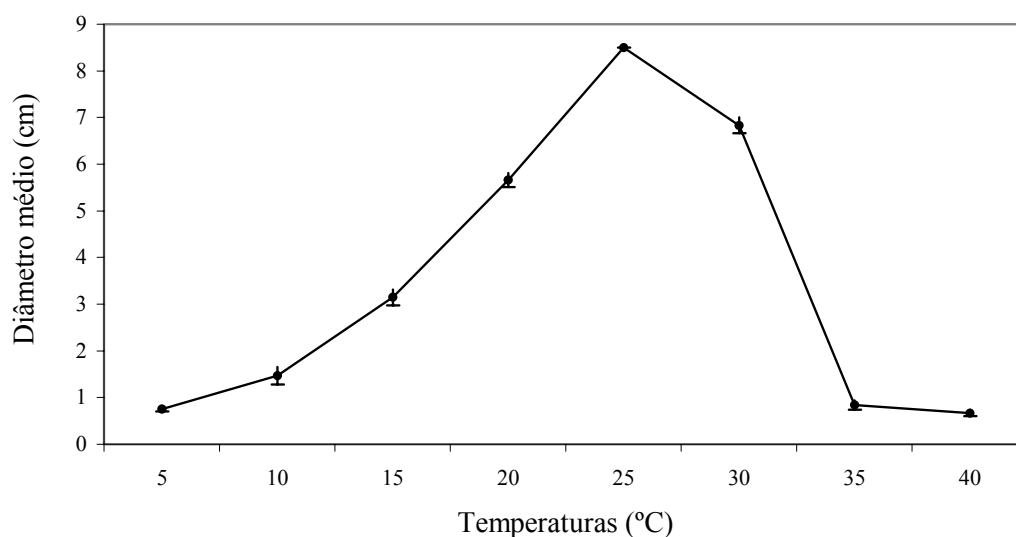


Figura 1: Diâmetro médio radial de *A. euphorbiicola* KLN06, sete dias após o semeio em meio de cultura CVA na faixa de 5 a 40°C. Médias = cinco repetições; Barra = desvio padrão. Valor de 0,5 cm = tamanho inicial do disco de micélio.

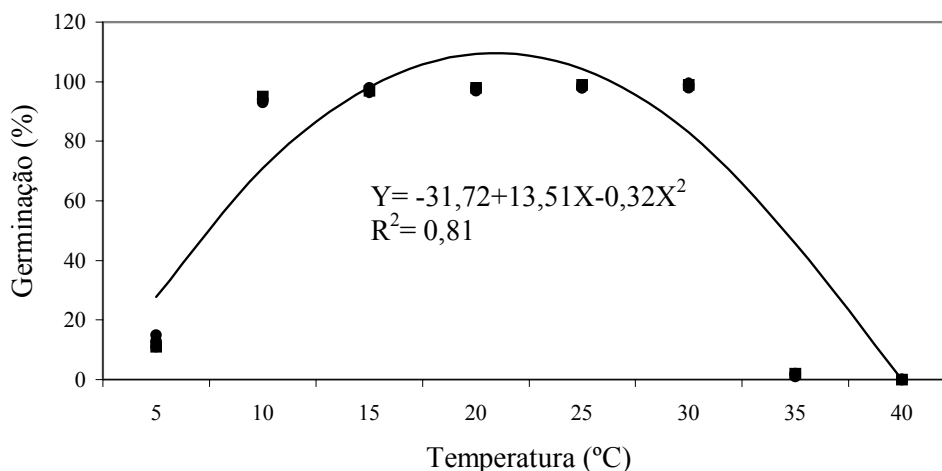


Figura 2: Efeito de temperaturas na germinação de conídios de *A. euphorbiicola*.

Esporulação de *Alternaria euphorbiicola* em diferentes meios de cultura pela técnica difásica

Houve diferença significativa na esporulação obtida para os meios testados. A maior produção de conídios/mL foi obtida em meio de folha de leiteiro ($16,7 \times 10^4$ /mL) seguida da obtida em meio Richard ($6,7 \times 10^4$ /mL) e CV ($2,5 \times 10^4$ /mL). Os meios caldo de abóbora ($0,9 \times 10^4$ /mL) e abóbora triturada ($0,8 \times 10^4$ /mL) foram os menos produtivos (Figura 3). O meio de folha de leiteiro foi adotado, a partir de então, como padrão para a produção de inóculo de *A. euphorbiicola*.

Os meios testados na técnica difásica também foram testados para o cultivo em meio líquido estacionário. No entanto, não houve esporulação de *A. euphorbiicola* nestes meios.

