

JOSÉ MAURÍCIO PEREIRA

***Prospodium tuberculatum e Corynespora cassicola como
agentes de biocontrole de Lantana camara***

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
2001

À minha esposa Sebastiana Fátima
Às minhas filhas Letícia e Mariana

AGRADECIMENTO

A Deus.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), especialmente ao Departamento de Fitopatologia (DFP), pela oportunidade de realizar este curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudos do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estágio no exterior.

Aos meus pais Francisco e Maria da Glória, principais responsáveis pela minha formação e vocação. E a todos os meus familiares pelo constante incentivo, estímulo e apoio.

Ao Professor Robert Barreto, pela amizade e orientação na realização deste trabalho.

Aos Professores Luiz Maffia, Onkar Dhingra e Sérgio Brommonschenkel, pelas críticas e sugestões durante a condução deste trabalho.

Aos Professores do DFP que por sua dedicação possibilitaram a ampliação dos meus conhecimentos.

Aos Pesquisadores do CABI Bioscience, Inglaterra, Dra. Carol Ellison, Dr. Harry C. Evans e Dr. Paul Bridge (atualmente na Kew University) pela ajuda, orientação e valiosas sugestões.

Aos colegas Ademir, Alan, Célio, Claudine, Cláudio, Denise, Gustavo, José Orlando, Kátia, Marcelo, Oswaldo, Rita, Rogério e Sueli pela ajuda prestada durante a realização deste trabalho e a convivência na Clínica de Doença de Plantas do DFP.

Aos colegas de curso Adelica, Adriana, Ailton, Cláudia, Dalza, Davi, Débora, Edson, Eliane, Eloísa, Iraildes, Jorge, José Mauro, José Ricardo, Luiz

Arthur, Marcelo, Raquel, Regina, Renate, Ricardo, Rosineide e Sandro pela amizade e pela saudável convivência.

Aos colegas conquistados na Inglaterra Alex, Denise, Djami, Emma, Meggan, Richard, Robert, Sarah, Siegfried, Seungboun, Sibó e Sue pelo apoio e ajuda.

À Regina, Cecília, Délio, Jorge, e Brás pela presteza em ajudar. Aos demais funcionários do DFP, pelo convívio e pela ajuda durante este trabalho.

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

BIOGRAFIA

JOSÉ MAURÍCIO PEREIRA, filho de Francisco Pereira e Maria da Glória Pereira, nasceu em Lavras, Minas Gerais, em 22 de setembro de 1965.

Em março de 1984, iniciou o Curso de Agronomia na Universidade Federal de Lavras, graduando-se em dezembro de 1987.

Em janeiro de 1988, foi admitido na Drogaria Araújo S.A. em Belo Horizonte, Minas Gerais, para o cargo de Responsável Técnico na Seção Agroveterinária, onde exerceu atribuições em consultoria e recomendação técnica. Permaneceu nesta empresa até fevereiro de 1995.

Em março de 1995, iniciou o Curso de Mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, concluindo o mesmo em fevereiro de 1997.

Em março de 1997, iniciou o Curso de Doutorado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais com estágio no exterior (1999), no CABI Bioscience, Inglaterra.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO 1	
ESCLARECIMENTO DO CICLO DE VIDA DE <i>Prospodium tuberculatum</i>	5
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
2.1. Observações no campo.....	9
2.2. Inoculações controladas.....	10
2.2.1. Efeito da luz na esporulação de <i>Prospodium tuberculatum</i>	10
2.2.2. Produção de teliosporos.....	10
2.3. Germinação de teliosporos.....	11
2.3.1. Escarificação com produtos químicos.....	11
2.3.2. Temperatura ótima para germinação de teliosporos.....	11
2.4. Método e tempo de armazenamento na germinação de teliosporos.....	13
2.5. Inoculação de <i>Lantana camara</i> com basidiosporos de <i>Prospodium tuberculatum</i>	14
2.6. Verificação da possível conexão entre <i>Aecidium lantanae</i> e <i>Prospodium tuberculatum</i>	15
2.6.1. Inoculações controladas.....	15
2.6.2. Estudos moleculares.....	16
2.7. Estudos citológicos.....	21
3- RESULTADOS.....	23
3.1. Observações no campo.....	23

3.2. Inoculações controladas.....	23
3.2.1. Efeito da luz na esporulação de <i>Prospodium tuberculatum</i>	23
3.2.2. Produção de teliosporos.....	23
3.3. Germinação de teliosporos.....	24
3.4. Método e tempo de armazenamento na germinação de teliosporos.....	25
3.5. Inoculação de <i>Lantana camara</i> com basidiosporos de <i>Prospodium tuberculatum</i>	25
3.6. Conexão entre <i>Aecidium lantanae</i> e <i>Prospodium tuberculatum</i>	26
3.6.1. Inoculações controladas.....	26
3.6.2. Estudos moleculares.....	26
3.7. Estudos citológicos.....	27
4- DISCUSSÃO.....	29
5- RESUMO E CONCLUSÕES.....	33
CAPÍTULO 2	
CARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO DE <i>Corynespora cassiicola</i> OBTIDO DE <i>Lantana camara</i> E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL PARA O BIOCONTROLE.....	
1- INTRODUÇÃO.....	35
2- MATERIAL E MÉTODOS.....	38
2.1. Caracterização morfológica do fungo.....	38
2.1.1. Morfologia geral.....	38
2.1.2. Comparação entre isolados monospóricos de <i>Corynespora cassiicola</i>	38
2.2. Testes de especificidade.....	39
2.2.1. Especificidade de isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> à lantana, outros gêneros e famílias.....	40
2.2.2. Especificidade de isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> em folhas destacadas de biótipos de <i>Lantana</i> spp.....	41
2.2.3. Especificidade de isolados de <i>Corynespora cassiicola</i>	

em plantas de biótipos selecionados de <i>Lantana</i> spp.....	42
2.3. Condições culturais ótimas para esporulação de	
<i>Corynespora cassiicola</i> isolado lantana.....	43
2.3.1. Meios de cultura para o crescimento micelial e esporulação de	
<i>Corynespora cassiicola</i> isolado lantana.....	43
2.3.2. Crescimento micelial e esporulação de <i>Corynespora</i>	
<i>cassiicola</i> isolado lantana com exposição à luz negra.....	43
2.3.3. Meios de cultura e temperaturas para esporulação de	
<i>Corynespora cassiicola</i> isolado lantana.....	44
2.3.4. Meios de cultura e regimes de luz para esporulação de	
<i>Corynespora cassiicola</i> isolado lantana.....	45
2.4. Concentração mínima de inóculo de <i>Corynespora cassiicola</i>	
isolado lantana para ocorrência da doença.....	45
2.5. Exigências de molhamento foliar de <i>Corynespora cassiicola</i>	
isolado lantana.....	46
2.5.1. Duração do molhamento foliar para ocorrência da doença.....	46
2.5.2. Atraso no molhamento foliar.....	46
2.6. Impacto de uma segunda aplicação de <i>Corynespora</i>	
<i>cassiicola</i> isolado lantana no progresso da doença.....	47
2.7. Verificação da fitotoxidez de filtrado de conídios germinados	
de <i>Corynespora cassiicola</i> isolado lantana.....	48
2.8. Produção de inóculo de <i>Corynespora cassiicola</i> isolado lantana.....	49
2.8.1. Substratos sólidos para produção de inóculo de	
<i>Corynespora cassiicola</i> isolado lantana.....	49
2.8.2. Produção de inóculo de <i>Corynespora cassiicola</i> isolado lantana	
em substratos sólidos selecionados.....	50
2.8.3. Fermentação difásica líquido-sólido na produção de inóculo de	
<i>Corynespora cassiicola</i> isolado lantana.....	50
3- RESULTADOS.....	52
3.1. Caracterização morfológica do fungo.....	52
3.1.1. Morfologia geral.....	52

3.1.2. Comparação entre isolados monospóricos de <i>Corynespora cassiicola</i>	54
3.2. Testes de especificidade.....	55
3.2.1. Especificidade de isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> à lantana, outros gêneros e famílias.....	55
3.2.2. Especificidade de isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> em folhas destacadas de biótipos de <i>Lantana</i> spp.....	56
3.2.3. Especificidade de isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> em plantas de biótipos selecionados de <i>Lantana</i> spp.....	56
3.3. Condições culturais ótimas para esporulação de <i>Corynespora cassiicola</i> isolado lantana.....	59
3.3.1. Meios de cultura para o crescimento micelial e esporulação de <i>Corynespora cassiicola</i> isolado lantana.....	59
3.3.2. Crescimento micelial e esporulação de <i>Corynespora</i> <i>cassiicola</i> isolado lantana com exposição à luz negra.....	59
3.3.3. Meios de cultura e temperaturas para esporulação de <i>Corynespora cassiicola</i> isolado lantana.....	60
3.3.4. Meios de cultura e regimes de luz para esporulação de <i>Corynespora cassiicola</i> isolado lantana.....	61
3.4. Concentração mínima de inóculo de <i>Corynespora cassiicola</i> isolado lantana para ocorrência da doença.....	61
3.5. Exigências de molhamento foliar de <i>Corynespora cassiicola</i> isolado lantana.....	63
3.5.1. Duração do molhamento foliar para ocorrência da doença.....	63
3.5.2. Atraso no molhamento foliar.....	63
3.6. Impacto de uma segunda aplicação de <i>Corynespora</i> <i>cassiicola</i> isolado lantana no progresso da doença.....	65
3.7. Verificação da fitotoxidez de filtrado de conídios germinados de <i>Corynespora cassiicola</i> isolado lantana.....	65
3.8. Produção de inóculo de <i>Corynespora cassiicola</i> isolado lantana.....	67
3.8.1. Substratos sólidos para produção de inóculo de	

<i>Corynespora cassiicola</i> isolado lantana.....	67
3.8.2. Produção de inóculo de <i>Corynespora cassiicola</i> isolado lantana em substratos sólidos selecionados.....	67
3.8.3. Fermentação difásica líquido-sólido na produção de inóculo de <i>Corynespora cassiicola</i> isolado lantana.....	69
4- DISCUSSÃO.....	70
5- RESUMO E CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

RESUMO

PEREIRA, José Maurício, D.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2001. ***Prospodium tuberculatum* e *Corynespora cassiicola* como agentes de biocontrole de *Lantana camara***. Orientador: Robert Weingart Barreto. Co-orientadora: Carol Ann Ellison. Conselheiros: Luiz Antônio Maffia e Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

Foram realizados estudos para ampliar o conhecimento dos fitopatógenos *Prospodium tuberculatum* e *Corynespora cassiicola*, e possibilitar o seu uso como agentes de biocontrole de *Lantana camara*.

Nos estudos relacionados a *P. tuberculatum* procurou-se elucidar o ciclo de vida do patógeno. Observações de campo num período de quatro anos mostraram a predominância de apenas dois tipos de esporos: uredosporos e teliosporos, sendo os últimos presentes geralmente durante o período de outono-inverno. Nas inoculações controladas com uredosporos, observou-se uma maior severidade da doença quando as plantas foram mantidas por 48 horas no escuro ou sujeitas a baixa temperatura. Apesar de H₂O₂ e NaOCl não promoverem a germinação de teliosporos, esta foi obtida quando os esporos foram mantidos a 15°C em ágar-água por pelo menos 24 horas. Diferentes ensaios de inoculação com basidiosporos do fungo foram conduzidos sem resultar em infecção. Eciosporos de *Aecidium lantanae*, uma espécie na qual apenas o estágio aecídico é conhecido, não foram infectivos quando inoculados em biótipos de *L. camara*. A comparação molecular, para estudar a possível conexão entre *A. lantanae* e *P. tuberculatum*, utilizando-se o par de primers ITS1 e ITS4, demonstrou serem estas espécies distintas. As basídias de *P. tuberculatum*, observadas após técnica de coloração apresentaram tamanho, forma e número de núcleos variáveis. Baseado nas evidências obtidas e na informação já disponível na literatura científica considerou-se como que *P. tuberculatum* é provavelmente uma ferrugem autoécia com ciclo de vida reduzido. Considerando-se também a elevada especificidade

demonstrada com inoculações de uredosporos, em testes anteriores, concluiu-se que os riscos desta ferrugem vir a infectar outras plantas que não *L. camara* após sua introdução em outros países como agente de biocontrole seria pequeno. Sua introdução na Austrália está em andamento.

Corynespora cassiicola, um fungo mitosporico encontrado pela primeira vez no Brasil associado à *L. camara*, foi estudado isoladamente e em associação com *L. camara*. Inoculações em diversos hospedeiros demonstraram uma elevada especificidade de *C. cassiicola* isolado de lantana (C.c.l.), restrita a determinados biótipos de lantana. Determinou-se que as melhores condições, entre as testadas, para promover a esporulação de C.c.l., foram com crescimento em meio de cultura CVA, mantido sob luz contínua durante 15 dias, a uma temperatura entre 20 e 28°C, com um ótimo de 23°C. A concentração mínima do inóculo para provocar doença foi de 1×10^5 conídios/ml. Quando expostas a um mínimo de seis horas de molhamento foliar as plantas de lantana inoculadas com C.c.l. apresentaram 100% de severidade da doença e mais de 70% de desfolha. Havendo até seis horas de atraso no molhamento foliar, após a inoculação, observou-se não haver prejuízo para a severidade da doença. Plantas inoculadas por duas vezes consecutivas apresentaram maior severidade nos sintomas e dificuldade no desenvolvimento, podendo chegar à morte. Foi demonstrada a presença de substância fitotóxica no filtrado derivado de conídios germinados do fungo. O fungo esporulou bem em diversos substratos sólidos, em especial grãos de arroz, sorgo e raiz de mandioca, facilitando a sua produção massal. Concluiu-se que C.c.l. possui um grande potencial para ser utilizado como agente de biocontrole de determinados biótipos de *L. camara*.

ABSTRACT

PEREIRA, José Maurício, D.S., Universidade Federal de Viçosa, February 2001. ***Prospodium tuberculatum* and *Corynespora cassiicola* as biocontrol agents of *Lantana camara***. Supervisor: Robert Weingart Barreto. Co-supervisor: Carol Ann Ellison. Committee members: Luiz Antônio Maffia and Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

Studies were carried out as part of a programme aimed at evaluating the pathogenic fungi *Prospodium tuberculatum* and *Corynespora cassiicola* as biocontrol agents of *Lantana camara*.

Attempts at elucidating the life cycle of *P. tuberculatum* were made. Field observations during four years showed the predominance of two types of spores: uredospores and teliospores. Teliospores were only present in the autumn-winter period. Disease severity was increased when plants were inoculated with uredospores and maintained for 48 hours in the dark or at low temperatures. Teliospores treated with H₂O₂ and NaOCl did not germinate, while up to 20% teliospores maintained at 15°C in water agar media for 24 hours germinated. Trials using different inoculation methods based on teliospores were conducted, but the spores did not germinate and infect the plants. Inoculations with aeciospores from *Aecidium lantanae* did not result in infection of any of the lantana biotypes included in the test. Molecular comparison between *A. lantanae* and *P. tuberculatum* based in ITS primers showed that they are distinct species, although occasionally occurring on the same individual host in the field. Stained basidia of *P. tuberculatum* showed variable nucleus size, shape and number. Results obtained on these studies and information from scientific literature suggest that *P. tuberculatum* is probably an autoecious rust with a reduced life cycle. Previous host-range tests, which were carried out using uredospores, had proven a high host-specificity of this fungus to some lantana biotypes. It was concluded that *P. tuberculatum* was

safe for introduction as classical biocontrol agent. Introduction of this fungus in Australia was approved on February 2001.

Corynespora cassiicola was found for the first time in Brazil (Paraná), attacking *L. camara*. A series of tests were then made in order to evaluate its biocontrol potential. Inoculations of selected hosts showed a high specificity of the isolate of the *C. cassiicola* lantana strain (C.c.l.). Its ability to cause disease was restricted to some *L. camara* biotypes. The best conditions for C.c.l. germination, were growth in a vegetable broth agar media, under continuous light during 15 days, with temperatures ranging from 20 to 28°C (optimal of 23°C). Minimum concentration of inoculum necessary for causing disease was 1×10^5 conidia/ml. Lantana plants showed 100% of disease severity and more than 70% of the defoliation when exposed to at least six hours of dew period. Inoculated plants left outside the dew chamber for up to six hours after inoculation, still showed a high level of disease severity. Plants that were inoculated twice at a 15 days interval, showed a higher severity level of disease and some of the plants included in the test died. The production of a phytotoxic substance by C.c.l. was suspected and a test involving applications of filtrate of germinated conidia had proven that hypothesis. The fungus had good sporulation in some solid substratum, particularly in grains rice, sorghum and cassava roots. In general, results showed that C.c.l. has a high potential as biocontrol agent of certain *L. camara* biotypes.

INTRODUÇÃO GERAL

Lantana camara L., uma planta arbustiva da família Verbenaceae, conhecida vulgarmente por lantana, camará, camará e chumbinho, entre outros, é uma das plantas invasoras mais agressivas do mundo. A planta é originária do Continente Americano, ocorrendo naturalmente do sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, sendo bastante freqüente em todo o Brasil (HARLEY, 1971; WINDER e HARLEY, 1983; CILLIERS e NESSER, 1991; DENTON et al., 1991a; KISSMANN e GROTH, 1991; LORENZI, 1991; JULIEN, 1992; MORTON, 1994).

A partir da introdução na Europa como planta ornamental em 1636, *L. camara* foi levada para colônias tropicais e subtropicais, como Austrália, África do Sul, Índia e Havaí (STIRTON, 1977; DENTON et al., 1991b; PALMER e PULLEN, 1995). A sua aparência atrativa, crescimento vigoroso e habilidade em tolerar uma grande amplitude de condições climáticas, a fez popular como planta ornamental e para formação de cercas vivas, chegando a ser considerada uma das favoritas para jardins na Europa e Estados Unidos durante a segunda metade do século XIX (GREATHEAD, 1968; STIRTON, 1977; SWARBRICK, 1986; MORTON, 1994).

A introdução na maioria dos países foi como planta ornamental e a posterior disseminação através de pássaros, macacos e outros animais (CRAFTS e ROBBINS, 1962; HARLEY, 1971; CRAFTS, 1975; MORTON, 1994), fez com que a espécie se tornasse invasora em cerca de 50 países, competindo com várias culturas econômicas e infestando milhões de hectares de pastagens. Na Austrália, estima-se uma perda anual em 7,7 milhões de dólares australianos nas áreas infestadas por *L. camara*, através de gastos com o controle da invasora, redução no crescimento das pastagens e envenenamento e morte do gado (CULVENOR, 1985). Em pelo menos 22 países é considerada uma das cinco plantas daninhas mais agressivas (HOLM et al., 1977; STIRTON, 1977; HOLM et al., 1979, WINDER e HARLEY,

1983). As áreas invadidas por *L. camara* tornam-se um ambiente favorável para o desenvolvimento de pragas e doenças, animais nocivos, como porcos selvagens e a mosca tsé-tsé (PARSONS e CUTHBERTSON, 1992; MORTON, 1994). Além de invadir outros ambientes é a espécie mais prejudicial ao equilíbrio de florestas úmidas tropicais e subtropicais (FENSHAM et al., 1994).

Comparando plantas da espécie *L. camara* no Brasil e na Austrália, WINDER e HARLEY (1982), observaram que enquanto no Brasil havia uma menor variabilidade entre as plantas representada por oito taxa, na Austrália o este número chegava a 29, sendo nove deles altamente invasores. No Brasil, as plantas ocorriam de forma dispersa ou em pequenas moitas, em beiras de estradas e clareiras nas florestas, a altura das plantas adultas era de um a dois metros e observava-se o ataque de um complexo de insetos e patógenos durante todo o ano. Já na Austrália, as plantas ocorriam tanto em pequenas moitas quanto em maciços espinhentos impenetráveis cobrindo muitos hectares, as plantas adultas tinham altura de até oito metros e não eram atacadas por patógenos e insetos nativos. Apesar da divisão em taxa basear-se principalmente na cor das flores das cerca de 650 cultivares encontradas (SWARBRICK et al., 1995; MUNIR, 1996), não há correlação entre cores de flores e cultivar, baseados em análises de DNA (SCOTT et al., 1997).

O controle mecânico, através da capina manual, assim como o controle químico, embora possam ser efetivos em curto prazo, são onerosos, de difícil execução e impraticáveis em diversas situações (BARTHOLOMEW, 1978; DENTON et al, 1991b; TURNER, 1992; TRUJILLO e NORMAN, 1995; DAY et al., 1998; HANNAN-JONES, 1998).

O controle biológico foi reconhecido há cerca de um século como a estratégia mais viável para o controle de lantana (STIRTON, 1980; LAMP e COLLET, 1989; KISSMANN e GROTH, 1991; LORENZI, 1991, AULD e MEDD, 1992; GLADDING, 1995; HENDERSON, 1995; SWARBRICK et al., 1995). O primeiro programa de controle biológico direcionado para *L. camara* foi realizado em 1902, quando insetos coletados no México, foram

liberados no Havaí, por Perkins e Koebele (HARLEY, 1971). Desde então, foram realizados diversos levantamentos e 48 espécies de insetos tem sido liberadas em mais de 30 países, com resultados variáveis (WINDER e HARLEY, 1983; SEN SARMA e MISHRA, 1986; WATERHOUSE e NORRIS, 1987; TAYLOR, 1989; NESER e CILLIERS, 1990; PALMER e PULLEN, 1995; BROUGHTON, 2000; PALMER et al., 2000). Apesar de exemplos bem sucedidos do controle de plantas daninhas com fungos fitopatogênicos (OEHRENS, 1977; BRUZZESE e FIELD, 1984; EVANS et al., 1995), a possibilidade da utilização destes organismos como agentes de biocontrole de *L. camara* foi considerada apenas a partir de 1987, quando baseado no exame do material depositado no Herbário do IMI - International Mycological Institute, EVANS (1987a) considerou o potencial de diversos dentre os fungos ali depositados, como sendo muito promissor.