Crescimento micelial de *Alternaria euphorbiicola* em diferentes meios de cultura líquidos

O crescimento micelial de *A. euphorbiicola*, medidas pela massa do micelial fresca acumulada, foi diferente de acordo com o meio de cultura testado (Figura 4). Apenas para o meio FL não foi observada a fase estacionária de crescimento. Nos meios BC, extrato de malte e levedura e CV o fungo apresentou menor massa micelial fresca

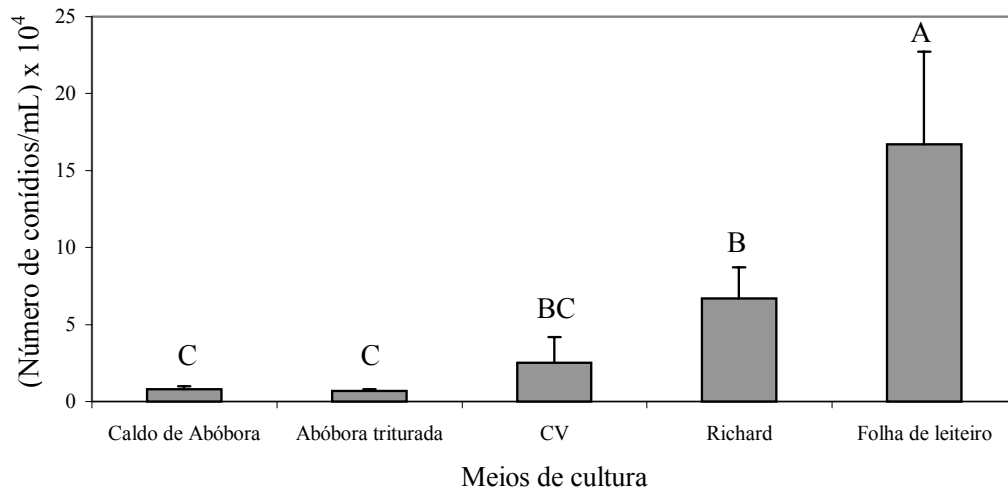


Figura 3: Número de conídios de *Alternaria euphorbiicola* em meios de cultura utilizando a técnica difásica. Médias = cinco repetições; Barras = desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Fisher-LSD ($\alpha=0,05$).

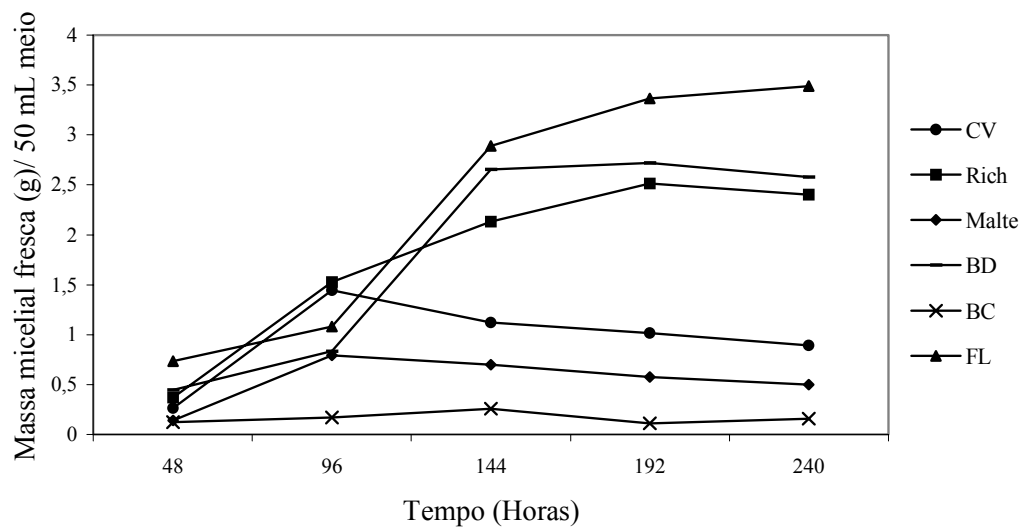


Figura 4: Curva de crescimento micelial de *Alternaria euphorbiicola* em seis meios de cultura líquidos. CV=caldo de vegetais, Rich=Richard, ML= Extrato de malte e levedura, BD=batata dextrose, BC=batata e cenoura e FL=folha de leiteiro.

e, portanto são menos indicados para a produção de micélio de *A. euphorbiicola*. Menor massa micelial foi obtida em meio de BC caracterizada apenas pelo reduzido crescimento dos discos de micélio semeados inicialmente. Os maiores valores de massa micelial fresca foram observados nos meios Richard, FL e BD.

O tempo para a máxima produção micelial variou de acordo com o meio testado (Tabela 1). Dentre esses meios, a maior produção micelial ocorreu em meio FL, 240 horas após o semeio do fungo. Nessa fase, o micélio encontrava-se aglutinado e de coloração escura. A aglutinação de micélio foi observada também no meio Richard, mas este permaneceu com a coloração clara. Nos demais meios foi característica a individualização e a coloração clara das colônias do fungo.

Tabela 1: Produção máxima micelial de *A. euphorbiicola*, medida pela massa micelial fresca em gramas/50 mL de meio, em seis meios líquidos.

Meios de Cultura	Produção Máxima ^a (Massa micelial fresca(g) / 50 mL de Meio)	Horas após o semeio ^b
Folha de leiteiro	3,4874 a	240
Batata dextrose	2,6528 b	144
Richard	2,5162 b	192
Caldo de vegetais	1,4474 c	96
Extrato de malte e levedura	0,7945 d	96
Batata cenoura	0,2602 d	144

^a Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

^b Horas após o semeio onde se observou maior crescimento micelial de *A. euphorbiicola*
Coeficiente de Variação do experimento: 12,30.

Esporulação de *Alternaria euphorbiicola* em substratos selecionados

A produção total de conídios/g de substrato foi resultado da soma de três coletas de esporos. Os dados obtidos são apresentados na Figura 5. As maiores produções de conídios/g de substrato foi observada nos substratos resíduo de café (8×10^4 /g) e folha

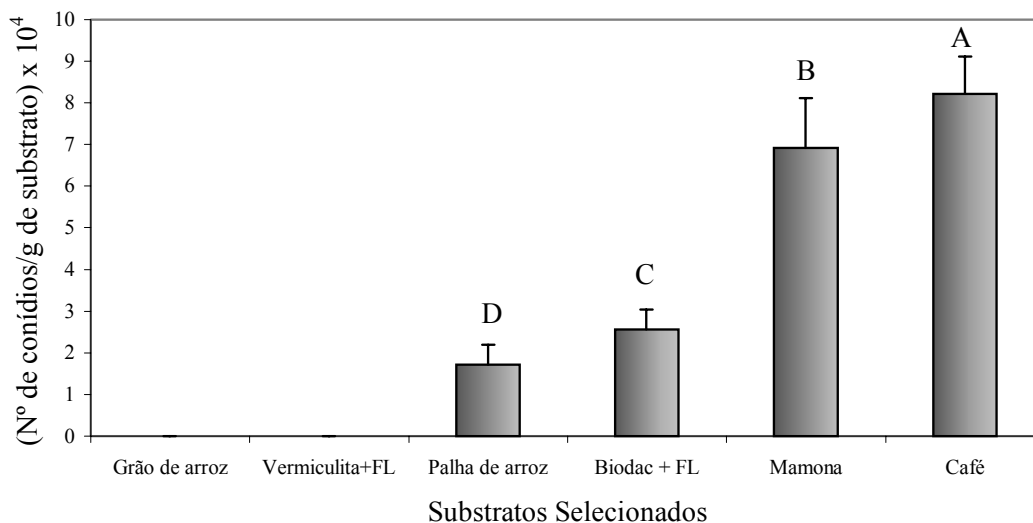


Figura 5: Produção de conídios de *Alternaria euphorbiicola* em substratos selecionados utilizando-se a fermentação sólida. Médias = cinco repetições; Barras = desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Fisher-LSD ($\alpha=0,05$).

de mamona triturada ($6,9 \times 10^4/\text{g}$), seguidos por Biodac[®] + FL ($2,5 \times 10^4/\text{g}$) e palha de arroz ($1,7 \times 10^4/\text{g}$). No substrato grão de arroz e sobre vermiculita + FL não se obteve a esporulação de *A. euphorbiicola*. Em todos os substratos que permitiram a esporulação do fungo, a maior produção de conídios foi obtida na segunda coleta realizada. O resíduo de café e folha de mamona triturada foram selecionados para avaliação da virulência dos conídios produzidos.

Comparação da virulência do inóculo de *Alternaria euphorbiicola* obtidos pela técnica difásica e de substratos sólidos selecionados no controle de *Euphorbia heterophylla* em condições controladas

Todas as plantas pulverizadas com as suspensões de conídios obtidas em folha de mamona triturada, resíduo de café e pela técnica da fermentação difásica morreram cinco dias após a inoculação.

Sobrevivência de esporos de *Alternaria euphorbiicola* durante armazenagem

Os tratamentos utilizados para a obtenção dos esporos e a temperatura de secagem influenciaram a porcentagem de conídios germinados ao longo do tempo tanto no armazenamento à temperatura ambiente como a 4°C (Figura 6). A obtenção da suspensão de esporos utilizando como diluente a solução de sacarose 35% foi o melhor tratamento para manutenção da viabilidade dos conídios independente da temperatura de armazenagem. A temperatura de secagem nesse tratamento influenciou na viabilidade dos conídios armazenados na temperatura ambiente, obtendo-se 94 e 83% de conídios germinados, quando os esporos secaram a 26 e 18°C, respectivamente. No armazenamento a 4°C não foi verificada diferença entre a porcentagem de conídios germinados, submetidos à essas temperaturas de secagem (98% e 97%).