Desde 1988 levantamentos sistemáticos de fungos fitopatogênicos associados a *L. camara* no Brasil tem sido realizados (BARRETO, 1991, BARRETO et al., 1995; PEREIRA, 1997). Cerca de 55 espécies de fungos fitopatogênicos associados à *L. camara* foram relatadas a nível mundial e até a realização dos levantamentos, apenas nove espécies haviam sido registradas no Brasil (BARRETO et al., 1995). Os levantamentos realizados por BARRETO et al.(1995) e PEREIRA (1997), adicionaram mais 11 espécies à microbiota nacional associada à planta daninha, e tem chamado a atenção para o potencial de vários destes fungos como possíveis agentes de biocontrole. Das espécies fúngicas associadas a *L. camara* encontradas nos levantamentos, sistemáticos e complementares, as seguintes foram selecionadas e testadas ao menos preliminarmente: *Ceratobasidium lantanae-camarae* H. C. Evans, R. W. Barreto e C.A. Ellison; *Corynespora cassiicola* (Berk. e Curt.) Wei; *Dendryphiella aspera* R. W. Barreto e J. C. David; *Mycovellosiella lantanae* (Chupp) Deighton; *Mycovellosiella lantaniphila* Crous e Morris; *Phomopsis lantanae* (Costa e Camara) Sutton; *Phomopsis lantanae-glutinosae* J.M. Pereira e R.W. Barreto; *Prospodium tuberculatum* (Speg.) Arthur e *Puccinia lantanae* Farl. Na África do Sul, estudos desenvolvidos visando avaliar o

potencial de *M. lantanae* var. *lantanae* tem demonstrado ser este patógeno bastante promissor para o controle biológico da planta daninha naquele país (DEN BREEËN et al., 1999; MORRIS et al., 1999). No CABI Bioscience, além de trabalhos preliminares com *P. tuberculatum* e *C. lantanae*, destacam-se os bons resultados alcançados em estudos com um isolado de *Puccinia lantanae* procedente do Peru (THOMAS e ELLISON, 1999). No presente trabalho, dentre os fitopatógenos selecionados, foram escolhidos para serem objetos de estudos visando o controle biológico de *L. camara*: *Prospodium tuberculatum* e *Corynespora cassiicola*.

Os objetivos deste trabalho foram buscar ampliar o entendimento do patossistema *L. camara* x *P. tuberculatum*; elucidar o ciclo de vida de *P. tuberculatum*; caracterizar um isolado de *C. cassiicola* obtido de *L. camara* e avaliar o potencial deste isolado para o biocontrole da planta daninha.

CAPÍTULO 1

ESCLARECIMENTO DO CICLO DE VIDA DE *Prospodium tuberculatum*

1. INTRODUÇÃO

Os fungos da ordem Uredinales tem sido reconhecidos nas últimas décadas como relevantes para o controle biológico de plantas invasoras. Dos patógenos liberados para o controle biológico de plantas daninhas, cerca de 60% são causadores de ferrugens (JULIEN, 1992). Esses fitopatógenos tem sido os organismos preferenciais quando se adota o método clássico de biocontrole, principalmente por serem patógenos amplamente reconhecidos como específicos em relação a seus hospedeiros e sua introdução ser considerada, em geral, como de baixo risco para as plantas nativas e cultivadas, por técnicos de órgãos responsáveis por quarentena vegetal de diversos países (PEREIRA, 1997). A Austrália é um dos países que estão na vanguarda da utilização deste método de controle, estimulando programas desde a década de 70, a partir da introdução de *Puccinia chondrillina* Bubak e Syd. no controle da invasora de culturas de trigo, *Chondrilla juncea* L. (CULLEN et al., 1973).

Prospodium é um gênero de fungos causadores de ferrugem que ocorre associado a plantas das famílias Bignoniaceae e Verbenaceae, em regiões tropicais e subtropicais do Continente Americano (CUMMINS, 1940; CUMMINS e HIRATSUKA, 1983). Dentre as espécies deste gênero, *Prospodium tuberculatum*, que causa ferrugem apenas em plantas do gênero *Lantana*, tem sido considerada por vários autores como bastante promissora para o controle biológico clássico de *L. camara* (BARRETO et al., 1995;

PEREIRA, 1997; ELLISON e THOMAS, 1998; THOMAS e ELLISON, 1999).

Prospodium tuberculatum é supostamente uma ferrugem autoécia como a maioria das espécies pertencentes ao gênero, mas para ela não foram ainda relatados os estádios de pécnio e écio (CUMMINS e HIRATSUKA, 1983). Os estudos preliminares mostraram que este patógeno infecta as folhas baixas das plantas pela via estomatal, possuindo um período de incubação entre 14 e 18 dias, dependendo da concentração de inóculo, resultando em clorose da área afetada e subsequente erupção de pústulas ou mesmo necrose da área inoculada e queda da folha (ELLISON, 1996). O período de latência é em geral de 23 dias (PEREIRA, 1997), e as pústulas continuam a produzir esporos viáveis por 48 dias (ELLISON, 1996). Observações de campo tem indicado que a produção de teliosporos parece estar associada a altitudes mais elevadas, períodos frios e temperaturas noturnas baixas.

De acordo com ELLISON (1996), a faixa de temperatura e umidade ótimas condicionais para o patógeno em questão é de 20°C e 13 a 15 horas de molhamento foliar. Entretanto, a infecção pode ocorrer após um período mínimo de nove horas de molhamento foliar e a uma temperatura mínima de 15°C e máxima de 25°C.

Este fungo tem mostrado alta especificidade. Após uma série de inoculações usando-se esporos de populações do fungo de diversas procedências, sobre biótipos de *L. camara* provenientes de locais diversificados, incluindo regiões selecionadas onde ocorrem invasões biológicas por lantana, como Austrália e Madagascar, apenas material de duas procedências [Alto da Boa Vista - RJ (ABV) e São Miguel do Anta - MG (SMA)] foram patogênicos respectivamente aos biótipos de *L. camara* australiano de flores rosadas e o procedente de SMA (PEREIRA, 1997). Observou-se também que o isolado ABV foi patogênico somente ao biótipo australiano de *L. camara* de flores rosadas, analogamente ao obtido por ELLISON (1996) em inoculações com isolados do patógeno de diversas procedências (Brasil, Equador e México) em biótipos de *L. camara* da

Austrália, Brasil, Madagascar, Índia, Havaí, Bolívia, Sri-Lanka e Grécia. Apesar desta especificidade por hospedeiro apresentada pelo patógeno em sua fase uredinial, o fato de não se conhecer com detalhes as fases do seu ciclo de vida representavam um obstáculo para seu uso no controle biológico. A compreensão do seu ciclo de vida atenderia a uma necessidade de preencher lacunas sobre o conhecimento da biologia de *P. tuberculatum* e geraria informações para embasar a defesa de liberação do patógeno na Austrália, junto ao Serviço de Inspeção e Quarentena Australiana. Um programa bem sucedido de controle biológico, levado a termo naquele país, poderia resultar em um efeito multiplicador, como tem ocorrido em outros programas (CULLEN et al., 1973; BRUZESSE e FIELD, 1984), considerando-se a relevância da planta alvo e a tradição australiana nesta categoria de controle.

São várias as técnicas que tem sido utilizadas na elucidação do ciclo de vida de fungos causadores de ferrugens. Alguns pesquisadores conseguiram descrever o ciclo de vida de patógenos pela observação a campo e inoculações controladas no hospedeiro (De Barry, 1865, citado por AINSWORTH, 1976, FERREIRA e HENNEN, 1986). Um outro método citado por HENNEN e FIGUEIREDO (1984) baseou-se na inoculação de diversas espécies vegetais relacionadas ou não com a planta hospedeira. Alguns métodos envolvem a indução de germinação de teliosporos para possibilitar a formação de basidiosporos e posterior inoculação. Esta indução pode ser feita utilizando-se temperaturas baixas (HASAN e WAPSHERE, 1973; FIGUEIREDO et al., 1987; SHTIENBERG e VINTAL, 1995); lavagens dos teliosporos (FIGUEIREDO et al., 1994) e escarificação com produtos químicos (EVANS, 1987b). Um outro processo consiste do uso de temperaturas baixas para a produção de pécnio e eciosporos (ADAMS e LINE, 1984). Estudos citológicos da germinação de teliosporos foram realizados para o esclarecimento do ciclo de vida de algumas outras espécies (HENNEN e FIGUEIREDO, 1984; EVANS, 1993).

No presente trabalho foram realizados estudos para aprofundar o entendimento do patossistema *L. camara* x *P. tuberculatum* e elucidar-se o ciclo de vida do patógeno.

A principal hipótese testada por este trabalho foi a de que *P. tuberculatum* seria uma ferrugem autoécia e macrocíclica. Uma hipótese secundária foi baseada em observações feitas durante os estudos no campo, os quais sugeriram que a ocorrência simultânea de *P. tuberculatum* e *Aecidium lantanae* Mayor, no qual apenas o estágio de écio é relatado, às vezes sobre uma mesma folha (BARRETO et al., 1995), representasse uma evidência de que *A. lantanae* pertenceria à holomorfa *P. tuberculatum*.

Nos experimentos realizados pretendeu-se testar alguns dos métodos citados e outros adicionais visando elucidar o ciclo de vida de *P. tuberculatum* pela: a) observação no campo das ocorrências de diferentes estádios do ciclo de vida do fungo; b) inoculações controladas; c) promoção da germinação dos teliosporos; d) inoculações controladas com basidiosporos; e) estudo da conexão entre *A. lantanae* e *P. tuberculatum*; f) estudos citológicos da germinação de teliosporos.

2- MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram realizados nos laboratórios de Micologia, Departamento de Fitopatologia- UFV; de Patologia Florestal e Genética da Interação Planta-Patógeno, BIOAGRO, UFV; de Micologia e de Controle Biológico de Plantas Daninhas, CABI Bioscience, unidade Ascot, Inglaterra e de Bioquímica, CABI Bioscience, unidade Egham.

Na maioria dos ensaios envolvendo inoculação, utilizou-se plantas saudáveis de lantana SMA, tendo em torno de 20 cm de altura, plantadas em vasos plásticos com volume de um litro de substrato. Folhas saudáveis e previamente marcadas de forma aleatória foram inoculadas com uredosporos de *P. tuberculatum* de SMA, diluídos em talco industrial na proporção de 1:50 (PEREIRA, 1997), utilizando-se um pincel com cerdas macias. Após a inoculação, as plantas eram mantidas por 48 horas, em câmara de nevoeiro, a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, e posteriormente conduzidas à casa-de-vegetação.

O delineamento utilizado em todos os experimentos foi o inteiramente casualizado (DIC).

2.1. Observações no campo

Foram realizadas visitas sistemáticas ao campo, especialmente em São Miguel do Anta (MG) e Frade (RJ), durante os anos de 1997 a 2000, a fim de se observar a ocorrência natural de *P. tuberculatum* em *L. camara*. A partir de setembro de 2000, foram também visitadas localidades adicionais nas cidades de Viçosa (MG), São Paulo (SP) e Curitiba (PR) objetivando-se encontrar o estágio teliospórico de *P. tuberculatum*.

A parte aérea das plantas localizadas foi examinada e as folhas com sinais da doença foram coletadas e acondicionadas em envelopes de papel, identificando-se a localidade e data de coleta. O material fúngico amostrado foi levado para o laboratório de Micologia, DFP/UFV onde foi submetido a

exames macro e microscópicos, a fim de serem identificados os estádios do ciclo de vida presentes na amostra, retirada de esporos para inoculação e armazenamento e/ou herborização.

2.2. Inoculações controladas

2.2.1. Efeito da luz na esporulação de *Prospodium tuberculatum*

Um ensaio foi montado para se observar a influência do escuro na esporulação uredioniospórica de *P. tuberculatum*. Seis plantas de lantana provenientes de SMA foram inoculadas com uredosporos de *P. tuberculatum*. Após a inoculação, três plantas foram mantidas sob condições de câmara de nevoeiro, no escuro, enquanto outras três plantas foram mantidas em condições similares, sob fotoperíodo de 16 horas. Após este período, as plantas foram transferidas para casa-de-vegetação, onde foram observadas diariamente. Aos 23 dias da inoculação, as plantas foram comparadas visualmente com relação à intensidade da doença.

2.2.2. Produção de teliosporos

Observou-se em condições de campo, na região de SMA, que plantas de *L. camara* apresentando uredosporos de *P. tuberculatum* durante o período de primavera-verão, formaram o estágio telial durante o período de outono-inverno, e que geralmente esta produção era precedida por um período de pelo menos 15 dias de temperatura baixa. De posse dos dados climatológicos de dois anos (1996 e 1997), da região de Viçosa, obtidos no Laboratório de Meteorologia do Departamento de Engenharia Agrícola- UFV, observou-se que os dias mais frios do período que antecedeu à observação de teliosporos em SMA tiveram temperaturas entre 7 e 18°C. Simulou-se o efeito de temperaturas baixas em dois experimentos, a fim de se tentar induzir a produção de teliosporos pelo patógeno.

No primeiro ensaio, em janeiro de 1998, seis plantas de lantana biótipo SMA, tiveram três folhas inoculadas com *P. tuberculatum* como descrito anteriormente. Após o período de latência, as seis plantas foram sujeitas durante 20 dias aos seguintes tratamentos: a) duas plantas foram mantidas a 10°C por 24 horas, em câmara de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas. b) duas plantas foram mantidas a 18°C por 16 horas e 8°C por 8 horas, em câmara de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas. c) duas plantas foram mantidas sob condições de casa-de-vegetação, como controle. As plantas foram observadas diariamente e após o período de 20 dias foram transferidas para casa-de-vegetação, onde permaneceram por mais 60 dias.

Em um segundo experimento, em junho de 1998, quatro plantas de lantana inoculadas com *P. tuberculatum* e exibindo esporulação uredinial nas três folhas inoculadas, foram sujeitas a um choque térmico, sendo deixadas a 0°C em câmara fria por períodos de duas horas durante dois dias consecutivos. Depois disto, duas das plantas foram mantidas sob condições de casa-de-vegetação e outras duas mantidas fora da casa-de-vegetação, sob condições de campo, sujeitas a temperaturas amenas durante o dia e frias durante a noite. As plantas foram observadas diariamente por um período de 60 dias, a fim de se detectar formação de teliosporos.

2.3. Germinação de teliosporos

Para se tentar quebrar a dormência dos teliosporos foram testados os métodos químicos e físicos descritos a seguir.

2.3.1. Escarificação com produtos químicos

Os produtos químicos escolhidos para a escarificação dos teliosporos, assim como as diluições desses foram baseados na metodologia relatada por EVANS (1987b). Os tratamentos foram os seguintes: a- hipoclorito de sódio (NaOCl) a 10%; b- NaOCl a 5%; c- peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 20

volumes; d- H₂O₂ a 10 volumes; e- água destilada, utilizada como controle. Grupos de fragmentos de 1 cm² de folhas de lantana SMA e contendo teliosporos foram mergulhados por um minuto na solução química, correspondente ao tratamento, e o excesso da solução removida com água destilada. Após a retirada do excesso da solução, dois fragmentos de folha foram afixados na parte superior interna de cada placa de Petri, previamente pincelada com vaselina líquida. Cada placa de Petri, constituiu uma repetição e continha meio água destilada-ágar (ADA) na sua parte inferior, visando fornecer umidade suficiente para possibilitar a ejeção dos basidiosporos. Cada tratamento teve três repetições e as placas foram mantidas sob temperatura ambiente (entre 22 e 25°C) e foram observadas após 6, 12, 24, 36, 48, 72 e 96 horas.

2.3.2. Temperatura ótima para germinação de teliosporos

Foram realizados dois testes para se determinar a temperatura ótima para a germinação de teliosporos.

Num teste preliminar foram avaliadas sete temperaturas: 10, 15, 20 25, 30, 35°C e temperatura ambiente (22-24°C), cada uma representando um tratamento. Foram preparadas placas de Petri com meio ADA e cada repetição foi constituída de quatro gotas de uma suspensão de teliosporos em água destilada, depositadas sobre a superfície da placa. As placas contendo os teliosporos, foram mantidas em diferentes incubadoras ajustadas às temperaturas a serem testadas, e o experimento foi montado com três repetições para cada tratamento. Foram feitas observações sob microscópio ótico após 6, 12, 24 e 36 horas, verificando-se em que temperatura e período de tempo ocorreu a germinação de pelo menos um teliosporo em todas as repetições do tratamento.

Como o teste preliminar demonstrou que os teliosporos germinaram após 24 horas de incubação sob condições de alta umidade a 15 e 20°C, outro experimento foi montado. Neste, procurou-se determinar a temperatura ótima

para germinação de teliosporos e também para a ejeção de basidiosporos. Os tratamentos foram definidos por cinco diferentes temperaturas: 10, 15, 16, 19 e 22°C. Cada repetição foi constituída de dois fragmentos de folhas de lantana SMA de 1 cm², contendo teliosporos, que foram fixados na parte superior interna de uma placa de Petri, preparada com vaselina líquida. Na superfície inferior de cada placa de Petri, com meio ADA, foi depositada uma lâmina de microscopia contendo duas gotas de água destilada estéril, posicionada abaixo dos fragmento foliares. Cada tratamento foi conduzido em três repetições e as observações sob microscópio ótico foram feitas após 6, 12, 15, 20 e 24 horas. A avaliação foi encerrada quando em todas as repetições de um tratamento havia pelo menos um teliosporo germinado e um basidiosporo ejetado.

2.4. Método e tempo de armazenamento na germinação de teliosporos

A ocorrência natural de teliosporos de *P. tuberculatum* nas áreas mais visitadas foi bastante rara. Nas coletas realizadas por PEREIRA (1997), *P. tuberculatum* foi encontrado em 27 ocasiões, porém em todas elas apenas uredosporos foram detectados. Este tipo de esporo foi encontrado apenas a partir de observações sistemáticas realizadas a partir de 1997. Teliosporos foram encontrados inicialmente apenas durante o período de outono-inverno, caracterizado por temperaturas frias. Teliosporos mantidos a temperatura ambiente (20 a 25°C) permaneciam viáveis no máximo até 30 dias. Para viabilizar os trabalhos com teliosporos em outras épocas do ano, foram testados diferentes métodos de armazenagem destes esporos. A escolha dos métodos foi baseada nas diferentes técnicas empregadas por ELLISON (1996) e ZAMBOLIM e CHAVES (1974). Foram testados então dois métodos:

O primeiro método consistiu em transferir teliosporos frescos provenientes de SMA para uma ampola de vidro, com capacidade para 5,0 mL, tampada com algodão e embrulhada em papel alumínio. A ampola foi acondicionada em um dessecador, o qual foi mantido em refrigerador a 5°C.

O segundo método consistiu em transferir os teliosporos para um microtubo (2,0 mL), o qual foi submetido a congelamento em nitrogênio líquido. Após o congelamento, o microtubo foi armazenado em freezer a -80°C.

Em ambos processos, a germinação dos esporos foi avaliada antes da armazenagem e após 30, 60 e 90 dias, pela retirada de uma alíquota, em torno de 50 mg de teliosporos, os quais foram colocados em placa de Petri com meio ADA, cobertos com uma gota de água destilada esterilizada e mantidos por 48 horas a 15°C. Ao fim deste período, a porcentagem de germinação foi estimada.

2.5. Inoculação de *Lantana camara* com basidiosporos de *Prospodium tuberculatum*

Teliosporos de *P. tuberculatum* extraídos de folhas infectadas de *L. camara* SMA, armazenados em refrigerador a 5°C, por um mês (5% de germinação), foram utilizados em três diferentes ensaios realizados no quarentenário do CABI Bioscience, Inglaterra, utilizando-se os biótipos de lantana SMA e australiana de flores rosadas (“Common Pink”):

a) Teliosporos foram suspensos em água destilada estéril e esta suspensão foi depositada na superfície de placas de Petri contendo ADA, mantidas a 15°C por 48 horas. Após observação sob microscópio ótico, os blocos de ágar nos quais estavam presentes teliosporos germinados foram recortados. Estes blocos foram transferidos para as superfícies abaxial e adaxial de folhas de plantas de lantana, mantidas sob condições de casa-de-vegetação, sendo inoculadas três folhas em cada uma das três plantas de cada biótipo utilizadas.

b) Teliosporos foram suspensos em solução de Tween 80 a 0,05%, em água destilada estéril. Duas gotas desta suspensão foram depositadas em cada lado de uma área previamente marcada de três folhas selecionadas de lantana. As plantas foram mantidas por 48 horas em câmara úmida a 15°C e

posteriormente transferidas para casa-de-vegetação. Gotas da mesma suspensão foram depositadas em duas placas de Petri contendo ADA. Estas placas acompanharam as plantas em câmara úmida e casa-de-vegetação. As placas utilizadas foram examinadas 24 e 48 horas após a montagem do experimento para comprovar a ocorrência de germinação dos teliosporos. Este ensaio foi repetido por três vezes consecutivas.

c) Procurou-se induzir a ejeção de basidiosporos de *P. tuberculatum* utilizando-se dois métodos de inoculação. No primeiro, fragmentos de folhas de *L. camara* SMA, com teliosporos, foram colocados logo acima da parte aérea das plantas com o auxílio de uma tela plástica sustentada por arame. No segundo, os teliosporos foram suspensos em água destilada estéril e esta suspensão foi depositada na superfície de placas de Petri contendo ADA. As placas sem a tampa, foram então colocadas logo acima da parte aérea das plantas. Nos dois processos utilizaram-se três plantas de cada biótipo de *L. camara*. As plantas foram mantidas em câmara úmida a 15°C, e após 48 horas transferidas para casa-de-vegetação. Após 7 dias da inoculação foram retiradas amostras, constituindo a amostragem de uma folha logo abaixo da fonte de inóculo em cada uma das plantas inoculadas, as quais foram submetidas a uma técnica de coloração e clareamento (BRUZZESE e HASAN, 1983) e observadas sob microscópio ótico, a fim de se avaliar a ocorrência de esporos germinados sobre a superfície foliar e colonização do tecido foliar pelo patógeno.