A mistura dos esporos com leite desnatado 10% e a secagem a 26°C reduziu a zero a porcentagem de germinação tanto na temperatura ambiente como a 4°C, aos 30 e 60 dias após o armazenagem, respectivamente. Entretanto, na secagem a 18°C, a porcentagem de conídios germinados foi de 70 (ambiente) e 92% (4°C). A viabilidade dos conídios obtidos em mistura com água foi baixa em armazenagem no ambiente (29 e 27%) enquanto que a 4°C observou-se 94 e 75% de conídios germinados quando a temperatura de secagem foi de 26 e 18°C, respectivamente.

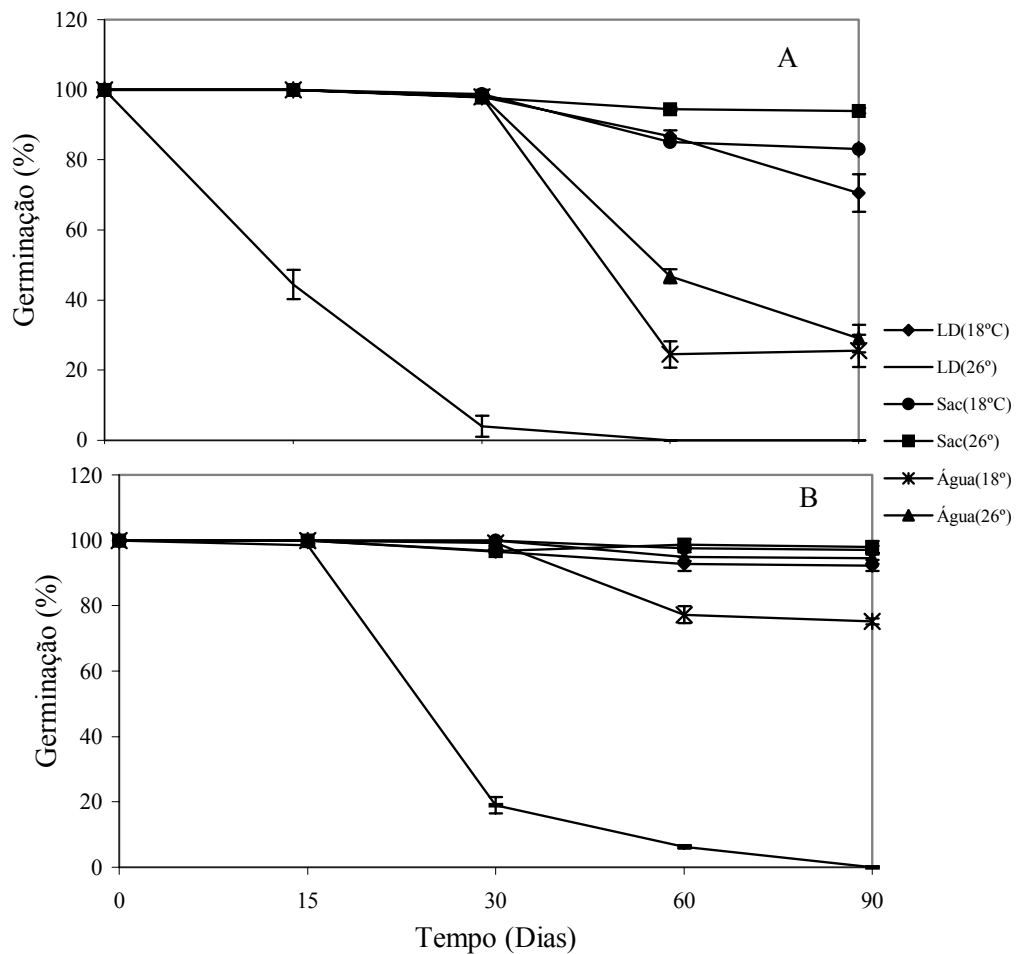


Figura 6: Efeito das condições de armazenamento na porcentagem de conídios de *Alternaria euphorbiicola* germinados. LD= leite desnatado 10 %, Sac = solução de sacarose 35 %. Entre parêntese a temperatura de secagem. A=Ambiente e B= 4 °C. Médias = cinco repetições; Barras = desvio padrão.