2.6. Verificação da possível conexão entre *Aecidium lantanae* e *Prospodium tuberculatum*

2.6.1. Inoculações controladas

Plantas de *L. camara* procedentes do Frade- RJ foram inoculadas com suspensão em água destilada de eciosporos da mesma procedência. Foram inoculadas três folhas em três plantas, as quais foram mantidas sob câmara de

nevoeiro, nas condições descritas anteriormente (item 2), sendo posteriormente transferidas para casa-de-vegetação, e observadas diariamente por um período de 60 dias.

Teliosporos de *P. tuberculatum* também foram encontrados nesta mesma localidade em outra época do ano e foram inoculadas em plantas de *L. camara* da mesma procedência e dos biótipos SMA e australiana de flores rosada, conforme descrito no item 2. Após a transferência para a casa-de-vegetação as plantas foram observadas diariamente durante um período de 60 dias.

2.6.2. Estudos moleculares

Dentre os métodos que poderiam ser utilizados para se comprovar a conexão hipotetizada, resolveu-se testar pela primeira vez, pelo que se tem registro, com esta finalidade, uma técnica baseada em procedimentos moleculares. Foram usados primers ITS (“internal transcribed spacer”), já que de acordo com GARDES e BRUNS (1993), a região ITS (Figura 1), pode ser prontamente amplificada com primers universais, a partir de pequenas amostras de DNA, mesmo que este esteja diluído ou degradado, podendo ser altamente variável entre espécies fúngicas morfológicamente distintas, especialmente basidiomicetos e fungos causadores de ferrugem. A extração de DNA das amostras (Tabela 1) foi efetuada empregando-se três diferentes metodologias.

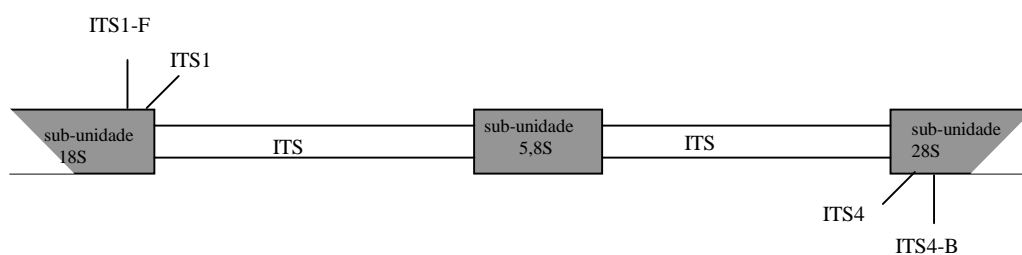


Figura 1- Representação da região ITS em uma unidade de DNA ribossomal de fungo e localização aproximada dos primers ITS1, ITS1-F, ITS4 e ITS4-B. (Adaptado de GARDES e BRUNS, 1993).

Tabela 1- Amostras selecionadas para comparação molecular baseada na amplificação da região ITS.

Amostra	Espécie	Fonte do DNA	Hospedeiro	Localidade
1	<i>Prospodium tuberculatum</i>	Uredosporos	<i>Lantana camara</i>	Frade- RJ
2	<i>P. tuberculatum</i>	Uredosporos	<i>L. camara</i>	Viçosa- MG
3	<i>P. tuberculatum</i>	Uredosporos	<i>L. camara</i>	Alto da Boa Vista-RJ
4	<i>P. tuberculatum</i>	Uredosporos	<i>L. camara</i>	São Miguel do Anta- MG
5	<i>P. tuberculatum</i>	Teliosporos	<i>L. camara</i>	São Miguel do Anta- MG
6	<i>Lantana camara</i>	Folhas	<i>L. camara</i>	Frade- RJ
7	<i>Aecidium lantanae</i>	Eciosporos	<i>L. camara</i>	Frade- RJ
8	<i>A. lantanae</i>	Eciosporos	<i>Lantana</i> spp.	Nova Friburgo- RJ
9	<i>A. lantanae</i>	Eciosporos	<i>L. camara</i>	Bacaxá- RJ
10	<i>A. lantanae</i>	Eciosporos	<i>L. camara</i>	São Vicente de Paula- RJ
11	<i>Puccinia lantanae</i>	Teliosporos	<i>L. camara</i>	Peru (W1914- CABI)
12	<i>Puccinia psidii</i>	Uredosporos	<i>Eugenia jambos</i>	Viçosa- MG
13	<i>P. psidii</i>	Uredosporos	<i>Eucalyptus grandis</i>	Viçosa- MG
14	<i>P. abrupta</i>	Uredosporos	<i>Parthenium hysterophorus</i>	México (W1905- CABI)
15	<i>Rhizoctonia solani</i>	Micélio	<i>E. grandis</i>	Viçosa- MG
16	<i>A. lantanae</i>	Eciosporos	<i>L. camara</i>	México (W1941- CABI)

Na primeira técnica utilizada, uredosporos coletados no campo tiveram o DNA extraído com metodologia baseada em YON et al. (1991) e FALEIRO (1997) e que consistiu no seguinte: Entre 25 a 50 mg de esporos de cada espécie de ferrugem foram colocados em microtubos (2,0 mL) e macerados com auxílio de um pistilo de plástico previamente congelado após o contato com nitrogênio líquido. Foi adicionado em cada microtubo, 0,75 mL de tampão de extração constituído de 50 mM de Tris-HCL, pH 7,2; 50 mM de EDTA, 3% de dodecil sulfato de sódio e 1% de β -mercaptoetanol. Os microtubos foram misturados por inversão e mantidos em banho-maria por 45 minutos, a uma temperatura de 65°C, sendo agitados suavemente a cada 10

minutos. As amostras foram centrifugadas a 12000 g por sete minutos, transferindo-se o sobrenadante para um novo microtubo. Foi adicionado em cada microtubo 50 µg/mL de Proteinase K (do estoque de 20 mg/mL), seguida de incubação a 37°C por um período de 60 minutos. Foi adicionado fenol nos microtubos a um volume de 1:1. Os tubos foram agitados suavemente e centrifugados por 4 minutos a 5000 g. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. Após adicionar um volume de 1:1 da mistura clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), o complexo foi agitado suavemente e centrifugado por 5 minutos a 5000 g e o sobrenadante foi coletado em um novo tubo. Uma solução de precipitação do DNA (1/10 do volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e 2/3 de isopropanol gelado) foi adicionada ao sobrenadante final sendo mantido por uma hora a uma temperatura de -20°C. Após centrifugação a 12000 g por sete minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70% (v/v) e uma vez com etanol 100% (v/v). O precipitado foi seco à temperatura ambiente e ressuspenso em 50 µL de tampão TE (Tris-HCl 10mM, pH 7,4 e EDTA 1mM), tratado com RNase na concentração final de 50µg/mL e incubado por uma hora a 37°C. Após este período, o DNA foi novamente precipitado e centrifugado como descrito acima e ressuspenso em 100 µL de TE. A concentração do DNA foi estimada por corrida eletroforética em gel de agarose a 2%, comparando-se com padrões conhecidos.

A segunda metodologia, baseada em FULTON et al. (1995) foi usada para extração de DNA de amostras de eciosporos, folhas de lantana e micélio fúngico, e obedeceu aos seguintes passos: Cerca de 50 mg do material (esporo, folha ou micélio) foi colocado em um microtubo (2 mL) e macerado na presença de 200 µL de tampão para micropreparação [25 mL de tampão de extração (0,35 M de Sorbitol; 0,1 M de Tris-Base e 5 mM de EDTA-Na₂); 25 ml de tampão para lise nuclear (0,2 M de Tris; 0,05 de EDTA-Na₂; 2 M de cloreto de sódio e 2% CTAB); 10 mL de sarcosil 5% e 0,1 g de bissulfito de sódio]. Foi adicionado ao macerado 550 µL de tampão de micropreparação. Os

microtubos foram deixados em banho-maria a 65°C por 60 minutos. Adicionou-se a cada microtubo 700 µL da mistura clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), e misturou-se vigorosamente. As amostras foram centrifugadas a 10000 g por cinco minutos. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para novos microtubos, sendo adicionado a cada uma delas um volume de isopropanol gelado. Após mistura até observação de precipitação, as amostras foram centrifugadas a 10000g durante cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol a 70% (v/v) por duas vezes. O precipitado foi seco à temperatura ambiente e ressuspenso em 50 µL de tampão TE, tratado com RNase na concentração final de 50µg/mL e incubado por uma hora a 37°C. Após este período, o DNA foi novamente precipitado e centrifugado e ressuspenso em 100 µL de TE. A concentração do DNA foi estimada por corrida eletroforética em gel de agarose a 2%, comparando-se com padrões conhecidos..

Para extração de DNA fúngico (eciosporos, uredosporos e teliosporos) de material foliar herborizado e de folhas infectadas mantidas nas casas de vegetação do CABI Bioscience uma metodologia baseada em CUBERO et al. (1999) foi utilizada: Aproximadamente 50 mg do material (fragmentos foliares contendo estruturas fúngicas) foi colocado em microtubos (2,0 mL) e macerado após o contato direto com nitrogênio líquido. Foi adicionado ao material macerado 0,5 mL do tampão de extração (1% CTAB; 1 M de cloreto de sódio; 100 mM de Tris; 20 mM de EDTA e 1% de polipirrolidona de polivinil- PVPP) e misturado vigorosamente por inversão. As amostras foram colocadas em banho-maria a 70°C por 30 minutos. Adicionou-se a cada microtubo um volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), misturando-se cada um deles por inversão. As amostras foram centrifugadas a 1000 g durante cinco minutos. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para um novo microtubo, ao qual foi adicionado dois volumes do tampão de precipitação (1% de CTAB, 50 mM de Tris-HCl, 10 mM de EDTA e 40 mM de cloreto de sódio). Após serem misturados por inversão durante dois minutos os

microtubos foram centrifugados a 13000g durante 15 minutos. O sobrenadante de cada amostra foi descartado e ao precipitado foi adicionado 350 µL de 1,2 M de cloreto de sódio e um volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Após misturados vigorosamente os microtubos foram centrifugados a 10000 g durante cinco minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo ao qual foi adicionado 0,6 volume de isopropanol gelado. Após ser misturado por inversão cada amostra foi mantida por um período de 15 minutos a uma temperatura de -20°C. As amostras foram centrifugadas a 13000 g, a 4°C durante 20 minutos. O sobrenadante de cada amostra foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 70% (v/v). O precipitado foi submetido à secagem a uma temperatura de 50°C e posteriormente ressuspendido em 10 µL de TE. A concentração do DNA foi estimada por corrida eletroforética em gel de agarose a 2%, comparando-se com padrões conhecidos.

Para amplificação de DNA, dois processos distintos foram utilizados. Numa primeira parte do trabalho realizada no Brasil, a seguinte metodologia foi empregada. O DNA das amostras foi diluído em água estéril totalizando uma alíquota de 38 µl as quais foram combinadas com a mistura para PCR contendo: 5 µL de tampão 10X, 1.5 mM MgCl₂, 4 µL d-nucleotídeos, 1 µL (solução de trabalho de 10µM) de cada um dos primers ITS1-F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA- 3'; GARDES & BRUNS, 1993) e ITS4-B (5'- CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG- 3'; GARDES & BRUNS, 1993) e 1µL da enzima *Taq* DNA polimerase. Os passos para amplificação, utilizando termociclador, foram constituídos por 35 ciclos de denaturação, anelamento e extensão. A temperatura e tempo para os primeiros 13 ciclos foi 95°C por 35s, 55°C por 55s e 17°C por 45s. Entre os ciclos 14 a 26 o tempo de extensão foi de 120s e entre os ciclos 27 a 35 de 180s. Após estes ciclos serem completos as amostras foram submetidas a 72°C por 180s e mantidas a 4°C. As amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,5% e submetidas a eletroforese em tampão Tris brometo EDTA- TBE (FERREIRA e GRATTAPAGLIA,

1995), coradas com brometo de etídio e visualizadas sob luz ultravioleta, usando o sistema “Eagle Eye II” (Stratagene, La Jolla, CA, EUA).

No CABI Bioscience foram testados dois novos pares de primers após a verificação de que os primers anteriores não apresentavam repetitividade no padrão de amplificação. Utilizou-se inicialmente o par de primers ITS1-F e ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC- 3'; WHITE et al., 1990) e após concentração das amostras com cloreto de lítio 4 M, o par ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'; WHITE et al., 1990) e ITS4. As condições para a PCR foram: 3µL (2,5 mM) MgCl₂, 4 µl (0,4 mM) de cada um dos dNTP, 2,5 µL (0,2 µM) de cada primer, 0,2 unidades da enzima *Tth* DNA polimerase e seu tampão 10X, 1 a 5 ng de DNA em um volume final de 50 µL. Os parâmetros para a amplificação foram 35 ciclos de denaturação a 95°C por 60s, anelamento a 56°C por 45s e alongação a 72°C por 120s. Após estes ciclos estarem completos a amostras foram submetidas a 72°C por 10 minutos e mantidas a 5°C. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose em tampão Tris acetato EDTA- TAE (SAMBROOK et al., 1989), corados com brometo de etídio e visualizados sob luz UV com o programa “Ultraviolet Products Gel Documentation System, Image Store 5000, Version 7.01”.

2.7. Estudos citológicos

Para verificar a morfologia e estabilidade dos núcleos de basídias e basidiosporos de *P. tuberculatum* foi utilizada a técnica de coloração Giemsa-HCl (TANAKA et al., 1979). Teliosporos de *P. tuberculatum*, armazenados a 5°C (5% de germinação), foram colocados sobre uma gota de água em lamínulas mantidas dentro de uma placa de Petri contendo ADA e incubadas a 15°C por 48 horas. As lamínulas foram retiradas das placas e colocadas para secar ao ar sobre a bancada do laboratório, sendo posteriormente submetidas à técnica descrita por JOHNSTON e BOOTH (1983), com algumas

modificações: As lamínulas, contendo os esporos, foram colocadas dentro de uma placa de Petri contendo 20 mL de solução de fixação (3 partes de álcool etílico absoluto + 1 parte de ácido acético glacial) por 12 minutos. Após serem lavadas em álcool etílico 95%, as lamínulas foram transferidas para placas de Petri contendo 20 mL de álcool etílico 70% permanecendo por 30 minutos. Os esporos foram lavados em água destilada. As lamínulas, com esporos, foram imersas em ácido clorídrico 1 N por 5 minutos a temperatura ambiente e posteriormente imersas em ácido clorídrico 1N a 60°C por 7 minutos. Após serem lavadas cinco vezes com água destilada as lamínulas foram imersas em 20 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 por 5 minutos. As lamínulas, com os esporos, foram colocadas em placa de Petri com 20 mL de solução de coloração preparada com uma parte de solução Geimsa comercial (“Gurr’s Improved R66/ BDH Limited Poole England”) e 15 partes de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, permanecendo na solução por 90 minutos e lavadas em tampão fosfato seguido de água destilada. As lamínulas foram secas ao ar e montadas em euparal sendo observadas posteriormente sob microscópio ótico.

3- RESULTADOS

3.1. Observações no campo

Os resultados das visitas ao campo encontram-se sumarizadas na tabela 2. De modo geral, pode-se observar que uredosporos ocorreram durante todo o ano e eciosporos e teliosporos ocorreram durante a estação quente e fria, respectivamente. O comportamento de *P. tuberculatum* no ano 2000 foi diferente, observando-se uma virtual ausência de teliosporos na época esperada e a ocorrência, apesar de pequena, deste estádio no verão. A escassez de teliosporos ao longo de 2000 foi uma importante limitação para a execução dos estudos citológicos previstos.

3.2. Inoculações controladas

3.2.1. Efeito da luz na esporulação de *Prospodium. tuberculatum*

Vinte e três dias após a inoculação observou-se que as plantas mantidas no escuro mostraram esporulação bem mais abundante e com maior número de pústulas, sendo que nestas plantas houve esporulação em ambos os lados das folhas, o que não foi observado nas plantas mantidas sob fotoperíodo de 16 horas.

3.2.2. Produção de teliosporos

Não foi observada produção de teliosporos em qualquer dos tratamentos, porém as plantas sujeitas ao estresse térmico mostraram esporulação mais abundante e ocasional desfolha devido à severidade das lesões foliares.

Tabela 2- Observações da ocorrência natural de fungos causadores de ferrugem em *L. camara*.

DATA	FUNGO	LOCAL	OBSERVAÇÃO
15/06/97	<i>Prospodium tuberculatum</i>	São Miguel do Anta (SMA)	Teliosporos nas duas faces das folhas
24/06/97	<i>P. tuberculatum</i>	SMA	Abundância de teliosporos
22/08/97	<i>P. tuberculatum</i>	SMA	Uredosporos e teliosporos
12/12/97	<i>P. tuberculatum</i>	SMA	Apenas de uredosporos
12/03/98	<i>Aecidium lantanae</i>	Frade	Presença de eciosporos
25/03/98	<i>P. tuberculatum</i>	SMA	Uredosporos
27/04/98	<i>P. tuberculatum</i>	SMA	Uredosporos
12/06/98	<i>P. tuberculatum</i>	SMA	Uredosporos
28/06/98	<i>P. tuberculatum</i>	SMA	Uredosporos e teliosporos
14/07/98	<i>P. tuberculatum</i>	SMA	Teliosporos
17/07/98	<i>P. tuberculatum</i>	SMA	Teliosporos
24/07/98	<i>P. tuberculatum</i>	Frade	Uredosporos e teliosporos
21/08/98	<i>P. tuberculatum</i>	SMA	Uredosporos
24/11/98	<i>A. lantanae/ P. tuberculatum</i>	Frade/ SMA	Eciosporos e uredosporos
10/07/99	<i>P. tuberculatum</i>	SMA	Teliosporos
13/04/00	<i>P. tuberculatum</i>	SMA	Uredosporos
02/05/00	<i>P. tuberculatum</i>	SMA	Uredosporos
24/05/00	<i>P. tuberculatum</i>	SMA	Uredosporos
25/06/00	<i>P. tuberculatum</i>	SMA	Uredosporos
12/07/00	<i>P. tuberculatum</i>	SMA	Uredosporos
25/07/00	<i>P. tuberculatum</i>	SMA	Duas folhas com teliosporos
09/08/00	<i>P. tuberculatum</i>	SMA	Ausência de teliosporos
22/09/00	<i>P. tuberculatum</i>	Curitiba	Ausência de esporos
26/09/00	<i>P. tuberculatum</i>	São Paulo	Ausência de esporos
29/09/00	<i>P. tuberculatum</i>	SMA	Uredosporos
17/10/00	<i>P. tuberculatum</i>	Viçosa (Zootecnia/UFV)	Uredosporos
24/10/00	<i>P. tuberculatum</i>	Viçosa (Pomar/ UFV)	Teliosporos em uma folha
27/10/00	<i>P. tuberculatum</i>	SMA	Uredosporos
27/10/00	<i>P. tuberculatum</i>	Viçosa (Pomar/ UFV)	Apenas uredosporos

3.3. Germinação de teliosporos

Nos tratamentos com peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio, não houve germinação dos teliosporos durante o período de observação. Já nos dois experimentos em que se avaliaram a influência de diferentes temperaturas, a germinação dos teliosporos foi observada. No primeiro ensaio observou-se ocorrência de germinação após 24 horas, apenas a 15 e 20°C. No segundo ensaio, apenas após 24 horas, iniciou-se tanto a germinação dos teliosporos quanto a ejeção dos basidiosporos (Tabela 3). Segundo os

experimentos realizados, 15°C foi a melhor temperatura para germinação de teliosporos.

Tabela 3- Germinação de teliosporos e ejeção de basidiosporos de *Prospodium tuberculatum* em diferentes temperaturas.

TEMPERATURA (°C)	TELIOSPOROS			BASIDIOSPOROS		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
10	N	S	S	N	N	N
15	S	S	S	S	S	S
16	N	S	N	N	S	S
19	S	N	S	N	N	N
22	N	S	N	N	N	N

S= esporos germinados/ basidiosporos ejetados; N= esporos não germinados/ basidiosporos não ejetados

3.4. Método e tempo de armazenamento na germinação de teliosporos

Observou-se queda generalizada na germinação dos teliosporos do fungo independente do método utilizado. A germinação dos esporos frescos que variava entre 20 e 30%, após o armazenamento, em ambos os tratamentos utilizados, caiu para 5% após 30 dias, mantendo esta porcentagem até os 60 dias e atingindo apenas 1% aos 90 dias.

3.5. Inoculação de *Lantana camara* com basidiosporos de *Prospodium tuberculatum*

Embora tenha sido observada germinação dos teliosporos em todas as placas de Petri contendo ADA, não foi obtida infecção das plantas em nenhum dos ensaios, após 21 dias da inoculação. As amostras de folhas submetidas à

coloração e clareamento mostraram eventuais teliosporos em início de germinação sobre as folhas, porém não foram observados basidiosporos.

3.6. Conexão entre *Aecidium lantanae* e *Prospodium tuberculatum*

3.6.1. Inoculações controladas

Não foi observada produção de quaisquer sintomas, em nenhuma das plantas inoculadas, seja com eciosporos de *A. lantanae* ou com teliosporos de *P. tuberculatum*.

3.6.2. Estudos moleculares

Apesar do par de primers ITS1-F e ITS4-B permitir uma amplificação mais específica que os demais testados, já que foram observadas apenas bandas referentes aos fungos e não do material vegetal, os resultados não demonstraram ser repetitivos, e em numerosas reações amplificadas não foi possível visualizar bandas, que apareciam como um arraste, ou simplesmente ausência de bandas. Ao contrário, o par de primers ITS1 e ITS4 mesmo amplificando material vegetal, o qual foi facilmente reconhecido como distinto das bandas apresentadas pelo material fúngico, foi o mais indicado para o presente trabalho, pela repetitividade dos resultados.

Uma indicação clara de que amostras de uredosporos e teliosporo de *P. tuberculatum* são geneticamente diferentes de eciosporos de *A. lantanae* foi obtida a partir da visualização de bandas com diferentes tamanhos, situadas entre 506 e 1018 pares de bases (Figura 2). Uredosporos de *P. tuberculatum* apresentaram o mesmo tamanho de banda, assim como a amostra de teliosporo do mesmo fungo, independente do local de coleta, demonstrando tratar-se do mesmo fungo. Também as amostras referentes a *A. lantanae* procedentes de diversos locais, mostraram a similaridade genética desta espécie. O DNA

amplificado das amostras de *A. lantanae* apresentou o tamanho mais próximo de espécies do gênero *Puccinia* (Figura 3).

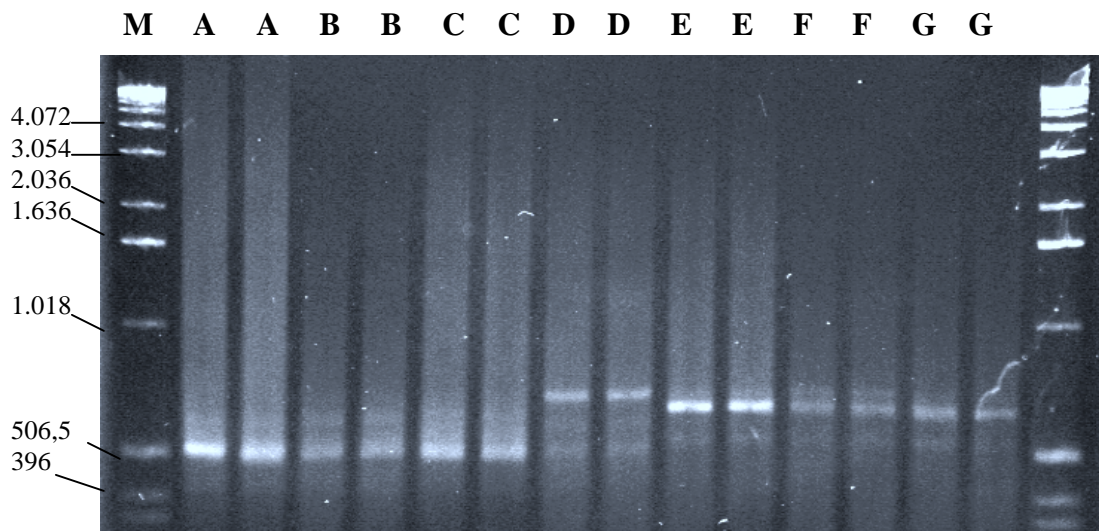


Figura 2- Amplificação da região ITS de diferentes espécies, utilizando-se o par de primers ITS1 e ITS4. M- Marcador Kb DNA, A- uredosporos de *Prosopodium tuberculatum*, Frade, RJ; B- uredosporos de *P. tuberculatum*, São Miguel do Anta, MG; C- teliosporos de *P. tuberculatum*, São Miguel do Anta, MG; D- folhas de *Lantana camara*; E- eciosporos de *Aecidium lantanae*, Frade, RJ; F- eciosporos de *A. lantanae*, Bacaxá, RJ; G- eciosporos de *A. lantanae*, São Vicente de Paula, RJ.

3.7. Estudos citológicos

Além da germinação dos esporos ter sido baixa, durante o processo de coloração, grande parte do material obtido foi perdido, devido à série de lavagens requeridas pelo processo. Não foi possível observar basidiosporos isolados, porém observaram-se metabasídias de teliosporos germinados. As metabasídias observadas continham zero, dois ou até 10 pequenos núcleos. O tamanho e a forma das basídias também foram bastante variáveis (Figura 4).

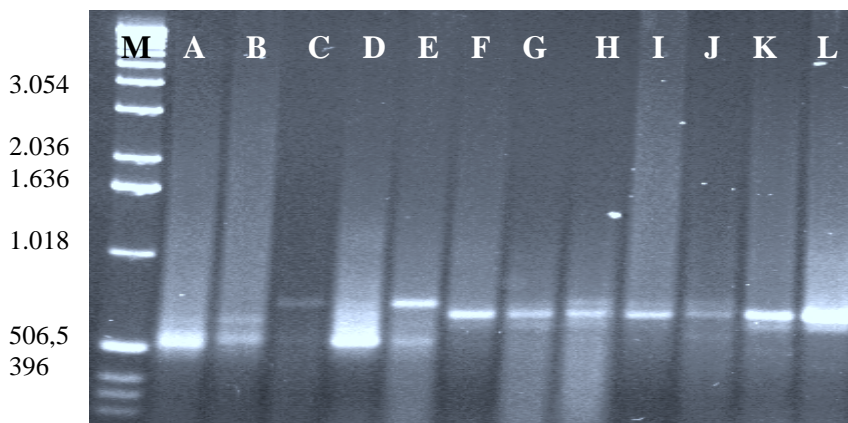


Figura 3- Amplificação da região ITS de diferentes espécies, utilizando-se o par de primers ITS1 e ITS4. M- Marcador Kb DNA, A- uredosporos de *Prospodium tuberculatum*, Frade, RJ; B- uredosporos de *P. tuberculatum*, Viçosa, MG; C- uredosporos de *P. tuberculatum*, Alto da Boa Vista, RJ (provavelmente contaminado com DNA da planta); D- teliosporos de *P. tuberculatum*, São Miguel do Anta, MG; E- folhas de *Lantana camara*; F- eciosporos de *Aecidium lantanae*, Frade, RJ; G- eciosporos de *A. lantanae*, Bacaxá, RJ; H- eciosporos de *A. lantanae*, São Vicente de Paula, RJ; I- eciosporos de *A. lantanae*, México; J- teliosporos de *Puccinia lantanae*, Peru; K- teliosporos de *Puccinia psidii*- jambolão, Viçosa, MG; L- teliosporos de *P. psidii*- eucalipto, Viçosa, MG.

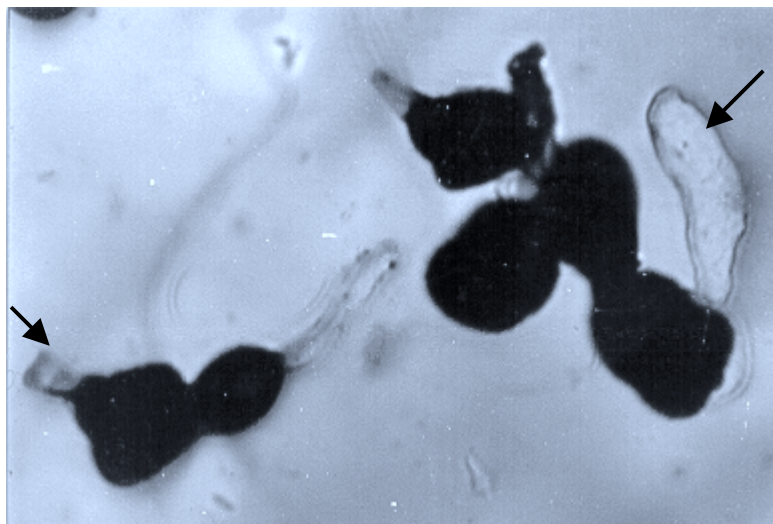


Figura 4- Metabasídias de *Prospodium tuberculatum* (indicadas por seta).

4- DISCUSSÃO

Vários dos métodos utilizados por outros pesquisadores na elucidação do ciclo de vida de ferrugens, foram estudados neste trabalho. As observações a campo realizadas por cerca de quatro anos, principalmente em São Miguel do Anta, Minas Gerais, onde *P. tuberculatum* é endêmico, permitiram constatar que apenas os estádios urediniais e teliais ocorrem naturalmente no campo. Como os sintomas e sinais da doença estão presentes em todas as estações do ano, as plantas mantiveram-se com baixo vigor vegetativo, especialmente em épocas secas e frias. O histórico da determinação da ferrugem do colmo do trigo causado por *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* Eriks. e Henn., baseou-se inicialmente na observação de fazendeiros e foi concluído com inoculações feitas por De Bary (AINSWORTH, 1976). No Brasil, um dos mais completos trabalhos realizados sobre a determinação do ciclo de vida de uma ferrugem, também foi baseado em observações e inoculações. Este trabalho realizado por REZENDE (1986), culminou com a descrição de uma nova espécie, *Prosopodium bicolor* Ferreira e Hennen (FERREIRA e HENNEN, 1986).

O insucesso das diversas inoculações visando a produção de teliosporos sob condições controladas, e a observação do estágio telial durante o período de verão, mostraram que para *P. tuberculatum*, apenas o ajuste de temperatura, luz e umidade não são suficientes para a produção deste estágio. Isto sugere a ação de outros componentes climatológicos ou algum fator ainda desconhecido interfira no desenvolvimento desta fase do ciclo de vida do patógeno em *L. camara*. De acordo com ADAMS e LINE (1984), a ocorrência de temperaturas baixas em condições naturais tem ajudado na determinação do ciclo de vida de fungos causadores de ferrugens, produzindo estádios até então não verificados. A observação a campo e coleta de *P. tuberculatum* nos limites de latitude e altitude de sua distribuição, é uma idéia que merece ser explorada em futuros trabalhos relacionados e este patógeno, já que teliosporos são facilmente

encontrados em regiões limítrofes como Oaxaca, no México e no estado do Rio Grande do Sul, no Brasil.

As inoculações em hospedeiros diversos, sugeridas por HENNEN e FIGUEIREDO (1983) para verificar se *P. tuberculatum* seria uma ferrugem heteroécia, foram realizadas por ELLISON (1996). Quarenta e uma espécies vegetais diferentes, incluindo biótipos de *L. camara*, foram inoculadas com cerca de 20 isolados do fungo procedentes de diversas partes do mundo. Estas inoculações revelaram uma alta especificidade da fase uredinial pelo hospedeiro. Apenas uredosporos foram produzidos nas interações compatíveis.

Supôs-se inicialmente que *A. lantanae* poderia ser o estágio ecídico de *P. tuberculatum*, da mesma forma que tais conexões tem sido estabelecidas para outras espécies, como, por exemplo, quando se comprovou que *Aecidium plucheae* P. Hennings e *Puccinia angustatoides* R. Stone correspondiam respectivamente aos estádios ecídico e telial de uma mesma espécie (SADLER et al., 1996). Foram testadas ferramentas moleculares para elucidar esta conexão, já que os marcadores moleculares criaram uma nova perspectiva para a ampliação do conhecimento genético das populações e uma das aplicações dos métodos moleculares em micologia tem sido útil para o estabelecimento de relações taxonômicas e filogenéticas entre os fungos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995). Os trabalhos utilizando primers ITS, que aqui representam o uso pioneiro desta técnica para o esclarecimento de uma potencial conexão entre diferentes estádios de ferrugens, puderam demonstrar que *A. lantanae* e *P. tuberculatum* não pertenciam à mesma espécie, rejeitando-se a hipótese inicial.

As evidências sugerem que *P. tuberculatum* seja uma ferrugem autoécia. Todas as espécies descritas no gênero, em torno de 58, são autoécias, sendo que 12 delas são microcíclicas; 19 são macrocíclicas, sendo a maioria (12) apresentando écio uredinóide e em 27 delas os estádios de écio e pínio são desconhecidos (ARTHUR, J.C., 1922; CUMMINS, 1940; SHUTTLEWORTH, 1953; FERREIRA e HENNEN, 1986; BAGYANARAYANA et al., 1998; BERNDT, 1998). Mesmo descrições mais

recentes de espécies do gênero *Prosopodium*, em países tropicais (BAGYANARAYANA et al., 1998; BERNDT, 1998), tem relatado a ausência dos estádios de de pício e écio. Para espécies nas quais todos os estádios (espermogonial, ecídico, uredinial e telial) ocorrem, como é o caso de *P. bicolor*, todas estas fases podem ser observadas no campo ao longo do ano (FERREIRA e HENNEN, 1986). Apesar da escassez de teliosporos, no campo, ter impossibilitado a adequada finalização dos estudos citológicos da germinação de teliosporos, estes sugeriram que como a condição nuclear da basídia era instável, os basidiosporos gerados poderiam ser inviáveis e desta forma, os uredosporos representariam o único estágio funcional no ciclo de vida desta espécie, a exemplo de outras ferrugens tropicais como *Maravalia cryptostegiae* (Cummins) Ono e *Hemileia vastatrix* Berk. e Br. (HENNEN e FIGUEIREDO, 1984; EVANS, 1993).

Há de se reconhecer algumas lacunas nos estudos que foram desenvolvidos. Será que a observação em locais onde os teliosporos de *P. tuberculatum* ocorrem com maior frequência poderia levar a constatação de outras fases no ciclo de vida do patógeno? A coloração dos núcleos dos basidiosporos comprovaria de sua instabilidade citológica? Seria possível utilizar de outros métodos para produzir teliosporos em laboratório? Convém lembrar que aspectos do ciclo de vida de *H. vastatrix*, uma das ferrugens mais estudadas no mundo, ainda permanecem obscuros.

Com relação ao controle biológico de plantas daninhas, há o exemplo de duas importantes e bem sucedidas introduções de fungos causadores de ferrugem na Austrália: *Puccinia abrupta* Diet. E Holw. var. *parthenicola* (Jackson) Parmelee para o controle de *Parthenium hysterophorus* L. e *Puccinia chondrillina* Bubak e Syd. para o controle de *Chondrilla juncea* L., dos quais não eram conhecidas fases do ciclo de vida à semelhança de *P. tuberculatum*. Como a região onde foi realizada a maioria dos estudos (Minas Gerais), é ecológica e climaticamente parecida com a área de possível liberação do fungo na Austrália, é provável que teliosporos não tenham um papel importante no ciclo de vida do patógeno, em seu novo habitat.

Por considerar que os benefícios do controle biológico de *L. camara*, uma das dez piores invasoras do mundo, suplantasse os riscos envolvidos na introdução de *P. tuberculatum*, para o qual tem-se indícios tão fortes quanto à sua especificidade, em fevereiro de 2001, as autoridades quarentenárias da Austrália, decidiram-se por autorizar a introdução deste organismo naquele país. Este será o primeiro registro de um patógeno oriundo do Brasil para o controle biológico clássico de uma planta invasora na Austrália.

5- RESUMO E CONCLUSÕES

O objetivo deste trabalho foi o de ampliar os conhecimentos sobre a interação entre *L. camara* e *P. tuberculatum* e sobre o ciclo de vida deste fungo.

Observações a campo num período de quatro anos mostraram que geralmente os estádios de *P. tuberculatum* ocorrem em épocas do ano diferentes: os teliosporos durante o outono-inverno e os uredosporos durante todo o ano. Eciosporos de *A. lantanae* ocorreram na primavera e no verão.

Plantas de lantana quando inoculadas com *P. tuberculatum* a 25°C e mantidas no escuro, apresentaram sintomas e sinais da doença mais intensos. A severidade da doença aumentou quando as plantas foram sujeitas artificialmente a baixa temperatura e choque térmico, apesar destes tratamentos não terem induzido à produção de teliosporos.

Peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio não promoveram a germinação de teliosporos e ejeção de basidiosporos, os quais foram obtidos quando o fungo foi sujeito a temperaturas específicas por determinado período. A condição ótima para germinação e produção de basidiosporos de *P. tuberculatum* foi 15°C de temperatura por período de pelo menos 24 horas. Além da baixa germinação, os teliosporos perderam sua viabilidade quando armazenados tanto a 5°C quanto à -80°C. A proporção de 20 a 30% de germinação inicial, caiu para apenas 1% aos 90 dias de armazenamento.

Plantas de lantana foram inoculadas com basidiosporos de *P. tuberculatum* empregando-se três diferentes processos: deposição de teliosporos germinados sobre blocos de agar, inoculação com suspensão de teliosporos e ejeção de basidiosporos. A infecção das plantas não foi obtida em quaisquer dos ensaios.

Após o insucesso de inoculações controladas, foram realizados estudos moleculares para se verificar a possível conexão entre as espécies *Aecidium lantanae* e *P. tuberculatum* utilizando-se diversos processos de extração e amplificação do DNA e pares de primers ITS. O par de primers mais indicado

para o trabalho foi ITS1 e ITS4 e obteve-se uma clara indicação de que *A. lantanae* e *P. tuberculatum* são geneticamente diferentes.

As basídias de *P. tuberculatum* observadas após técnica de coloração de núcleos apresentaram tamanho, forma e número de núcleos variáveis.

Com base nos trabalhos realizados e na informação disponível na literatura científica consultada, sugeriu-se que *P. tuberculatum* é uma ferrugem autoécia com ciclo de vida reduzido, podendo ser introduzida como agente do controle biológico clássico de *L. camara*. Sua introdução na Austrália está ora em andamento.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO DE *Corynespora cassiicola* OBTIDO DE *Lantana camara* E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL PARA O BIOCONTROLE

1- INTRODUÇÃO

Plantas de lantana com lesões foliares diferentes de outras observadas em levantamentos anteriores (BARRETO et al., 1995; PEREIRA, 1997), foram encontradas em Estância Betânia e Guaraguaçu, no estado do Paraná, causando severa desfolha nas plantas infectadas. O fungo foi identificado como *Corynespora cassiicola* (Berk. e Curt.) Wei, ainda não relatado em *L. camara* no Brasil. *Corynespora cassiicola* é um fungo mitospórico, que causa doença em folhas, caules, raízes e flores de plantas (SILVA et al., 1995), porém lesões foliares são os sintomas mais característicos das enfermidades causadas por este fungo.

A primeira planta coletada com sintomas de lesões foliares provocadas por este patógeno foi *Broussonetia papyrifera* (L.) V. R. P. Wunderlin, na década de 30 (POLLACK e STEVENSON, 1973). Atualmente a associação do fungo é reconhecida em mais de 70 hospedeiros em diversos países tropicais e subtropicais (SILVA et al., 1995). Como ataca este grande número de hospedeiros e está distribuída por todo o mundo é considerada por vários autores como uma espécie cosmopolita e inespecífica (ELLIS, 1971, POLLACK e STEVENSON, 1973, ONESIROSAN et al., 1974). No Brasil, *C. cassiicola* é um patógeno importante em culturas comerciais como soja (ALMEIDA & YAMASHITA, 1976), tomateiro (LEROY e LOURD, 1989), seringueira (GASPAROTO et al., 1988), cacau (DUARTE et al., 1978) e mamoeiro (DUARTE et al., 1983).

Apesar da aparente inespecificidade apresentada pelo fungo, alguns autores tem relatado a especificidade de isolados de *C. cassicola* a seus respectivos hospedeiros, e duas raças foram propostas para o fungo: raça 1 (caupi) e raça 2 (soja) (SPENCER e WALTERS, 1969; ONESIROSAN et al., 1974; DUARTE et al., 1983; SILVA et al., 1998). O reconhecimento destas categorias intra-específicas de *C. cassicola* como raças é inadequado, tendo em vista que populações de fungos fitopatogênicos semelhantes morfologicamente e separadas pela especialização fisiológica a nível de espécies ou gêneros distintos do hospedeiro são tratados como *formae specialis* (CAMARGO, 1995; HAWKSWORTH et al., 1995).

No controle biológico clássico de plantas daninhas com fungos fitopatogênicos, tem-se de modo geral utilizado organismos biotróficos, em especial membros da ordem Uredinales, como agentes do biocontrole, sendo os fungos hemibiotróficos e necrotróficos utilizados na estratégia de micoherbicida (TEBEEST et al., 1992; BOYETCHKO, 1997). Há no entanto, exemplos do uso de fungos hemibiotróficos e necrotróficos em programas de controle biológico clássico (TRUJILLO e NORMAN, 1995; KILLGORE et al., 1999). *Mycovellosiella lantanae* (Chupp) Deighton var. *lantanae* (DEN BREEÏEN, 1999) tem se mostrado promissor para o controle biológico clássico de *L. camara* na África do Sul, enquanto que *Septoria lantanae* Garman (TRUJILLO e NORMAN, 1995) já foi introduzido no Havaí há vários anos, não havendo, no entanto, informação disponível sobre o seu estabelecimento e efeito sobre a população de *L. camara* (Comunicação pessoal*).

No estudo de um microrganismo candidato a agente de controle biológico de plantas daninhas, o primeiro passo é a seleção de meios de cultura que sejam eficientes para a produção de esporos ou outros propágulos infectivos do microorganismo, e, em seguida deve-se procurar estabelecer as melhores condições para o seu desenvolvimento (CHURCHILL, 1982).

*SMITH, C. **Comunicação pessoal**. 1999. (University of Hawaii).