DISCUSSÃO

O diâmetro da colônia de *A. euphorbiicola* foi maior nas temperaturas de 25°C e 30°C. Outras espécies de *Alternaria* parecem ter faixa ótima de temperatura para crescimento equivalente. *Alternaria helianthi* (Hansf.) Tubaki & Nishihara cresce na faixa de 18 a 30°C, sendo o ótimo entre 28 e 30°C. Em temperaturas extremas (<15°C ou >33°C) o crescimento não ocorre (Abbas *et al.*, 1995). Em temperaturas altas (40-45°C) também não se observa o desenvolvimento de *Alternaria cirsinoxia* Simmons e

Mortensen (Green *et al.*, 2001). Embora houvesse ainda pequeno crescimento radial micelial e germinação dos conídios de *A. euphorbiicola* mesmo nas temperaturas mais baixas e elevadas testadas, o crescimento e a germinação foram mínimos nestas condições, indicando proximidade com os limites de valores máximo e mínimo de temperatura tolerada por este fungo.

Para a produção de conídios de *A. euphorbiicola* em pequena escala, a técnica difásica utilizando o meio FL nas duas fases foi a mais eficiente. Geralmente, os meios de cultura líquidos utilizados para o aumento da massa fúngica apresentam a mesma eficiência, quando acrescidos de ágar, para a produção de esporos (Churchill, 1982). O uso de extrato de folhas de *E. heterophylla* estimulou a esporulação de *A. euphorbiicola*. A utilização de decocto de planta hospedeira como matéria prima, isoladamente ou em combinação, com outros ingredientes vem sendo reconhecido como eficiente para a máxima produção de esporos de vários outros fungos utilizados como agentes de controle biológico. A adição de extrato de sementes de girassol ao meio BD estimulou a esporulação e o crescimento de *A. helianthi*, utilizado no controle de *Xanthium strumarium* L. (Allen *et al.*, 1983). Meios de cultura associados ao extrato de folhas de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms são os mais indicados para a esporulação de *Alternaria eichhorniae* Nag Raj & Ponnappa (Shabana *et al.*, 1995). Há casos, no entanto, em que a adição deste ingrediente não melhora a esporulação do fungo. Wyss *et al.* (2001) relatam que a adição de extrato de folha de *Cyperus rotundus* L. não estimulou a produção de conídios de *Dactylaria higginsii* (Luttrell) M.B. Ellis. O segundo melhor meio para a produção de esporos de *A. euphorbiicola* foi o meio Richard, a base de suco V-8[®] Agar. O meio de suco V-8[®] é considerado ideal para a indução de esporulação de vários fungos estudados como microherbicidas (Yu *et al.*, 1997; Stewart-Wade *et al.*, 1998; Chandramohan e Charudattan, 2001).

A dependência dos meios FL e Richard, que produziram os melhores resultados na produção de inóculo de *A. euphorbiicola*, em larga escala representariam um obstáculo para a viabilidade comercial de um microherbicida. Para um microherbicida ser viável comercialmente, o fungo deve ser cultivado em substratos de baixo custo. O envolvimento de ágar e suco V-8[®] inviabilizam a utilização dos meios FL e Richard como substrato. Além disso, o leiteiro é uma matéria prima não disponível comercialmente e seu cultivo para atendimento desta necessidade traria novas dificuldades para o processo de produção de um microherbicida a base de *A. euphorbiicola*.

Na busca por substratos de baixo custo e de fácil obtenção, o resíduo de café e folha de mamona triturada foram os substratos que proporcionaram maior produção de conídios de *A. euphorbiicola*. Não houve também perda de infectividade no inóculo produzido desta forma. A esporulação abundante em resíduo de café confirma resultados prévios (Nechet *et al.*, 2001). O processo de fermentação sólida é considerado potencialmente econômico para a obtenção de produtos nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e agrícolas (Ooijikaas *et al.*, 2000), pois o substrato, geralmente, selecionado é um resíduo da agro-indústria, que apresenta baixo custo e fácil disponibilidade (Pandey *et al.*, 2000a). O resíduo de café é rico em carboidratos, proteínas, fibras, taninos e cafeína e o percentual de cada constituinte depende do tipo e da eficiência do processo de sua obtenção, da variedade de café plantada e das condições de cultivo (Pandey *et al.*, 2000b). No Brasil, esse substrato é utilizado para o cultivo de cogumelos comestíveis, produção de compostos aromáticos de *Ceratocystis fimbriata* Ell & Halst e ácido giberélico de *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenw. (Soccol e Vandenberghe, 2002). Esse substrato pode ser também utilizado para a produção de conídios de *A. euphorbiicola*. Entretanto, a padronização do processo de fermentação sólida deve ser investigada. O efeito da mistura palha:casca de café em diferentes proporções, o uso isoladamente de cada componente do resíduo, a temperatura de incubação e o papel de outros fatores na produção e na infectividade e virulência do inóculo ainda deve ser melhor estudado.