Para viabilizar a produção massal de inóculo, quatro métodos têm sido utilizados (JACKSON et al.,1996; ALVES e PEREIRA, 1998). O primeiro deles é o processo *in vivo* que consiste no uso de plantas hospedeiras, e pode ser utilizado como meio de produção de inóculo para patógenos biotróficos. Os outros três métodos consistem na produção dos fungos em meios artificiais, são eles: meios líquidos ou produção em fermentação submersa; meios sólidos ou semi-sólidos; e, fermentação bifásica, na qual são utilizados meios líquidos para crescimento vegetativo e em seguida substratos sólidos para a esporulação.

A utilização de filtrado fúngico tem sido uma ferramenta importante para determinar a produção de toxinas, diferenciação de isolados e relação com a doença produzida por fungos (POUND e STAHMANN, 1951; MAIERO et al., 1991; PÉREZ, 1997), e foi estudada neste trabalho.

Considerando-se a especificidade demonstrada pelo patógeno *C. cassicola* isolado de lantana (C.c.l.) a *L. camara*, em testes preliminares, este trabalho teve por objetivo estudar a interação entre patógeno e hospedeiro, para gerar conhecimentos úteis a serem aplicados no controle biológico.

A hipótese testada foi a de que C.c.l. apresentaria potencial para ser utilizado como agente de biocontrole de *L. camara*. Para validar esta hipótese, efetuou-se: a) a caracterização morfológica de C.c.l. e a comparação deste com outros isolados do patógeno; b) determinação da segurança do uso do fungo como agente de biocontrole, através da realização de testes de especificidade; c) avaliação de diferentes meios de cultura, luz e temperatura na promoção de esporulação; d) determinação da concentração de inóculo adequada para a obtenção de um nível de severidade de doença adequado para o controle da planta invasora; e) determinação da exigência de molhamento foliar para C.c.l. provocar doença; f) determinação do efeito de aplicações repetidas do agente; g) verificação da fitotoxidez do filtrado de C.c.l. para *L. camara*; h) produção de inóculo em substratos sólidos.

2- MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram conduzidos nos laboratórios de Micologia, Departamento de Fitopatologia- UFV e de Micologia e de Controle Biológico de Plantas Daninhas, CABI Bioscience, unidade Ascot.

Na maioria dos experimentos, o patógeno, cultivado no meio de cultura caldo de vegetais-ágar (CVA), (PEREIRA, 1997), e incubado a 25°C, no escuro.

Todos os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado (DIC), e na maioria com quatro repetições por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, sendo aqueles referentes às variáveis qualitativas à análise de variância e os quantitativos à análise de regressão pelo programa SAS para Windows, versão 6.12.

2.1. Caracterização morfológica do fungo

2.1.1. Morfologia geral

As amostras coletadas em duas localidades do estado do Paraná foram colocadas em prensa botânica com substituição periódica das folhas de jornal, até a sua desidratação. Culturas foram obtidas por isolamento direto das estruturas fúngicas em meio CVA. As amostras herborizadas e as estruturas produzidas, assim como as culturas em esporulação foram examinadas macro e microscopicamente no laboratório de Micologia do Departamento de Fitopatologia/ UFV. Foram obtidas mensurações e feitos desenhos do fungo em câmara clara acoplada a microscópio ótico Laborlux Leica.

2.1.2. Comparação entre isolados monospóricos de *Corynespora cassiicola*

Para confirmar a suposição de que isolados de *C. cassiicola* procedentes de diferentes hospedeiros teriam uma grande variabilidade quanto ao tamanho

dos conídios, foi montado um ensaio utilizando-se culturas monoconidiais de cinco isolados do patógeno obtidos dos seguintes hospedeiros: hortênsia [*Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser.], lantana (*L. camara*), soja [*Glycine max* (L.) Merr.], tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) e trapoeraba (*Commelina bengalensis* L.). Foi preparada uma suspensão de esporos, acrescentando-se Tween 80 a 0,05%, em água destilada estéril, em placas de Petri com culturas esporuladas de cada isolado, com idade de 15 dias, ajustando-se para a concentração de 1×10^6 conídios/mL. Esta suspensão foi espalhada sobre uma lâmina de microscopia, contendo o meio água destilada-ágar (ADA), apoiada sobre uma barra de vidro em V, mantida dentro de uma placa de Petri, contendo na parte inferior um papel de filtro embebido em água destilada estéril. Após quatro horas, tempo previamente constatado como suficiente para a germinação dos conídios, estes foram observados sob microscópio ótico. Os conídios germinados e que se apresentavam isolados foram selecionados em três categorias de acordo com o tamanho: pequeno (menores que 80 μm), médio (entre 81 e 150 μm) e grande (maiores que 151 μm). Os conídios de cada categoria foram transferidos para placas de Petri contendo o meio CVA e incubados a 25°C por 15 dias. Após a adição de solução de Tween 80 a 0,05% e raspagem das colônias em cada placa, foi retirada uma alíquota de 0,5 mL da suspensão, a qual foi transferida para um hemacitômetro. Foi observada a porcentagem de cada categoria de tamanho dos conídios, em cada tratamento, através da mensuração dos 100 primeiros localizados.

2.2. Testes de especificidade

Foram realizados testes de especificidade de isolados de C.c.l. segundo o método centrífugo-filogenético proposto por WAPSHERE (1974), que consiste na exposição inicial de um pequeno grupo de plantas relacionadas taxonomicamente à da planta alvo e gradualmente a plantas mais

distantemente relacionadas e plantas cultivadas. Paralelamente utilizaram-se também isolados do patógeno obtidos de outros hospedeiros: hortênsia, trapoeraba, tomateiro e soja, os quais encontram-se disponíveis na coleção de culturas do DFP/ UFV.

2.2.1. Especificidade de isolados de *Corynespora cassiicola* à lantana, outros gêneros e famílias

Foram realizadas inoculações com quatro isolados de *C. cassiicola*, obtidos de lantana, hortênsia, tomate e trapoeraba, em 24 espécies de plantas selecionadas por serem relatadas como hospedeiras do fungo e/ou por estarem incluídas no teste de patogenicidade recomendado para agentes de controle biológico de *L. camara* pelas autoridades quarentenárias da Austrália (ELLISON, 1996). As plantas testadas foram as seguintes: *Carica papaya* L. (mamão), *Clerodendron cunninghamii* Benth, *Commelina bengalensis* L. (trapoeraba), *Cucumis sativus* L. (pepino), *Duranta repens* L., *Glycine max* (L.) Merr.(soja), *Gossypium* sp. (algodão), *Hevea brasiliensis* (A. Juss.) Muell. (seringueira), *Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser.(hortênsia), *Lantana camara* L. (biótipo australiano com flores vermelhas), *L. camara* L. (biótipo australiano com flores rosadas), *L. camara* L. (biótipo australiano com flores brancas), *L. camara* L. (biótipo de Madagascar com flores amarelo-rosadas), *L. camara* L. (biótipo das Ilhas Galápagos com flores vermelhas), *L. camara* L. (biótipo de Viçosa com flores vermelhas), *Lantana glutinosa* Poepp, *Lantana lilacina* Desf., *Lantana pediculata* L., *Lantana montevidensis* (Spreng.) Briq., *Lippia citriodora* Kunth (erva-cidreira), *Lycopersicum esculentum* Mill (tomate), *Manihot esculenta* Crantz (mandioca), *Nicotiana tabacum* L. (fumo), *Phyla nodiflora* Greene, *Sesamum indicum* L. (gergelim), *Starchytarpheta cayenensis* L. (gervão-azul), *Verbena bonariensis* L. (cambará-de-capoeira), *Vicia faba* L.(caupi) e *Vitex trifolia* L.

Foi feita uma suspensão conidial de cada isolado em solução de Tween 80 a 0,05%, com concentração ajustada a 1×10^6 conídios/mL, a qual foi

pulverizada sobre cada uma das plantas até o escorrimento. As plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, e após 48 horas foram transferidas para casa-de-vegetação, onde os sintomas foram observados diariamente até 8 dias após a inoculação. As reações foram consideradas positivas (suscetível) ou negativa (resistente) dependendo da presença ou ausência de sintomas. O experimento foi realizado duas vezes.

2.2.2. Especificidade de isolados de *Corynespora cassicola* em folhas destacadas de biótipos de *Lantana* spp.

A patogenicidade de cinco isolados de *C. cassicola* de diferentes hospedeiros (lantana, tomate, hortênsia, trapoeraba e soja) procedentes do Brasil, a folhas destacadas de dezessete biótipos de *Lantana* spp. da coleção do CABI Bioscience (Tabela 1), foi verificada. O experimento foi conduzido em DIC, com três repetições para cada tratamento e cada repetição foi constituída de uma folha. Folhas sadias foram destacadas de plantas selecionadas e colocadas em placas de Petri descartáveis contendo água destilada. Cada folha foi colocada sobre grade plástica permitindo-se apenas o contato direto do pecíolo com a água. A inoculação foi feita gotejando-se com seringa hipodérmica quatro gotas de uma suspensão fúngica nas duas faces da folha, com intervalo de duas horas entre uma aplicação e outra. A concentração do inóculo foi de 1×10^6 esporos/mL suspensos em solução de Tween 80 a 0,05%. O controle consistiu de folhas sobre as quais apenas a solução de Tween 80 foi depositada. As folhas foram mantidas por 48 horas em câmara de nevoeiro a 20°C e após por mais 12 dias em incubadora a 20°C . Avaliações foram feitas aos 2, 3, 7 e 14 dias após a inoculação, registrando-se a severidade dos sintomas, com base em uma escala simplificada de notas de 0 a 2, sendo 0- sem sintomas, 1- menos de 50% da área foliar necrosada e 2- mais de 50% da área foliar necrosada. O ensaio foi realizado duas vezes.

Tabela 1- Biótipos de *Lantana* spp. da coleção do CABI Bioscience utilizadas no teste *in vitro*.

ESPÉCIE	COR DA FLOR	PROCEDÊNCIA
<i>Lantana camara</i>	Amarela	Garden Centre, Inglaterra (Ia)
<i>L. camara</i>	Rosa	Queensland, Austrália (Ar)
<i>L. camara</i>	Branca	Queensland, Austrália (Ab)
<i>L. camara</i>	Vermelhas	Queensland, Austrália (Ave)
<i>L. camara</i>	Rosa	Canela, RS, Brasil (Br)
<i>L. camara</i>	Rosa	Lefkas, Grécia (GLr)
<i>L. camara</i>	Rosa	Perilades, Grécia (GPr)
<i>L. camara</i>	Laranja	Korat Dam, Tailândia (TI)
<i>L. camara</i>	Laranja	Kala Oya, Sri Lanka (SI)
<i>L. camara</i>	Amarelo-rosada	Diego Suarez, Madagascar (MDa)
<i>L. camara</i>	Amarelo-rosada	Perinet, Madagascar (MPa)
<i>L. camara</i>	Rosa-claro	Havaí (Hr)
<i>L. camara</i>	Laranja	Belize (Bl)
<i>L. camara</i>	Vermelho-amarelada	Guatemala (Gv)
<i>L. camara</i>	Rosa-escuro	África do Sul (ASr)
<i>L. lilacina</i>	Violeta	Santa Cruz, Bolívia (Bv)
<i>L. montividentis</i>	Violeta	Queensland, Austrália (Avi)

2.2.3. Especificidade de isolados de *Corynespora cassicola* em plantas de biótipos selecionados de *Lantana* spp.

A patogenicidade dos cinco isolados previamente utilizados, foi testada em oito biótipos de *Lantana* spp. utilizando-se plantas selecionadas: Ab, Ave, Mda, MPa, *L. camara* (flores rosa-escuro) da África do Sul, *L. camara* (flores laranja) da África do Sul, Bv e Avi. O método utilizado na inoculação foi o de pincelamento das folhas com suspensão de esporos, numa concentração ajustada para 1×10^6 esporos por mL, em solução de Tween 80 a 0,05 %. O inóculo foi aplicado nas epidermes abaxiais e adaxiais de três folhas, por planta visualmente sadias. Após a inoculação as plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro com temperatura de 20°C, e após 48 horas transferidas para casa-de-vegetação a 25°C, onde foram avaliadas nos mesmos intervalos do ensaio anterior. Este ensaio foi realizado duas vezes.

2.3. Condições culturais ótimas para esporulação de *Corynespora cassiicola* isolado lantana

2.3.1. Meios de cultura para o crescimento micelial e esporulação de *Corynespora cassiicola* isolado lantana

Foram avaliados os meios de cultura e condições de incubação testados por PEREIRA (1997), para crescimento micelial e esporulação de fungos fitopatogênicos associados à *L. camara*. Os meios de cultura testados foram: caldo de vegetais-ágar (CVA), extrato de *L. camara*-sacarose-ágar (LSA), batata-dextrose-ágar (BDA), batata-cenoura-ágar (BCA). Utilizaram-se placas de Petri com 8,5 cm de diâmetro, cada qual contendo 20 mL do meio de cultura correspondente. No centro de cada placa foi colocado um disco de micélio com 5 mm de diâmetro, proveniente de bordas de colônia com 5 dias de idade, crescido em meio CVA. As placas foram mantidas em incubadoras a 25°C, \pm 1°C, no escuro, sendo observadas diariamente. O diâmetro das colônias foi medido, quando o fungo ocupou toda a superfície da placa em uma das repetições, constituída de cada placa.

A esporulação foi avaliada após 15 dias pela adição de 10 mL solução de Tween 80 a 0,05% em cada placa e friccionou-se a superfície do meio com alça de Drigalsky. O produto da raspagem foi filtrado em gaze. Uma alíquota de 1 mL foi retirada e depositada em hemacitômetro para avaliação da concentração da suspensão.

2.3.2. Crescimento micelial e esporulação de *Corynespora cassiicola* isolado lantana com exposição à luz negra

O efeito da luz negra (nuv) no crescimento micelial e esporulação de C.c.l. foi avaliado em um ensaio utilizando o meio CVA. Os tratamentos, que

tiveram quatro repetições, foram os seguintes: CVA/escuro contínuo e CVA/fotoperíodo de 12 horas sob nuv.

Utilizaram-se placas de Petri com 8,5 cm de diâmetro, cada qual contendo 20 mL do meio de cultura correspondente. No centro de cada placa foi colocado um disco de micélio com 5 mm de diâmetro, proveniente de bordas de colônia com 5 dias de idade, crescido em meio CVA. As placas foram mantidas em incubadoras a 25°C, no escuro ou fotoperíodo de 12 horas com nuv.

O crescimento do micélio e a esporulação foram avaliados aos 15 dias como no item anterior.

2.3.3. Meios de cultura e temperaturas para esporulação de *Corynespora cassicola* isolado lantana

A esporulação de C.c.l. foi avaliada em três meios de culturas utilizados na rotina do laboratório de Micologia do CABI Bioscience, Inglaterra e seis diferentes temperaturas. Os meios de cultura utilizados foram: água destilada-ágar (ADA), batata dextrose-ágar diluído 5 vezes (1/5 BDA) e suco V8®-ágar (V8), e as temperaturas testadas foram: 10, 15, 20, 25, 28 e 35°C. O fungo foi cultivado inicialmente em placas de Petri contendo meio V8, e após 5 dias foram retirados discos de micélio com 5 mm de diâmetro. Os discos foram transferidos para placas de Petri descartáveis com 7 cm, nas quais foram colocados 15 mL de cada meio de cultura, e as placas foram então deixadas em incubadoras ajustadas para a cada uma das temperaturas mencionadas, no escuro.

A avaliação da esporulação foi realizada conforme o item 2.3.1.

O experimento foi montado em DIC, em esquema fatorial, com quatro repetições para cada tratamento.

2.3.4. Meios de cultura e regimes de luz para a esporulação de *Corynespora cassiicola* isolado lantana

Foram comparados meios de cultura nas formas sólida e líquida e dois regimes de luz: luz contínua e ausência de luz. Os tratamentos foram os seguintes: a- Czapek-Dox – Cdox (ONESIROSAN et al, 1975; ALMEIDA e YAMASHITA, 1976) = 2g NaNO₃; 1g K₂HPO₄; 0,5g MgSO₄; 0,5g KCl; 0,01g FeSO₄; 30g sacarose em 1 litro de água destilada; b- batata dextrose (BD) e c- caldo de vegetais (CV), aos quais foi adicionado ou não 20 g de ágar por litro de meio de cultura. Nos tratamentos com meio sólido foram vertidos 20 mL de meio de cultura por placa de Petri de 8,5 cm de diâmetro. Nos tratamentos com meio líquido foram colocados 30 mL de meio de cultura em erlenmeyers com capacidade de 50 mL. Um disco de micélio fúngico com 5 mm de diâmetro e 5 dias de idade foi colocado no centro de cada placa de Petri e dentro de cada erlenmeyer. Foram preparadas 12 placas/ erlenmeyers de cada tratamento sendo que metade foi mantida sob luz contínua e a outra metade no escuro. O experimento foi avaliado em duas épocas, sendo a metade após 7 dias e a outra metade após 15 dias depois do cultivo do fungo. Avaliou-se a esporulação pela concentração de conídios na suspensão medida conforme descrito acima.

2.4. Concentração mínima de inóculo de *Corynespora cassiicola* isolado lantana para ocorrência da doença

Procurou-se estabelecer a quantidade mínima de inóculo de C.c.l. suficiente para provocar os sintomas da doença em dois biótipos de *L. camara*: Ab e MPa. As concentrações de inóculo testadas foram as seguintes: 0, 1 x 10³, 1 x 10⁴, 1 x 10⁵, 1 x 10⁶ e 5 x 10⁶. Inicialmente o fungo foi cultivado em placas de Petri contendo o meio V8, em regime de escuro, a 25 °C por 15 dias. Os esporos foram coletados conforme item 2.3.1.

Foram inoculadas três folhas em duas plantas de cada biótipo de lantana para cada tratamento. A inoculação foi feita pelo pincelamento da suspensão de conídios, com concentração correspondente a cada tratamento, nos dois versos da folha. As plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro a $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, e após 48 horas mantidas sob casa-de-vegetação a 25°C . O experimento foi avaliado registrando-se o número de folhas lesionadas e a queda de folhas às 48 horas e após 7 dias após a inoculação.

2.5. Exigências de molhamento foliar de *Corynespora cassiicola* isolado lantana

2.5.1. Duração do molhamento foliar para ocorrência da doença

Foi avaliado o período de molhamento foliar necessário para ocorrer doença no biótipo MPa. Utilizaram-se, seis períodos de molhamento foliar: 0, 3, 6, 12, 18 e 24 horas, em DIC, com três repetições para cada tratamento. As folhas de cada planta foram contadas e as plantas foram inoculadas com uma suspensão de $1,5 \times 10^6$ conídios/ mL de C.c.l., com um atomizador, levadas a câmara de nevoeiro a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e sendo retiradas de acordo com o tratamento relacionado. Ao serem retiradas, a parte aérea da planta foi submetida a secagem com vento não aquecido, com auxílio de um secador de cabelos. As plantas foram conduzidas à casa-de-vegetação, onde foram observadas e avaliadas aos dois e sete dias após a inoculação, com relação a porcentagem de folhas lesionadas e porcentagem de queda foliar, respectivamente.

2.5.2. Atraso no molhamento foliar na ocorrência da doença

Foi avaliada a tolerância de C.c.l. a atrasos de molhamento foliar refletida na capacidade do inóculo aplicado causar doença no biótipo MPa.

Utilizaram-se seis períodos de atraso de molhamento foliar: 0, 3, 6, 12, 24 e 48 horas. O experimento foi conduzido em DIC com quatro repetições para cada tratamento. As folhas de cada planta foram contadas e as plantas foram inoculadas com atomizador utilizando uma suspensão com $1,5 \times 10^6$ conídios/mL de C.c.l. Após inoculadas, as plantas foram levadas para a câmara de nevoeiro a $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, por períodos diferentes de repouso, de acordo com o tratamento relacionado. Depois de um período de 48 horas do início do experimento, as plantas foram retiradas da câmara de nevoeiro e conduzidas à casa-de-vegetação onde foram observadas e avaliadas aos dois e sete dias após a inoculação. Anotaram-se a porcentagem de folhas lesionadas e porcentagem de queda foliar para cada tratamento, respectivamente.

2.6. Impacto de uma segunda aplicação de *Corynespora cassiicola* isolado lantana no progresso da doença

Foi verificado o impacto de uma segunda aplicação da suspensão conidial sobre plantas já tratadas. Foram selecionadas nove plantas de lantana do biótipo Mpa, e estas foram divididas em três grupos, sendo: a) controle-nenhuma aplicação; b) uma aplicação da suspensão de C.c.l.; c) duas aplicações da suspensão de C.c.l. As plantas do grupo b e c foram inoculadas com atomizador, com uma suspensão de C.c.l. a uma concentração de 1×10^5 conídios/mL, sem haver escorrimento do inóculo. As plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro por 48 horas, a $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. A incidência da doença nas plantas foi quantificada pela porcentagem de folhas lesionadas após 48 horas da primeira aplicação. As plantas foram mantidas em câmara de crescimento com temperatura (26°C) e irrigação controladas, a fim de se recuperarem da melhor forma possível ao estresse provocado pela primeira aplicação. Após 15 dias, as plantas do grupo c foram novamente pulverizadas com C.c.l. a uma concentração de inóculo de 1×10^6 , mantidas em câmara de nevoeiro, conforme descrito acima e transferidas para câmara de crescimento, onde

permaneceram por mais 15 dias junto com as plantas dos grupos a e b. Após este período, as plantas foram avaliadas a fim de se verificar o impacto causado pela segunda aplicação do patógeno.

2.7. Verificação da fitotoxidez de filtrado de conídios germinados de *Corynespora cassiicola* isolado lantana

Testou-se a hipótese de que o filtrado derivado de suspensão de conídios de C.c.l. conteria alguma substância fitotóxica. Para tal, o fungo foi cultivado em meio CVA e os esporos coletados como descrito no item 2.3.1. A suspensão obtida foi filtrada com gaze e transferida para um erlenmeyer, o qual foi mantido por quatro horas sob agitação a temperatura ambiente aguardando-se assim a germinação dos conídios. Obtida a suspensão de conídios germinados, estimou-se então a concentração da mesma. Metade desta suspensão foi filtrada utilizando-se um conjunto de filtro Millipore® (0,45µm, 25 mm de diâmetro), para obter o filtrado sem conídios. Foram montados ao todo três experimentos.

No primeiro ensaio procurou-se comparar o efeito da aplicação do filtrado com outras aplicações. Inocularam-se por pincelamento três folhas saudáveis em três plantas de lantana do biótipo MPa. Os tratamentos foram os seguintes: a) água destilada esterilizada; b) filtrado; c) suspensão conidial de *C. cassiicola* na concentração de 1×10^6 conídios por mL em água destilada esterilizada; d) suspensão de micélio triturado de *C. cassiicola* obtida da adição de 15 mL de água destilada esterilizada no micélio resultante da primeira filtragem. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro a 25°C por 48 horas, quando foram avaliadas quanto a incidência de sintomas foliares característicos da enfermidade.

No segundo experimento comparou-se plantas inoculadas ou não com o filtrado fúngico, pela porcentagem de folhas com lesões. Inocularam-se com atomizador três plantas de lantana do biótipo MPa para cada um dos

tratamentos que consistiram em: a) água destilada esterilizada; b) filtrado; c) suspensão conidial de *C. cassiicola* na concentração de 1×10^6 conídios por mL em água destilada esterilizada.

Finalmente, foi verificada a reação de dois hospedeiros à inoculação de suspensão de conídios e à aplicação de filtrado de dois isolados de *C. cassiicola*. Foram utilizadas plantas de lantana do biótipo MPa e de tomateiro cultivar Santa Cruz Kada. Em ambas espécies vegetais as plantas foram inoculadas com: a) suspensão de conídios de C.c.l.; b) suspensão de conídios de *C. cassiicola* isolado tomate; c) filtrado da suspensão de conídios de C.c.l.; d) filtrado da suspensão de conídios de *C. cassiicola* isolado tomate. Foram utilizadas duas plantas para cada tratamento e foram inoculadas três folhas/folíolos em cada planta por pincelamento.

2.8. Produção de inóculo de *Corynespora cassiicola* isolado lantana

2.8.1. Substratos sólidos para produção de inóculo de *Corynespora cassiicola* isolado lantana

Para a produção de conídios de C.c.l. em substratos sólidos foram testados: grãos de arroz, milho, trigo, grão-de-bico, caupi, soja e sorgo, canjiquinha de milho, bagaço de cana picada a $0,5 \text{ cm}^2$ e desidratada e raiz de mandioca picada a $0,5 \text{ cm}^2$ e desidratada.

A metodologia utilizada foi adaptada de POMELLA (1999). O ensaio foi conduzido em tubos de ensaio, contendo 5 g de cada substrato acrescido de 2 mL de água destilada, os quais foram tampados com um chumaço de algodão e autoclavados. Adicionou-se assepticamente a cada tubo 2 mL de micélio com sete dias de idade, crescido sob agitação em meio CV com a concentração dobrada e triturado em liquidificador. Os tubos foram incubados sob luz contínua a 25°C durante 15 dias.

A esporulação foi avaliada adicionando-se 10 mL de água destilada esterilizada em cada tubo, seguida de fricção com um palito de madeira e

agitação. Foi retirada uma alíquota de 1 mL da suspensão e a concentração de conídios foi quantificada com auxílio de hemacitômetro.

O experimento foi montado DIC, com cinco repetições para cada tratamento e cada repetição foi constituída por um tubo de ensaio.

2.8.2. Produção de inóculo de *Corynespora cassicola* isolado lantana em substratos sólidos selecionados

De posse das informações geradas no experimento anterior e pela facilidade e baixo custo de alguns dos substratos utilizados, quatro foram selecionados para um novo experimento. Os substratos escolhidos foram: grãos de arroz, raiz de mandioca picada e desidratada, grãos de milho e grãos de sorgo.

O experimento foi conduzido em DIC, com quatro repetições para cada tratamento. As parcelas experimentais constituíram-se de sacos de polipropileno contendo 100 g de cada substrato acrescido de 80 mL de água destilada, os quais foram vedados e autoclavados. Adicionou-se assepticamente a cada saco de polipropileno três discos de micélio com 14 dias de idade, crescido em meio CVA, e as parcelas foram mantidas a 25°C, sob luz contínua.

A esporulação foi avaliada após 14 dias, de acordo com o item 2.3.1., adicionando-se 100 mL de solução de Tween 80 a 0,05% em cada saco, seguido de revolvimento vigoroso com auxílio de um bastão de vidro e agitação.

2.8.3. Fermentação difásica líquido-sólido na produção de inóculo de *Corynespora cassicola* isolado lantana

Foi avaliada a técnica de bandejas utilizada por POMELLA (1999) para a produção massal de inóculo. Três discos de micélio de de C.c.l. com 14 dias de idade, produzido em meio CVA, foram depositados em erlenmeyers com

capacidade de 250 mL contendo 100 mL de meio líquido CV. A seguir, os erlenmeyers foram levados ao agitador orbital a uma velocidade de 100 rpm. Após quinze dias, o micélio formado foi triturado em liquidificador por 20 segundos, obtendo-se uma suspensão homogênea. Foram espalhados 30 mL desta suspensão sobre a superfície de caixas plásticas (gerbox) medindo 11 x 11 x 3,5 cm, desinfetados com álcool etílico 70%, forrados com papel alumínio, contendo 100 mL do meio CVA e mantidos sob luz contínua a 25°C. A colheita dos esporos iniciou-se após os três do início do experimento e consistiu na raspagem da superfície do meio de cultura, com auxílio de uma espátula de borracha, após a adição de 10 mL de água destilada esterilizada. Após a retirada de uma alíquota os conídios foram quantificados em hemacitômetro. Os tratamentos consistiram no tempo de colheita dos conídios: três, quatro, sete, oito, dez, 11, e 15 dias após o início do experimento, sendo dispostos em DIC com quatro repetições para cada tratamento.

3- RESULTADOS

3.1. Caracterização morfológica do fungo

3.1.1. Morfologia geral

Corynespora cassiicola (Berk. & Curt.) Wei, *Mycological Papers* **34**: 5 (1950). (Figura 1)

Lesões em folhas vivas (Figura 2), 0.5-10 mm de diâmetro, subcircular a irregular, marrom-escuras circundadas por um halo preto abaxialmente e centro marrom-claro circundado por halo marrom-escuro a preto adaxialmente. *Micélio interno* intracelular, 1-2 μm de diâmetro, septado, ramificado, subhialino. *Estroma* ausente. *Conidióforos*, isolados, eretos, retos a encurvados, não ramificados, cilíndricos, 125-600 x 8-12 μm , 5-10 septos, marrom-claros a marrom-escuros, lisos. *Células conidiogênicas* integradas, terminais, holoblásticas com proliferações enteroblásticas, cilíndricas, 130- 525 x 8-10 μm , marrom-claras à marrom-escuras. *Loci conidiogênicos* distintos, achatados, espessos e escuros. *Conídios* secos, isolados ou em cadeias de 2 conídios, holoblásticos, obclavados a fusiformes, retos a curvados, 54-234 x 12-21 μm , 4-12 distoseptos, marrom-claros, hilo espesso, escuro e achatado, lisos.

Em cultura: crescimento relativamente rápido (8 cm diâm após 15 dias) com colônias compostas de micélio abundante, cinza, aéreo e cotonoso, esporulação abundante.

Material examinado: VIC. 21991, Estância Betânia, PR, 30 Mar. 1998; VIC 22039, Guaraguaçu, PR, 31 Mar. 1998.

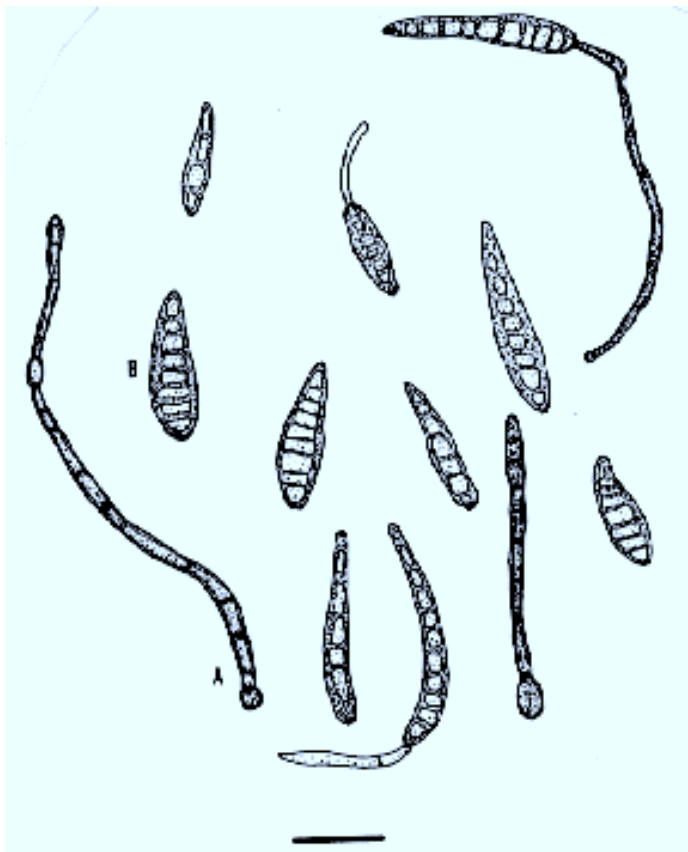


Figura 1- *Corynespora cassicola*, conidióforos (A) e conídios (B). Barra = 50 μm .



Figura 2- Lesões em folhas e inflorescência de *Lantana camara* causadas por *Corynespora cassicola*.

3.1.2. Comparação entre isolados monospóricos de *Corynespora cassicola*

Evidenciou-se inicialmente que os isolados de *C. cassicola* apresentavam uma grande variabilidade quanto ao tamanho de conídios, tanto dentro como entre isolados, demonstrado pelo alto valor do desvio padrão em cada tratamento (Tabela 1). Dentro de cada isolado, culturas monocodiais procedentes de conídios pequenos, nem sempre apresentaram conídios menores e o mesmo ocorreu quando utilizados conídios médios ou grandes. Em alguns isolados como os de hortênsia, soja e tomate, as menores médias foram obtidas justamente de culturas conidiais obtidas a partir de conídios grandes. Ademais, o tamanho máximo de conídio observado foi obtido de culturas oriundas de um conídio pequeno, como foi o caso do isolado lantana. A variabilidade no tamanho dos conídios foi generalizada dentro da espécie independente do isolado

Entre os isolados, apesar da grande variabilidade obtida por meio de 300 observações, pode-se inferir que o isolado com conídios maiores foi o de tomate e os isolados com conídios menores foram os de hortênsia e soja. O tamanho médio dos conídios dos isolados hortênsia, lantana e soja foi da categoria mediana (entre 81 e 150 μm), enquanto para os isolados tomate e trapoeraba foi de tamanho grande (maiores que 151 μm).

Tabela 1- Comparação de diferentes isolados de *Corynespora cassicola* derivados de culturas monocodiais com conídios pequenos (P), médios (M) e grandes (G).

Estatística (μm)	Isolado Hortênsia			Isolado Lantana			Isolado Soja			Isolado Tomate			Isolado Trapoeraba		
	P	M	G	P	M	G	P	M	G	P	M	G	P	M	G
Máximo	260	422	310	525	290	350	403	415	285	575	475	760	335	395	420
Mínimo	12	12	12	15	15	20	12	19	12	15	15	15	20	15	25
Média	91	84	79	100	114	128	91	99	71	176	173	162	159	165	160
Desvio Padrão.	66	71	60	90	67	82	76	67	49	144	122	145	77	101	92

3.2. Testes de especificidade

3.2.1. Especificidade de isolados de *Corynespora cassiicola* à lantana, outros gêneros e famílias

As lesões foliares e desfolha iniciaram-se 48 horas após a inoculação das plantas e C.c.l. causou queda de todas as folhas inoculadas em plantas suscetíveis. As reações foram consideradas positivas, quando houve aparecimento de sintomas ou negativas, na ausência de sintomas (Tabela 2).

Tabela 2- Reações à inoculação cruzada com isolados de *Corynespora cassiicola*.

Planta Selecionada	Isolado Lantana	Isolado Hortênsia	Isolado Tomateiro	Isolado Trapoeraba
<i>Carica papaya</i>	-*	-	-	-
<i>Clerodendron cunninghami</i>	-	-	-	-
<i>Commelina bengalensis</i>	-	-	-	+
<i>Cucumis sativus</i>	-	-	-	-
<i>Duranta repens</i>	-	-	-	-
<i>Glycine max</i>	-	-	-	-
<i>Gossypium sp.</i>	-	-	-	-
<i>Hevea brasiliensis</i>	-	-	-	-
<i>Hydrangea macrophylla</i>	-	+	-	-
<i>Lantana camara</i> (Ave)	-	-	+	-
<i>L. camara</i> (Ar)	-	-	+	-
<i>L. camara</i> (Ab)	+	-	-	-
<i>L. camara</i> (MPa)	+	-	-	-
<i>L. camara</i> (Viçosa)	-	-	-	-
<i>L. camara</i> (Galapagos)	+	-	-	-
<i>L. glutinosa</i>	+	-	-	-
<i>L. lilacina</i>	-	-	-	-
<i>L. montividentis</i>	-	-	-	-
<i>L. pediculata</i>	-	-	-	-
<i>Lippia citriodora</i>	-	-	-	-
<i>Lycopersicum esculentum</i>	-	-	+	-
<i>Manihot esculenta</i>	-	-	-	-
<i>Nicotiana tabacum</i>	-	-	-	-
<i>Phyla nodiflora</i>	-	-	-	-
<i>Sesamum indicum</i>	-	-	-	-
<i>Starchytarpheta cayenensis</i>	-	-	-	-
<i>Verbena bonariensis</i>	-	-	-	-
<i>Vicia faba</i>	-	-	-	-
<i>Vitex trifolia</i>	-	-	+	-

* - = Sem sintomas, + = Sintomas característicos da enfermidade

3.2.2. Especificidade de isolados de *Corynespora. cassiicola* em folhas destacadas de biótipos de *Lantana* spp.

Houve uma grande variação quanto à incidência e extensão dos sintomas provocados por isolados de *C. cassiicola* em plantas de lantana (Tabela 3). Em alguns biótipos os sintomas se iniciaram-se em 48 horas e em outros aos 7 dias após a inoculação. Após 14 dias, as folhas começaram a ficar necrosadas e observou-se a colonização por fungos saprófitas. C.c.l. foi patogênico a 10 entre os 17 biótipos de *Lantana* spp. testados (Ia, Ab, GLr, Tl, Sl, MDa, MPa, Hr, Gv e Asr). Todavia, nestes dez biótipos suscetíveis, a extensão dos sintomas não foi idêntica, sendo que apenas quatro deles (GLr, Tl, MPa e Hr) apresentaram mais de 50% ou toda a área foliar necrosada. O isolado obtido do tomateiro foi patogênico a um grande número de materiais, 12 dos 17 testados, incluindo Avi (*L. montevidensis*). Apenas um dos materiais (Ab) suscetível ao isolado lantana, foi resistente ao isolado do tomateiro. O isolado de hortênsia foi patogênico a quatro biótipos de *L. camara* e ao de *L. montividentis*, sendo que em Tl a extensão da necrose foi maior que nos demais. O isolado de trapoeraba foi patogênico a seis dentre os biótipos de *L. camara* testados, sendo o único patogênico ao biótipo Ave. O isolado obtido da soja foi patogênico a oito biótipos de *L. camara* e foi o único que causou sintomas em *L. lilacina*.

3.2.3. Especificidade de isolados de *Corynespora cassiicola* em plantas de biótipos selecionados de *Lantana* spp.

Alguns dos materiais vegetais que foram suscetíveis a determinados isolados de *C. cassiicola* nos testes *in vitro* envolvendo folhas destacadas, foram resistentes quando testados *in vivo* (Tabela 4). Confirmou-se a especificidade de C.c.l. a um número limitado de biótipos de lantana.

Tabela 3- Severidade da doença, em folhas destacadas de *Lantana* spp., aos 2, 3, 7 e 14 dias após inoculação de isolados de *Corynespora cassiicola*.

BIÓTIPOS DE LANTANA	Isolado Lantana				Isolado Tomateiro				Isolado Hortênsia				Isolado Trapoeraba				Isolado Soja			
	2*	3	7	14	2	3	7	14	2	3	7	14	2	3	7	14	2	3	7	14
<i>L. camara</i> (flores amarelas)- Garden Centre, Inglaterra (Ia)	0**	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>L. camara</i> (flores rosadas)- Queensland, Austrália (Ar)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1
<i>L. camara</i> (flores brancas)- Queensland, Austrália (Ab)	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1
<i>L. camara</i> (flores vermelhas)- Queensland, Austrália (Ave)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
<i>L. camara</i> (flores rosadas)- Canela, RS, Brasil (Br)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. camara</i> (flores rosadas)- Lefkas, Grécia (GLr)	1	1	2	2	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. camara</i> (flores rosadas)- Perilades, Grécia (GPr)	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. camara</i> (flores laranja)- Korat Dam, Tailândia (TI)	1	2	2	2	0	0	1	1	1	1	2	2	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>L. camara</i> (flores laranja)- Kala Oya, Sri Lanka (SI)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
<i>L. camara</i> (amarelo-rosadas)- Diego Suarez, Madagascar (MDa)	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1
<i>L. camara</i> (amarelo-rosadas)- Perinet, Madagascar (MPa)	1	2	2	2	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
<i>L. camara</i> (flores rosa-claro)- Havaí (Hr)	1	1	2	2	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. camara</i> (flores laranja)- Belize (Bl)	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. camara</i> (flores vermelhas e amarelas)- Guatemala (Gv)	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. camara</i> (flores rosa-escuro)- África do Sul (ASr)	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
<i>L. lilacina</i> (flores violeta)- Santa Cruz, Bolívia (Bv)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
<i>L. montividentis</i> (flores violeta)- Queensland, Austrália (Avi)	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0

* Dias após a inoculação

**0= Sem sintomas; 1= Menos de 50% da área foliar necrosada; 2= Mais de 50% da área foliar necrosada.

Tabela 4- Ocorrência de doença causada por isolados de *Corynespora cassiicola* em biótipos de *Lantana* spp.

BIÓTIPOS DE LANTANA	Isolado Lantana	Isolado Tomateiro	Isolado Hortênsia	Isolado Trapoeraba	Isolado Soja
<i>L. camara</i> (flores brancas)- Queensland, Austrália (Ab)	+	-	-	-	-
<i>L. camara</i> (flores vermelhas)- Queensland, Austrália (Ar)	-	-	-	-	-
<i>L. camara</i> (flores amarelo-rosadas)- Diego Suarez, Madagascar (MDa)	+	+	-	-	-
<i>L. camara</i> (flores amarelo-rosadas)- Perinet, Madagascar (MPa)	+	-	-	-	-
<i>L. camara</i> (flores rosa-escuro)- África do Sul (ASr)	-	-	-	-	-
<i>L. camara</i> (flores laranja)- África do Sul (ASl)	-	+	-	-	-
<i>L. lilacina</i> (flores violeta)- Santa Cruz, Bolívia (Bv)	-	-	-	-	+
<i>L. montividentis</i> (flores violeta)- Queensland, Austrália (Avi)	-	-	-	-	-

* - = Sem sintomas, + = Sintomas característicos da doença

3.3. Condições culturais ótimas para esporulação de *Corynespora cassiicola* isolado lantana

3.3.1. Meios de cultura para o crescimento micelial e esporulação de *Corynespora cassiicola* isolado lantana

O meio de cultura em que ocorreu maior crescimento micelial foi LSA (Tabela 5). Porém, a maior esporulação foi verificada no meio CVA. No meio BDA, que é utilizado tradicionalmente como meio padrão em diversos laboratórios, obteve-se a menor esporulação.

Tabela 5- Média de crescimento micelial e esporulação de *Corynespora cassiicola* isolado lantana cultivado em diferentes meios de cultura.

MEIO DE CULTURA	CRESCIMENTO MICELIAL (mm)	ESPORULAÇÃO MÉDIA (esp.)	
		(esp. x 10 ⁵)	log (esp. x 10 ⁵)
CVA	7,6 b*	2,40	5,38 a*
LSA	8,5 a	0,52	4,70 b
BDA	7,8 b	0,20	4,25 c
BCA	6,9 c	0,51	4,68 b

* Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (P= 0,01).

3.3.2. Crescimento micelial e esporulação de *Corynespora cassiicola* isolado lantana com exposição à luz negra

O patógeno apresentou maior crescimento micelial quando cultivado sob escuro contínuo (Tabela 6). Entretanto, não se encontrou diferença significativa (P= 0,01) quanto à esporulação. Pelos resultados, sugere-se que a luz nuv não estimula a esporulação de C.c.l.

Tabela 6- Média de crescimento micelial e esporulação de *Corynespora cassiicola* isolado lantana cultivado meio CVA sob dois regimes de luz

MEIO DE CULTURA	CRESCIMENTO MICELIAL (mm)	ESPORULAÇÃO MÉDIA (esp.)	
		esp. x 10 ⁵	log (esp. x 10 ⁵)
CVAe	7,6 a*	2,40	5,38 ^{n.s.*}
CVAuv	7,1 b	1,48	5,16

* Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (P=0,01).