Outro aspecto observado nesse trabalho foi o processamento e formulação em pó de *A. euphorbiicola*, temperatura de secagem e de armazenamento. Observou-se que estes fatores influenciam significativamente a viabilidade do produto armazenado. O uso da solução de sacarose 35% para a obtenção de esporos e a secagem rápida a 26°C foi o único processo capaz de manter a viabilidade dos conídios armazenados à temperatura ambiente acima de 90% após três meses. A adição de sacarose ao processo de formulação de micoherbicidas vem sendo apontada como eficiente para aumentar a vida de prateleira do micélio e conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. (Quimby Jr. *et al.*, 1999) e de conídios de *C. truncatum* (Schw.) Andrus and Moore (Connick Jr. *et al.*, 1996).

No armazenamento a 4°C, a viabilidade de conídios acima de 90% foi verificada nos processos envolvendo solução de sacarose (26 e 18°C), água (26°C) e leite desnatado (18°C) e a metodologia utilizada parece não influenciar a viabilidade dos conídios nessa temperatura. Temperaturas baixas mantêm por mais tempo a viabilidade

dos propágulos armazenados de *C. truncatum* (Silman *et al.*, 1993), *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler e *Trematophoma lignicola* Petrak (Lawrie *et al.*, 2001). A temperatura de secagem a 26°C foi deletéria para os esporos misturados com leite desnatado 10%, mas esse efeito deve ser investigado uma vez que nesse processo ocorreu contaminação com bactérias.

A produção e formulação de um microherbicida envolvem várias etapas e controle rígido de qualidade visando manter a estabilidade e eficiência do produto comercializado. Os resultados aqui apresentados são exploratórios, mas com perspectivas favoráveis quanto à viabilidade de *A. euphorbiicola* como microherbicida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, H.K.; Egley, G.H.; Paul, R.N. 1995. Effect of conidia production temperature on germination and infectivity of *Alternaria helianthi*. *Phytopathology*, v.85, n.6, p.677-682, 1995.
- Allen, S.J.; Brown, J.F.; Kochman, J.K. 1983. Production of inoculum and field assessment of *Alternaria helianthi* on sunflower. *Plant Disease*, v.67, n.6, p.665-668.
- Auld, B.A. 1997. Bioherbicides. In: “Biological control of weeds: theory and practical application”, (Julien, M. e White, G. eds), pp. 129-134. ACIAR, Canberra, Austrália.
- Chandramohan, S.; Charudattan, R. 2001. Control of seven grasses with a mixture of three fungal pathogens with restricted host range. *Biological Control*, v.22, p.246-255.
- Charudattan, R.; Dinooor, A. Biological control of weeds using plant pathogens: accomplishments and limitations. 2000. *Crop Protection*, v. 19, p. 691-695.
- Churchill, B.W. 1982. Mass production of microorganisms for biological control. In: “Biological control of weeds with plant pathogens”, (Charuddatan, R.; Walker, H.L., eds), pp. 139-156. John Willey & Sons, New York.
- Connick Jr., W.J.; Daigle, D.J.; Boyette, K.S.; Williams, B.T.; Vinyard, B.T.; Quimby Jr., P.C. 1996. Water activity and others factors that affect the viability of *Colletotrichum truncatum* conidia in wheat flour-kaolin Granules (“Pesta”). *Biocontrol Science and Technology*, v.6, p.277-284.
- Foloni, L.L.; Christoffoleti, P.J. 1999. Chemical weed control in soybean in Brazil using new herbicides and mixtures. In: “Proceedings of the 1999 Brighton Conference Weeds.”, (The British Crop Protection Council, Ed.), pp. 315-318, 1999, Brighton British Crop Protection Council, Brighton, UK.