3.3.3. Meios de cultura e temperaturas para esporulação de *Corynespora cassiicola* isolado lantana

Encontraram-se diferenças na esporulação, para os meios de cultura e temperaturas testadas, assim como na interação entre os dois fatores (Tabela 7), demonstrando a dependência entre ambos. Os maiores valores de esporulação foram proporcionados pelo meio V8®, entre 20 e 28°C.

Foram obtidas equações de regressão para estimar a melhor temperatura para a esporulação do fungo. Para o meio ADA, a equação ajustada pela análise de regressão foi: $\text{esp} = -11,68 + 1,44t - 0,03t^2$, cujo coeficiente de determinação (R^2) foi igual a 0,81. Para o meio 1/5 BDA, foi encontrada $\text{esp} = -8,05 + 1,34t - 0,03t^2$, $R^2 = 0,80$. Já para o meio V8, que apresentou maior esporulação no intervalo de temperatura ótima, encontrou $\text{esp} = -14,27 + 1,84t - 0,04t^2$, $R^2 = 0,96$. Baseando-se nesta última equação, determinou-se que a temperatura ótima estimada para esporulação foi de 23°C.

Tabela 7- Esporulação média (esp.) de *Corynespora cassiicola* isolado lantana [log (esp. x 10⁵)] em diferentes temperaturas e meios de cultura.

MEIO DE CULTURA	TEMPERATURA (°C)					
	10	15	20	25	28	35
ADA	0 a*	2,19 b	4,59 b	4,74 c	4,55 c	0
1/5 BDA	2,19 a	5,28 a	5,37 a	5,56 b	5,61 b	0
V8®	0 a	4,69ab	5,43 a	6,11 a	6,06 a	0

* Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (P= 0,01).

3.3.4. Meios de cultura e regimes de luz para a esporulação de *Corynespora cassiicola* isolado lantana

Não foi obtida esporulação em qualquer dos tratamentos envolvendo meio de cultura líquido, em qualquer das duas épocas. Assim, foram comparados apenas os tratamentos em que se utilizou meio de cultura sólido (Tabela 8). Apesar de o fungo já apresentar esporulação aos 7 dias, os maiores valores de esporulação ocorreram aos 15 dias de idade. A exposição à luz contínua estimulou o aumento da esporulação em praticamente todos os tratamentos. Nas condições ideais de tempo e luz, a maior esporulação ocorreu no meio CVA.

Tabela 8- Esporulação *Corynespora cassiicola* isolado lantana em diferentes meios de cultura e regimes de luz, em duas épocas de avaliação.

MEIO DE CULTURA	ESPORULAÇÃO (7 DIAS) esp= log (esp. x 10 ⁵)		ESPORULAÇÃO (15 DIAS) esp= log (esp. x 10 ⁵)	
	COM LUZ	SEM LUZ	COM LUZ	SEM LUZ
CdoxA	5,16 A*a**	0,50 B b	14,46 A b	0,83 B b
BDA	4,25 A a	5,30 A a	15,91 A b	7,66 B a
CVA	5,00 A a	3,16 B ab	19,90 A a	6,00 B a

* Médias seguidas pela mesma letra não pelo teste F (P= 0,05).

** Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (P=0,05).

3.4. Concentração mínima de inóculo de *Corynespora cassiicola* isolado lantana para ocorrência da doença

As concentrações de inóculo 0, 1 x 10³ e 1 x 10⁴, não produziram sintomas da doença ou desfolha em quaisquer dos biótipos ou repetições. Sumarizou-se os resultados obtidos para as concentrações acima de 1x10⁵ (Tabela 9). No biótipo Ab, ocorreram lesões foliares e desfolha, em todas as repetições, apenas na concentração de 5 x 10⁶. Já para o biótipo MPa, em

quatro das seis repetições ocorreram sintomas na concentração de 1×10^5 , e a partir de 1×10^6 , em todas as repetições ocorreram lesões foliares e desfolha.

Tabela 9- Efeito da concentração de inóculo de *Corynespora cassiicola* isolado lantana na ocorrência de doença e, ou desfolha em dois biótipos de *Lantana camara*.

Biótipo	Concentração de inóculo	Repetição	Lesão (48 horas)	Lesão (7 dias)	Desfolha (48 horas)	Desfolha (7 dias)
Ab	1×10^5	1	-	-	-	-
		2	-	-	-	-
		3	-	-	-	-
		4	-	-	-	-
		5	-	-	-	-
		6	-	-	-	-
	1×10^6	1	+	+	+	+
		2	-	-	-	-
		3	-	-	-	-
		4	-	-	-	-
		5	-	-	-	-
		6	-	-	-	-
	5×10^6	1	+	+	+	+
		2	+	+	+	+
		3	+	+	+	+
		4	+	+	+	+
		5	+	+	+	+
		6	+	+	-	+
MPa	1×10^5	1	+	+	+	+
		2	+	+	-	-
		3	-	+	-	-
		4	+	+	+	+
		5	+	+	+	+
		6	+	+	+	+
	1×10^6	1	+	+	+	+
		2	+	+	+	+
		3	+	+	+	+
		4	+	+	+	+
		5	+	+	+	+
		6	+	+	+	+
	5×10^6	1	+	+	+	+
		2	+	+	+	+
		3	+	+	+	+
		4	+	+	+	+
		5	+	+	+	+
		6	+	+	+	+

* - = Sem sintomas, + = Sintomas característicos da enfermidade

Ab= *Lantana camara* biótipo australiano, com flores brancas

MPa= *L. camara* biótipo de Perinet, Madagascar, com flores amarelo-rosadas

3.5. Exigências de molhamento foliar de *Corynespora cassicola* isolado lantana

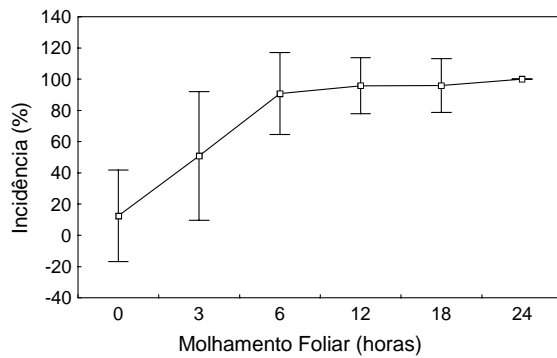
3.5.1. Duração do molhamento foliar para ocorrência da doença

Mesmo no tratamento em que as plantas não foram colocadas em câmara de nevoeiro, houve repetições que apresentaram sintomas da doença e também desfolha (Figura 3). Porém, apenas a partir de seis horas começaram a ocorrer níveis da doença superiores a 90% e haver desfolha de mais de 50%. Plantas apresentando 100% de ocorrência da doença e acima de 70% de desfolha foram observadas quando expostas a um mínimo de seis horas de molhamento foliar. A única condição em que se obteve um resultado homogêneo com todas as repetições, apresentando sintomas em todas as folhas e elevada desfolha, foi a de exposição das plantas submetidas a 24 horas de molhamento foliar.

3.5.2 Atraso no molhamento foliar na ocorrência da doença

O máximo de incidência verificada foi de 60,9% e de desfolha 64,7%, diferente do que vinha sendo observado em inoculações anteriores, quando algumas plantas apresentaram 100% de severidade da doença e acima de 70% de desfolha. Algum fator ambiental indeterminado deve ter interferido nestes resultados. Mesmo assim, em função dos resultados (Figura 4), pode-se deduzir que a severidade da doença é inversamente proporcional ao período de atraso de molhamento foliar. Até seis horas de atraso do molhamento foliar não há muita diferença nos valores avaliados, entretanto acima deste período, tanto a incidência quanto a desfolha vão diminuindo, a ponto de chegarem a zero no tratamento onde houve 48 horas de atraso.

A



B

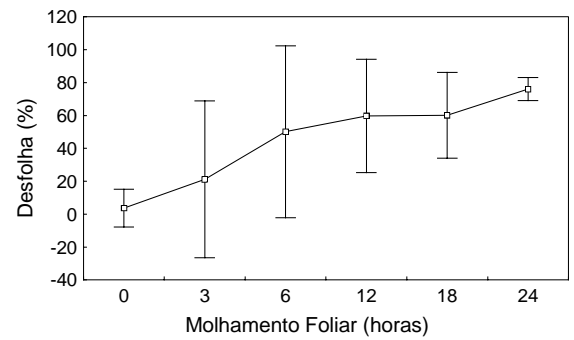
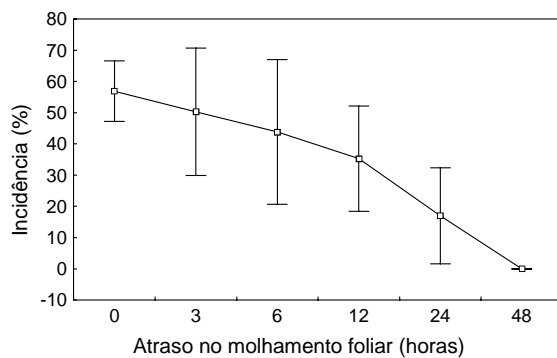


Figura 3- Influência das horas de molhamento foliar na incidência das lesões (A) e desfolha (B) de plantas de *L. camara* biotipo Madagascar com flores amarelo-rosadas inoculadas com *Corynespora cassiicola* isolado lantana, com linha unindo as médias do intervalo de confiança (I.C. 0,95)

A



B

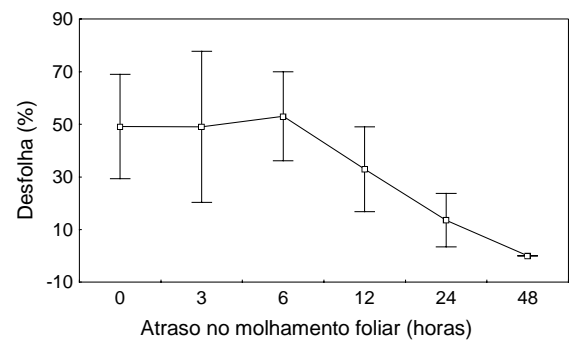


Figura 4- Influência das horas de atraso do molhamento foliar na incidência das lesões (A) e desfolha (B) de plantas de *L. camara* biotipo Madagascar com flores amarelo-rosadas inoculadas com *Corynespora cassiicola* isolado lantana, com linha unindo as médias do intervalo de confiança (I.C. 0,95).

3.6. Impacto de uma segunda aplicação de *Corynespora cassiicola* isolado lantana no progresso da doença

Observou-se um nítido impacto resultante de uma segunda aplicação com C.c.1. (Tabela 10). No intervalo entre a primeira e segunda aplicação, todas as plantas tiveram pequena rebrota, porém as plantas do grupo a (controle) tiveram maior desenvolvimento. Após a segunda aplicação uma das plantas do grupo c (duas aplicações) morreu, e as demais tiveram uma rebrota mais lenta que aquelas dos outros grupos. As plantas controle tiveram crescimento vigoroso e ocorreu florescimento das plantas em todas as repetições, o que não ocorreu nos demais grupos, durante o período de observação.

Tabela 10- Impacto de duas aplicações de *Corynespora cassiicola* isolado lantana na ocorrência da doença (incidência).

GRUPOS DE PLANTAS	INCIDÊNCIA MÉDIA(%)	
	Primeira aplicação	Segunda aplicação
a- Controle	0	-
b- Uma aplicação	79,3	-
c- Duas aplicações	76,7	100

3.7. Verificação da fitotoxidez de filtrado de conídios germinados de *Corynespora cassiicola* isolado lantana

Tanto o filtrado derivado de conídios, quanto a suspensão de micélio do fungo podem levar ao surgimento de sintomas. Houve ocorrência da doença em todas as repetições dos tratamentos cujas plantas foram inoculadas com o fungo. Enquanto nos tratamentos em que a suspensão de conídios ou de

micélio foi aplicada, a severidade da doença e a desfolha foram maiores do que naqueles onde se aplicou apenas o filtrado.

No segundo ensaio comprovou-se que apesar do filtrado produzir lesões características da doença, isto ocorre em menor intensidade (Figura 5). A média da incidência de lesões foliares dos tratamentos em que se utilizou o filtrado foi de 14,5%, enquanto que naqueles onde se inoculou a suspensão de conídios, ela foi de 69,2%. Não houve qualquer sintoma na testemunha.

No terceiro ensaio comprovou-se a especificidade do fungo e do filtrado às plantas de onde cada isolado de *C. cassiicola* se originou (Tabela 11). Todas as plantas de lantana inoculadas com o filtrado de conídios de C.c.l. apresentaram lesões típicas da doença, enquanto que quaisquer folhas das plantas testadas exibiram sintomas, quando inoculadas com o filtrado do isolado de tomateiro. Apesar da suspensão de conídios de *C. cassiicola* isolado de tomateiro ter causado sintomas da doença no tomateiro, o mesmo não ocorreu quando o filtrado deste isolado foi aplicado.

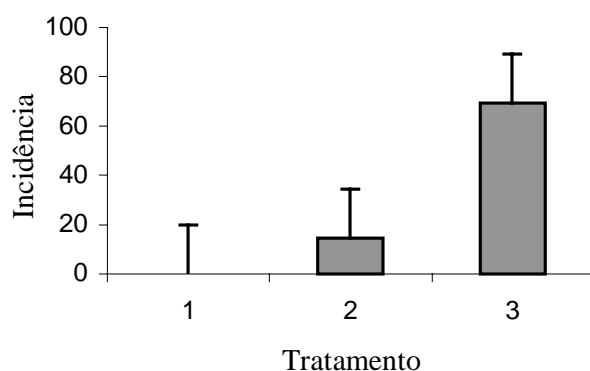


Figura 5- Ocorrência de lesões típicas (incidência) do ataque de *Corynespora cassiicola* isolado lantana, em plantas tratadas com: água (1), filtrado da suspensão conidial (2) e suspensão de conídios (3).

Tabela 11- Incidência de doença em lantana e tomateiro inoculados com conídios ou filtrado de isolados de *Corynespora cassiicola*.

HOSPEDEIRO	Conídios Lantana	Filtrado Lantana	Conídios Tomate	Filtrado Tomate
Lantana	+*	+	-	-
Tomateiro	-	-	+	-

* - = Sem sintomas, + = Sintomas característicos da enfermidade.

3.8. Produção de inóculo de *Corynespora cassiicola* isolado lantana

3.8.1. Substratos sólidos para produção de inóculo de *Corynespora cassiicola* isolado lantana

Apesar de demandar mais trabalho e tempo, a utilização da metodologia de produção de inóculo em substratos sólidos, permitiu a obtenção de maior quantidade de esporos que nas testadas anteriormente. Os conídios produzidos em sua maioria foram de pequeno tamanho, abaixo de 50 μm . Cinco dos substratos testados apresentaram esporulação superior aos demais: grãos de arroz, raiz de mandioca desidratada, grãos de sorgo, grãos de trigo e grãos de milho (Tabela 12). O substrato constituído por grãos de arroz, foi o que proporcionou maior facilidade de recuperação de conídios, já que os grãos permaneceram inteiros após a fricção com bastão de vidro.

3.8.2. Produção de inóculo de *Corynespora cassiicola* isolado lantana em substratos sólidos selecionados

Este método de produção de inóculo foi superior ao anterior (3.8.1.) quanto à recuperação dos conídios do fungo, devido à maior facilidade de fricção e agitação dos substratos. Os substratos permaneceram mais coesos, não se misturando aos conídios. Aparentemente o tratamento com grãos de arroz mostrou-se mais produtivo, mas esta diferença não foi detectada pelo

teste estatístico (Tabela 13). Os tratamentos grãos de arroz, raiz de mandioca e grãos de sorgo tiveram as médias igualadas, sendo diferentes apenas do tratamento constituído por grãos de milho, que foi considerado inferior aos demais, pelo teste de Tukey (P= 0,01).

Tabela 12- Esporulação de *Corynespora cassiicola* isolado lantana em substratos sólidos.

SUBSTRATO	ESPORULAÇÃO MÉDIA (esp.)	
	esp. x 10 ⁶	log (esp. x 10 ⁶)
Grãos de arroz	2,36	6,35 a*
Raiz de mandioca	2,15	6,32 a
Grãos de sorgo	1,79	6,24 a
Grãos de trigo	1,34	6,12 a b
Grãos de milho	1,23	6,08 a b
Canjiquinha de milho	0,76	5,86 b c
Grãos de caupi	0,47	5,66 c
Grãos de grão-de-bico	0,45	5,61 c d
Grãos de soja	0,34	5,50 d
Bagaço de cana	0,28	5,36 d

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (P= 0,01).

Tabela 13- Esporulação de *Corynespora cassiicola* isolado lantana em substratos sólidos selecionados.

SUBSTRATO	ESPORULAÇÃO MÉDIA (esp.)	
	esp. x 10 ⁶	log (esp. x 10 ⁶)
Grãos de arroz	2,76	6,42 a*
Raiz de mandioca	1,58	6,20 a
Grãos de sorgo	1,29	6,09 a
Grãos de milho	0,22	5,25 b

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (P= 0,01).

3.8.3. Fermentação difásica líquido-sólido na produção de inóculo de *Corynespora cassiicola* isolado lantana

Os resultados obtidos ao se empregar esta metodologia foram bastante inconsistentes, pois a esporulação encontrada na primeira coleta foi maior que nas demais. Com exceção da coleta inicial, todas as demais tiveram uma ou mais repetições com esporulação nula. A média da esporulação na primeira coleta foi de $3,12 \times 10^4$ conídios/mL e na última coleta de $1,87 \times 10^4$ conídios/mL, resultados considerados relativamente baixos quando comparados aos obtidos utilizando outras metodologias, citadas anteriormente. Pelos resultados, o processo de fermentação difásica líquido-sólido, nas condições em que foi conduzido o experimento, foi pouco eficiente para produzir inóculo de C.c.l.

4- DISCUSSÃO

Não foi difícil verificar a identidade de *Corynespora cassiicola* isolado em plantas de lantana, pela primeira vez no Brasil. Embora MEENU e KAMAL (1998) tenham relatado que nenhuma espécie de *Corynespora* havia sido relatada em *Lantana* spp., BARRETO et al. (1995) registraram um depósito do fungo *C. cassiicola* proveniente da Índia no Herbário do Instituto Internacional de Micologia (IMI 288610). A morfologia do fungo em *L. camara* encontrada no Brasil é similar àquela relatada na literatura (ELLIS, 1971; ELLIS e HOLLIDAY, 1971) confirmando tratar-se de *C. cassiicola*. Três outras espécies de *Corynespora* foram descritas em hospedeiros da família Verbenaceae (MEENU e KAMAL, 1998), são elas: *Corynespora siwalika* (Subram.) M. B. Ellis; *Corynespora viticus* Guo e *Corynespora nana* Meenu e Kamal. Essas espécies diferem entre si e de *C. cassiicola* pela cor, forma e tamanho de conidióforos e conídios.

Os isolados de diversos hospedeiros apesar de mostrarem diferenças culturais, apresentaram grande variabilidade no tamanho de conídios, demonstrando que este critério morfológico não seria adequado para a diferenciação de isolados do fungo provenientes de diferentes hospedeiros. AWOREDUN (1969) fazendo um estudo comparativo entre três isolados de *C. cassiicola*, sendo dois de seringueira e um de mamoeiro, observou diferenças nas dimensões das estruturas reprodutivas. Entretanto, estas diferenças não foram suficientes para que os isolados fossem considerados como taxa diferentes. ONESIROSAN et al. (1974), ao pesquisar isolados provenientes de 20 espécies de plantas de diversas partes do mundo, observaram que estes foram indistintos nas características de tamanho de conídio, forma e crescimento da cultura, apesar da grande variabilidade do tamanho de conídios dentro de cada isolado. Variações morfológicas e na esporulação de isolados de *C. cassicola* procedentes de seringueira no Sri Lanka levaram a SILVA et al. (1995) e SILVA et al. (1998) a compararem diferentes isolados do patógeno procedentes de diversos hospedeiros e localidades utilizando diferentes

técnicas baseadas em PCR. Os autores concluíram que não haviam diferenças genéticas detectáveis utilizando-se amplificação da região rDNA-ITS e posterior digestão com enzimas de restrição. Porém, conseguiram agrupar os isolados quanto à região de procedência com base na análise de RAPD/PCR.

O teste de especificidade demonstrou que, à exceção do isolado proveniente do tomateiro, isolados deste fungo parecem ser restritos a uma espécie, e, para C.c.l., a alguns biótipos do hospedeiro. Os resultados obtidos no teste de especificidade utilizando folhas destacadas colocam em dúvida a adequação da metodologia utilizada, pois esta parece ter induzido uma ampliação artificial do leque de hospedeiros dos isolados testados. A especificidade de isolados de *C. cassiicola* por determinados hospedeiros tem sido relatada por diversos autores. DUARTE et al. (1983) observaram que testes de inoculação cruzada entre isolados de mamoeiro e cacaueteiro nos hospedeiros mamoeiro, caupi, seringueira e cacaueteiro deram resultados diferentes. O isolado proveniente do mamoeiro infectou mamoeiro, caupi e seringueira e o de cacaueteiro infectou apenas cacaueteiro, sugerindo a existência de duas “raças” do patógeno. SILVA et al. (1998) observaram especialização por hospedeiro em isolados de *C. cassiicola* provenientes de diversos hospedeiros oriundos da Austrália e Sri Lanka. SPENCER e WALTERS (1969) sugeriram a existência de duas raças de *C. cassiicola* pela resposta de *Vigna sinensis* (Torner) Savi e *Glycine max* (L.) Merr., pela infecção de 14 isolados monoconidiais do fungo de diferentes origens, além das diferenças morfológicas e culturais encontradas. ONESIROSAN et al. (1974) consideram que embora *C. cassiicola* tenha um extenso leque de hospedeiros, as raças hospedeiro-específicas parecem ser numerosas e muito variadas no nível de sua especialidade. No entanto, foi observado que há uma aplicação inadequada da categoria raça pela maioria dos autores. Os resultados do presente trabalho em que se usou uma abordagem diferente, aplicando-se o teste centrífugo-filogenético, sugerem a classificação do isolado lantana como *formae specialis* dentro da espécie *C. cassiicola*. Parece também que os isolados de hortência e trapoeraba merecem o mesmo tratamento, embora para estes testes adicionais

sejam necessários. Há base para se suspeitar que em *C. cassiicola* existem *formae specialis*, populações inespecíficas e também raças.