- Gazziero, D.L.P.; Brighenti, A.M.; Maciel, C.D.G.; Christoffoleti, P.J.; Adegas, F.S.; Voll, E. 1997. Resistência de amendoim-bravo aos herbicidas inibidores da enzima ALS. *Planta Daninha*, v.16, n.2, p.117-125.
- Green, S.; Mortensen, K.; Bailey, K.L. 2001. Host range, temperature response, survival, and overwintering of *Alternaria cirsinoxia*. *Biological Control*, v.20, p. 57-64.
- Green, S.; Stewart-Wade, S.M.; Boland, G.J.; Teshler, M.P.; Liu, S.H. 1997. Formulating microorganism for biological control of weeds. In: "Plant Microbe interactions and biological control", (Boland, G.J. Ed), pp. 249-281, New York.
- Jackson, M.A.; Schisler, D.A.; Slininger, P.J.; Boyette, C.D.; Silman, R.W.; Bothast, R.J. 1996. Fermentation strategies for improving the fitness of a bioherbicide. *Weed Technology*, v.10, p. 645-650.
- Jenkins, N.E.; Heviefó, G.; Langewald, J.; Cherry, A.J.; Lomer, C.J. 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol/News and Information*, v. 19, n. 1, p. 21N-31N.
- Lawrie, J.; Down, V.M.; Greaves, M.P. 2001. Effects of storage on viability and efficacy of granular formulations of the microbial herbicides *Alternaria alternata* and *Trematophoma lignicola*. *Biocontrol Science and Technology*, v.11, p.283-295.
- Lorenzi, H.J. 2000. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. Nova Odessa, São Paulo.
- Melhorança, A.L.; Pereira, F.A.R. 1999. Eficiência do herbicida lactofen no controle de *Euphorbia heterophylla*, resistente aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS). *Documentos-Embrapa Agropecuária Oeste*, v. 3, p. 11-14.
- Nechet, K.L.; Lustosa, D.C.; Marini, F.S.; Barreto, R.W. 2001. Esporulação de *Alternaria euphorbiicola* e *Corynespora cassiicola* em substratos selecionados e seu potencial para a produção massal desses fungos. *Fitopatologia Brasileira*, v.26, p.365.
- Ooijkaas, L.P.; Weber, F.J.; Buitelaar, R.M.; Tramper, J.; Rinzema, A. 2000. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Trends in Biotechnology*, v.18, p.356-360.
- Pandey, A.; Soccol, C.R.; Mitchell, D. 2000a. New developments in solid state fermentation: I- bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, v.35, p.1153-1169.
- Pandey, A.; Soccol, C.R.; Nigam, P.; Brand, D.; Mohan, R.; Roussos, S. 2000b. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*, v. 6, p. 153-162.
- Parsons, W.T.; Cuthbertson, E.G. 1992. Noxious Weeds of Australia. Sydney : Inkata Press, pp.420-422.

- Pereira, J.M.; Barreto, R.W.; Ellison, C.A.; Maffia, L.A. 2002. *Corynespora cassiicola* f.sp. *lantanae*: a potential biocontrol agent for *Lantana câmara* from Brazil. *Biological Control*, v.26, n.1, p.21-31.
- Quimby Jr., P.C.; Zidack, N.K.; Boyette, C.D.; Grey, W.E. 1999. A simple method for stabilizing and granulating fungi. *Biocontrol Science and Technology*, v.9, p.5-8.
- Shabana, Y.M.; Charudattan, R.; Elwakil, M.A. 1995. Identification, pathogenicity, and safety of *Alternaria eichhorniae* from Egypt as a bioherbicide agent for waterhyacinth. *Biological Control*, v.5, p.123-135.
- Socol, C.R.; Vandenberghe, L.P.S. 2002. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal* (no prelo).
- Silman, R.W.; Bothast, R.J.; Schisler, D.A. 1993. Production of *Colletotrichum truncatum* for use as a mycoherbicide: effects of culture, drying and storage on recovery and efficacy. *Biotechnology Advances*, v.11, n.3, p.561-575.
- Stewart-Wade, S.M.; Lawrie, A.C.; Bruzzese, E. 1998. An Australian isolate of *Alternaria crassa* shows potential as a mycoherbicide to control the weed *Datura stramonium*. *Australasian Plant Pathology*, v.27, p.186-197.
- Te Beest.1996. Issues and prospects confronting biological control of weeds with plant pathogens in the future. *Phytoparasitica*, v. 24, n. 2, p. 91-95.
- Timossi, A.J. 2002. "I Levantamento de safra 2002/2003 FNP Consultoria & Comércio: Grãos (milho e soja)". FNP Agroinformativos, Brasil.
- Walker, L. 1980. Production of spores for field studies. *Adv. Agric. Technol.* v.12, p. 1-5.
- Wyss, G.S.; Charudattan, R.; DeValerio, J.T. 2001. Evaluation of agar and grain media for mass production of conidia of *Dactylaria higginsii*. *Plant Disease*, v.85, n.11, p.1165-1170.
- Yu, X.; Hallett, S.G.; Sheppard, J.; Watson, A.K. 1997. Application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements for the production of *Colletotrichum coccodes* spores. *Applied microbiology Biotechnology*, v.47, p.301-303.

CONCLUSÕES GERAIS

O isolado KLN05 de *Bipolaris euphorbiae* foi selecionado por ter maior agressividade em sete das nove populações de *E. heterophylla* testadas, superando os resultados obtidos com o isolado TAD que vinha sendo utilizado nos trabalhos desenvolvidos no Paraná. Entretanto, a aplicação de uma suspensão de conídios numa concentração elevada (10^7 conídios/mL) foi necessária para causar 80% de mortalidade da parte aérea das plantas de uma dentre as populações testadas. A população caracterizada como resistente ao fungo não foi controlada eficientemente pelo isolado mesmo nessa concentração. *B. euphorbiae* foi específico a *E. heterophylla*. A germinação dos conídios de *B. euphorbiae* não foi inibida pela mistura com os herbicidas atrazine, carfentrazone, fomesafen, glyphosate, glyphosate+carfentrazone e imazethaphyr.

A produção de conídios de *Sphaceloma poinsettiae* foi inconsistente e seu uso como propágulo causou menor severidade da doença nas populações de *E. heterophylla*. Os fragmentos de micélio deste fungo foram usados como inóculo e sua eficiência foi maior quando o micélio foi produzido em meio de cultura líquido de Batata Dextrose. Entretanto, a viabilidade desses propágulos durante o armazenamento, tanto em temperatura ambiente como a 4°C declinou rapidamente e após 25 dias, a maior porcentagem de ufc viáveis foi de 60 % quando o propágulo foi mantido em suspensão com água ou solução de sacarose 35% a 4°C. *S. poinsettiae* foi específico a *E. heterophylla*.

O isolado KLN06 de *Alternaria euphorbiicola* destacou-se como potencial micoherbicida, sendo capaz de produzir elevada mortalidade da parte aérea em 11 populações de *E. heterophylla* testadas, inclusive a que apresenta resistência aos herbicidas inibidores da ALS, no estágio de seis a oitos folhas, em que aplicações de produtos químicos já não resultam em controle. A aplicação de uma suspensão de 2×10^5 conídios/mL e a exposição das plantas inoculadas a um período de seis horas de molhamento provido até 48 horas após a inoculação foram condições suficientes para ocorrer a morte da parte aérea das plantas. O atraso de início do período de molhamento não diminuiu a mortalidade da parte aérea do leiteiro, mas aumentou a porcentagem de rebrota das plantas. Todos os seis estádios testados (de plântula a planta com frutos) foram suscetíveis ao patógeno.

O isolado KLN06 de *A. euphorbiicola* sobreviveu em hastes de leiteiro colonizadas localizadas na superfície do solo seco e úmido e, quando enterradas apenas em solo seco. A transmissão da doença para as plântulas de *E. heterophylla* emergentes ocorreu quando as hastes colonizadas foram mantidas na superfície do solo úmido. No entanto, apenas a infecção natural de plântulas não foi suficiente para o controle de *E. heterophylla*. A aplicação de uma suspensão de conídios numa concentração mais baixa (10^4 conídios/mL) não controlou as plantas previamente infectadas após a emergência próximo à fonte de inóculo (hastes de leiteiro colonizadas por *A. euphorbiicola*). A gama de hospedeiros do fungo foi restrita às euforbiáceas *Chamaesyce hirta*, *C. hyssopifolia*, *E. heterophylla*, *E. cotinifolia*, *E. milii*, *E. pulcherrima* e *E. tirucali*. O fungo poderia ser explorado também para o controle de *C. hirta* e *E. hyssopifolia*, nas quais causou alta severidade da doença. As oito cultivares de soja testadas foram imunes à aplicação de *A. euphorbiicola*.

A. euphorbiicola controlou eficientemente as populações sensíveis e resistentes aos inibidores da ALS, sem restrições ao estágio fenológico de *E. heterophylla*, e o controle obtido foi equivalente aos dos herbicidas fomesafen, carfentrazone e atrazine em plantas com até cinco folhas e ao do herbicida glyphosate em plantas com cinco a 10 folhas. Nesse estágio, verificou-se que o controle pelo fungo foi superior aos produzidos por imazethaphyr e fomesafen. O efeito do herbicida fomesafen foi melhorado pela mistura com o fungo e essa mistura controlou as plantas em estágio mais avançado quando o herbicida isoladamente não o faria. A mistura do fungo com glyphosate permitiu a antecipação do controle pelo produto. O controle das populações foi mais rápido e eficiente quando se utilizou *A. euphorbiicola* isolado do que em

mistura com imazethaphyr. Esse produto retardou o processo de infecção do fungo e sua eficácia em controlar a população resistente à ALS. A aplicação da mistura resultou em morte das plantas de soja.

A técnica difásica foi apropriada para a produção de inóculo de *A. euphorbiicola* e a adição de extrato de folha de leiteiro estimulou a esporulação do fungo em meio agarizado e o aumento da massa micelial fresca em meio líquido. Os substratos sólidos, resíduo de café e folha de mamona, foram adequados para a obtenção de inóculo do fungo, em substituição ao meio agarizado. A obtenção da suspensão de esporos utilizando-se sacarose 35% seguido de secagem a 26°C por 24 horas foi o único tratamento capaz de manter a viabilidade dos conídios acima de 90% após três meses de armazenamento na temperatura ambiente.