Para C.c.1 foi verificado que o melhor meio de cultura para crescimento micelial foi o LSA e para um incremento na esporulação os melhores meios de cultura foram o CVA ou V8®, sob regime de luz contínua por 15 dias e a uma temperatura ótima de 23°C. Mesmo sobre ADA houve esporulação do fungo, provavelmente em função das reservas disponíveis no próprio disco de micélio. Com relação ao meio CVA, este tem sido um substituto adequado para o meio V8® (SANTOS-SEIXAS et al., 2000), proporcionando crescimento micelial e esporulação igual ou superior para diversos fungos, inclusive para *C. cassiicola*. Assim, para as condições brasileiras torna-se economicamente mais viável utilizar o meio de cultura CVA, já que o V8® é um produto importado e mais oneroso. Alguns autores tem observado comportamentos diversos de *C. cassiicola* em função do meio de cultura, regime de temperatura e luminosidade a que são submetidos (ALMEIDA e YAMASHITA, 1976; DUARTE et al., 1983). Os primeiros autores não observaram diferenças entre plantas inoculadas com esporos formados sob luz contínua daqueles formados no escuro, concluindo então que a infectividade dos esporos não é influenciada pelo meio de cultura nos quais foram produzidos, sob quaisquer condições luminosas testadas. Com relação à temperatura ideal para o desenvolvimento do fungo há uma concordância quanto a faixa, entre 20 a 30°C. Dos 14 isolados de *C. cassiicola* testados por SPENCER e WALTERS (1969), o máximo de crescimento fúngico ocorreu a 28°C em meio BDA. Esta mesma temperatura foi considerada ideal para ONESIROSAN et al. (1974) para promover o crescimento dos isolados por eles testados.

Pelos resultados relacionados ao período de molhamento foliar necessário para ocorrência da enfermidade, são necessárias seis horas para que se obtenha o máximo em eficiência no processo de infecção, e o patógeno suporta seis horas de atraso no molhamento foliar. O período de molhamento

foliar exigido para ocorrer a infecção do patógeno é uma variável bastante importante, sendo fator limitante para o sucesso de programas de controle biológico de plantas daninhas utilizando micoherbicidas, já que muitos candidatos necessitam de períodos de umidade muitas vezes acima de 24 horas (CHARUDATTAN, 1991; CARTWRIGHT e TEMPLETON, 1992). A limitação relacionada ao atraso de molhamento foliar pode ser diminuída pela escolha do momento de aplicação do micoherbicida no campo ou pela formulação com materiais que auxiliam a retenção de água na superfície foliar (CHARUDATTAN, 1991; BOYETTE et al., 1991; GREEN et al., 1998). No caso de C.c.l. parte-se de um patamar muito promissor, pois sua exigência de período de molhamento foliar não é elevada.

O impacto causado por uma segunda aplicação de C.c.l. na produção da doença, sugere a necessidade de mais aplicações do agente para o controle da planta daninha. Esta é uma das características de patógenos utilizados como micoherbicidas, que requerem aplicações sucessivas a fim de aumentar a taxa de infecção e em consequência a taxa de progresso da doença (WATSON, 1991; TEBEEST, 1992; FIGUEIREDO, 1995).

O período latente do patógeno observado sob condições experimentais foi de seis horas, e algumas folhas apresentavam maceração de tecidos antes da sintomatologia comumente exibida nas avaliações realizadas após 48 horas da inoculação. Isto sugeriu a participação de alguma toxina secretada por conídios do fungo, já que na grande maioria dos experimentos apenas esta estrutura de infecção havia sido usada como inóculo. Alguns autores relataram a presença de uma toxina secretada pelo micélio de *C. cassicola* cultivado em meio de cultura líquido (ONESIROSAN et al., 1975; SARMA e NAYUDU, 1975). O primeiro grupo considerou que a toxina seria um composto hidrófilo enquanto o segundo considerou que era hidrofóbico e solúvel em solventes como benzeno e acetato de etila. BRETON et al. (1997) estudando isolados de *C. cassicola* de seringueira conseguiram extrair uma toxina de conídios germinados na água e concluíram que a toxina secretada pelo fungo pode ser conduzida célula a célula e causar os mesmos sintomas foliares que inoculação

direta com conídios. No presente trabalho, a produção de sintomas característicos da doença como consequência da inoculação com o filtrado, demonstrou a presença de uma toxina secretada pelos conídios, com a mesma especificidade pelas plantas que a exibida pelo isolado. Abre-se então uma perspectiva para investigação, com a possibilidade de isolamento, caracterização e a síntese da substância ativa para uso como herbicida específico.

O fungo não esporolou em meio líquido e foi obtida uma baixa esporulação quando utilizada fermentação bifásica empregando uma modificação do método das bandejas. Para alguns autores, apesar de meios líquidos serem os preferidos na produção massal de bioherbicidas comerciais, a maioria dos candidatos, principalmente os hifomicetos, não produzem esporos neste tipo de meio de cultura (VÉZINA, 1965; PFIRTER et al., 1999). C.c.l. esporulou bem em meio sólido e os melhores substratos foram grãos de arroz, raiz de mandioca e grãos de sorgo, todos eles de fácil aquisição e relativamente baratos. Mesmo a esporulação em bagaço de cana foi bastante satisfatória, possibilitando a sua utilização em situações onde este material for de fácil obtenção. Isto atende o proposto por CHURCHILL (1982): “a meta da produção em massa de microorganismos a um baixo custo econômico pode ser obtida pelo uso de produtos agrícolas brutos que são realmente disponíveis em quantidades ilimitadas.” De acordo com ALVES e PEREIRA (1998), a produção de fungos sobre substratos sólidos é a forma mais comum em uso, por não necessitar de tecnologia sofisticada como a exigida pela fermentação líquida, podendo ser usada para a produção artesanal e semi-industrial de patógenos. O arroz tem sido testado e utilizado como substrato em fermentação sólida para produção de inóculo em diversas pesquisas envolvendo controle biológico de insetos e plantas daninhas (GREEN et al., 1998; ALVES e PEREIRA, 1998; POMELLA, 1999). Este cereal parece ser o substrato com maior viabilidade de utilização, por ser de mais fácil manuseio e obtenção que os demais substratos avaliados.

5- RESUMO E CONCLUSÕES

O fungo *Corynespora cassiicola*, ainda não descrito em *Lantana camara* no Brasil, foi encontrado no estado do Paraná, causando manchas foliares e desfolha na invasora. *Corynespora cassiicola* é patogênico a mais de 70 hospedeiros em diversos países, por isto é tido como um fungo inespecífico. Porém, segundo alguns estudos, determinados isolados da espécie possuem especificidade a seus hospedeiros. Procurou-se caracterizar, determinar as condições ideais para o crescimento e esporulação deste isolado, estudar a interação com lantana e desenvolver-se método eficiente para a produção de inóculo, buscando-se o controle biológico da planta daninha. A maioria das etapas necessárias para o desenvolvimento de um micoherbicida foram cumpridas.

Isolados do fungo de diferentes hospedeiros (hortênsia, lantana, soja, tomate e trapoeraba) apresentaram variações quanto às características culturais e tamanho de conídios. Mesmo partindo de culturas monoconidiais com classes de tamanho de conídio pré-estabelecido, a variação dos tamanhos de conídios produzidos posteriormente, a partir de cada isolado foi muito grande. Concluiu-se que o tamanho de conídios não é uma característica adequada para distinguir isolados diferentes.

Foram realizados três testes de especificidade: inoculações cruzadas entre quatro isolados de *C. cassiicola* em 24 espécies de plantas, testes “in vitro” e “in vivo” com isolados do fungo em biótipos selecionados de lantana. Os testes demonstraram a especificidade de C.c.l. a *L. camara*. Dos 17 biótipos testados de *Lantana* spp., o isolado foi patogênico a dez, porém, com variabilidade na severidade da doença. Pelas características da interação sugere-se classificar o isolado lantana como *formae specialis* dentro da espécie *C. cassiicola*.

Foram realizados ensaios para avaliar meios de cultura, temperatura e luminosidade para melhor crescimento micelial e esporulação de C.c.l. O melhor meio de cultura para promover o crescimento micelial foi o LSA,

constituído de folhas de lantana, sacarose e ágar. As melhores combinações de meio de cultura e luminosidade para incrementar a esporulação foram os meios CVA (caldo de vegetais-ágar) ou V8® mantidos sob luz contínua por um período de 15 dias. Para as condições brasileiras, o meio de cultura mais indicado para utilização foi o CVA, por ser um substituto adequado ao V8®. A faixa de temperatura ideal para a esporulação do fungo foi entre 20 e 28°C, sendo a temperatura ótima estimada em 23°C.

A concentração mínima de conídios na suspensão a ser usado como inóculo para provocar doença foi de 1×10^5 conídios/ml, porém a concentração a partir de 10^6 garantiu melhores resultados.

Quando expostas a um mínimo de seis horas de molhamento foliar, plantas de lantana inoculadas com C.c.l. apresentaram 100% de ocorrência da doença e acima de 70% de desfolha. Até seis horas de atraso no molhamento foliar, após a inoculação, a infecção não foi prejudicada.

Verificou-se que além de conídios do fungo também suspensão de micélio fúngico e filtrado derivado de conídios germinados podem provocar os sintomas da doença. Aplicações com o filtrado deram indícios da presença de uma toxina excretada pelos conídios germinados do fungo. Plantas inoculadas por uma segunda vez apresentaram maior severidade nos sintomas e dificuldade no desenvolvimento, ocasionalmente podendo chegar à morte. Não houve esporulação em meio líquido e a fermentação bifásica não foi adequada para a produção de conídios de C.c.l. Este isolado, porém, esporulou bem em substratos sólidos. Os substratos sobre os quais o fungo esporulou melhor foram grãos de arroz, raiz de mandioca e grãos de sorgo. O arroz parece ser o substrato mais adequado por ter induzido à esporulação mais abundante, ser de mais fácil manuseio que os demais avaliados.

Este conjunto de informações evidencia que *C. cassicola* f. sp. *lantanae* tem grande potencial para o desenvolvimento de um micoherbicida para o controle de *L. camara*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, E.B., LINE, R.S. Biology of *Puccinia chondrillina* Washington. **Phytopathology**, v.74, p.742-745, 1984.
- AINSWORTH, G.C. **Introduction to the history of Mycology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1976. 359 p.
- ALMEIDA, A.M.R., YAMASHITA, J. Crescimento e esporulação de *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei em diferentes meios de cultura. **Fitopatologia Brasileira**, v. 1, p. 203-206, 1976.
- ALMEIDA, A.M.R., YAMASHITA, J. Efeito da técnica de inoculação de *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei na reação de três cultivares de soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 3, p. 55-58, 1978.
- ALVES, S.B., PEREIRA, R.M. Produção de fungos entomopatogênicos. In ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**, 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 845-869.
- ARTHUR, J.C. Uredinales collected by Fred J. Seaver in Trinidad. **Mycologia**, v. 14, p. 12-24, 1922.
- AULD, B.A., MEDD, R.W. **Weeds: an illustrated botanical guide to the weeds of Australia**. Melbourne: Inkata Press, 1992. 255 p.
- AWOREDUN, V.A. A new leaf spot of Para rubber (*Hevea brasiliensis*) in Nigeria. **Plant Disease Reporter**, v. 53, p. 406-408, 1969.
- BAGYANARAYNA, G., RAVINDE, J., RAMESH, P. *Prospodium tirumalensis* a new species from India. **Mycotaxon**, v. 69, p. 473-476, 1998.
- BARRETO, R.W. **Studies on the pathogenic microflora of selected weeds of the state of Rio de Janeiro (Brasil)**. Reading, Reino Unido: University of Reading, 1991. 588p. Tese (Doutorado em Botânica) - University of Reading, 1991.
- BARRETO, R.W., EVANS, H.C., ELLISON, C.A. The mycobiota of the weed *Lantana camara* in Brazil, with particular reference to biological control. **Mycological Research**, v. 99, p. 769-782, 1995.
- BARTHOLOMEW, B.L. A new look at lantana control. **Queensland Agricultural Journal**, v.104, p. 339-344, 1978.

- BERNDT, R. New species of neotropical rust fungi. **Mycologia**, v.90, p. 518-526, 1998.
- BOYETCHKO, S.M. Principles of biological weed control with microorganisms. **HortScience**, v. 32, p. 201-205, 1997.
- BOYETTE, C.D., QUIMBY JUNIOR, P.C., CONNICK JUNIOR, W.J., DAIGLE, D.J., FULGHAM, F.E. Progress in the production, formulation and application of mycoherbicides. In: TEBEEST, D.O. (Ed.). **Microbial control of weeds**. New York: Chapman & Hall, 1991. p. 209-222.
- BRETON, F., GARCIA, D., SANIER, C., ESCHBACH, J.M., D'AUZAC, J. L'interaction entre *Corynespora cassiicola* et *Hevea brasiliensis*. **Plantations, recherche, développement**, v. 4, p. 322-335, 1997.
- BROUGHTON, S. Review and evaluation of Lantana biocontrol programs. **Biological Control**, v.17, p. 272-286, 2000.
- BRUZZESE, E., FIELD, R.P. Occurrence and spread of *Phragmidium violaceum* on blackberry (*Rubus fruticosus*) in Victoria, Australia. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL CONTROL OF WEEDS. 6, 1985, Vancouver **Proceedings...** Vancouver: Agriculture Canada, 1984, p. 609- 612.
- BRUZZESE, E., HASAN, S. A whole leaf clearing technique for host specificity studies of rust fungi. **Plant Pathology**, v. 32, p. 335-338, 1983.
- CAMARGO, L.E.A. Análise genética da resistência e da patogenicidade. In: BERGAMIM FILHO, A., KIMATI, H.L., AMORIM, L. (Eds.). **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres , 1995. v.1, p. 470-492.
- CARTWRIGHT, D.K., TEMPLETON, G.E. Preliminary assesment of *Colletotrichum capsici* as a potential mycoherbicide for control of pitted morninglory. **Plant Disease**, v.76, p. 995-998, 1992.
- CHARUDATTAN, R. The mycoherbicide approach with plant pathogens. In: TEBEEST, D.O. (Ed.). **Microbial control of weeds**. New York: Chapman & Hall, 1991. p. 24-57.
- CHURCHILL, B.W. Mass production of microorganisms for biological control. In: CHARUDATTAN, R., WALKER, H.L. (Eds.). **Biological control of weeds with plant pathogens**. New York: John Willey & Sons, 1982. p. 139-156.

- CILLIERS, C.J., NESER, S. Biological control of *Lantana camara* (Verbenaceae) in South Africa. **Agricultura, Ecosystems and Environment**, v.37, p. 57-75, 1991.
- CRAFTS, A.S. **Modern weed control**. Berkeley: University of California, 1975. 440p.
- CRAFTS, A.S., ROBBINS, W.W. **Weed control**. New York: Mc Graw-hill Book, 1962. 3. ed. 660p.
- CUBERO, O.F., CRESPO, A., FATEHI, J., BRIDGE, P.D. DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium stored lichenized and other fungi. **Plant systematics and evolution**, v.216, p. 243-24, 1999.
- CULLEN, J.M., KABLE, P.F., CATTI, M. Epidemic spread of a rust imported for biological control. **Nature**, v.244, p. 462-464, 1973.
- CULVENOR, C.C.J. Economic losses due to poisonous plants in Australia. In: AUSTRALIA- USA POISONOUS PLANTS SYMPOSIUM, 1, 1984, Brisbane. **Proceedings...** Brisbane, Australia: Queensland Department of Plant Toxicology, p.14-18. 1985.
- CUMMINS, G.B. The Genus *Prospodium* (Uredinales). **Lloydia**, v.3, p. 1-76. 1940.
- CUMMINS, G.B., HIRATSUKA, Y. **Illustrated genera of rust fungi**. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1983, 152 p.
- DAY, M.D., WILLSON, B.W., LATIMER, K.J. The life history and host range of *Ectaga garcia*, a biological control agent for *Lantana camara* and *L. montividentis* in Australia. **BioControl**, v.43, p. 325-338, 1998.
- DEN BREEÏEN, A., MORRIS, M.J., SERDANI, M. Host specificity studies of the pathogen *Mycovellosiella lantanae* var. *Lantanae* for the biological control of *Lantana camara* in South Africa. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF BIOLOGICAL CONTROL OF WEEDS, 10, 1999, Montana. **Abstracts...** Montana, 1999. p. 90.
- DENTON, G.R.W., MUNIAPPAN, R., MARUTANI, M. Status and natural enemies of the weed, *Lantana camara*, in Micronesia. **Tropical Pest Management**, v.37, p.338-344, 1991a.

- DENTON, G.R.W., MUNIAPPAN, R., MARUTANI, M. The distribution and biological control of *Lantana camara* in Micronesia. **Micronesica Supplement**, v.3, p. 71-81, 1991b.
- DUARTE, M.L.R., ALBUQUERQUE, F.C., PRABHU, A., S. Uma nova enfermidade foliar do cacau (Theobroma cacao L.) causada pelo fungo *Corynespora cassiicola* (Berk & Curt) Wei. **Fitopatologia Brasileira**, v. 3, p. 259-265, 1978.
- DUARTE, M.L.R., ASANO, S., ALBUQUERQUE, F.C. Estudo comparativo das características morfológicas e fisiológicas de dois isolamentos de *Corynespora cassiicola*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 8, p. 205-214, 1983.
- ELLIS, M.B. **Dematiaceous hyphomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute. 1971. 608p.
- ELLIS, M.B., HOLLIDAY, P. *Corynespora cassiicola*. **C.M.I. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria**, n. 303. Londres: CAB, 1971.
- ELLISON, C.A. **Report on the present status of the biological control programme for Lantana camara using fungal pathogens**. Ascot: International Institute of Biological Control, 1996. 31p.
- ELLISON, C.A., THOMAS, S. Interpretation of host specificity studies in relation to the biological control of the invasive shrub *Lantana camara* with the rust *Prospodium tuberculatum*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 7, 1998, Scotland. **Abstracts...** Scotland, n. 2.2.83. 1998.
- EVANS, H.C. Fungal pathogens of some subtropical and tropical weeds and the possibilities for biological control. **Biocontrol News and Information**, v.1, p. 7-30, 1987a.
- EVANS, H.C. Life-cycle of *Puccinia abrupta* var. *parthenicola*, a potential biological control agent of *Parthenium hysterophorus*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.88, p. 105-111, 1987b.
- EVANS, H.C. Studies on the rust *Maravalia cryptostegiae*, a potential biological control agent of rubber-vine weed (*Cryptostegia grandiflora*, Asclepiadaceae: Periplocoideae in Australia, I: Life-cycle. **Mycopathologia**, v.124, p. 163-174. 1993.
- EVANS, H.C., CARRIÓN, G, RUIZ-BELIN, F. Mycobiota of the giant sensitive plant, *Mimosa pigra sensu lato* in the Neotropics. **Mycological Research**, v. 99, p.420-428, 1995.

- FALEIRO, F.G. **Identificação de raças, diversidade genética de *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus* e herança da resistência no feijoeiro**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 65p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- FENSHAM, R.J., FAIRFAX, R.J., CANNELL, R.J. The invasion of *Lantana camara* L. in Forty Mile Scrub National Park, north Queensland. **Australian Journal of Ecology**, v.19, p. 297-305, 1994.
- FERREIRA, F.A., HENNEN, J.F. The life cycle, pathology and taxonomy of the rust *Prospodium bicolor* sp. nov., on yellow ipê, *Tabebuia serratifolia*, in Brazil. **Mycologia**, v.78, p. 795-803, 1986.
- FERREIRA, M.E., GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA- CENARGEN, 1995. 220p.
- FIGUEIREDO, G. Herbicidas microbiológicos empregados no controle de plantas daninhas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.3, p.111-132, 1995.
- FIGUEIREDO, M.B., DE CARVALHO JUNIOR, A.A. Effect of sori washing in the germination of telioid teliospores of *Puccinia pampeana*. **Summa Phytopathologica**, v.20, p. 101-104, 1994.
- FIGUEIREDO, M.B., PIMENTEL, C.P.V., RUSSOMANNO, M.R., COUTINHO, L.N. Biologia da espécie biteliomórfica *Puccinia pampeana* Speg.- *Endophyllum pampeanum* (Speg.) Lindq., ferrugem da pimenta e do pimentão (*Capsicum* spp.). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.54, p.1-10, 1987.
- FULTON, T., CHUNWONGSE, J., TANKSLEY, S. D. Micropreparation protocol for extraction of DNA from tomato and others herbaceous plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 13, p.207-209, 1995.
- GARDES, M., BRUNS, T.D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes- application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, v.2, p. 113-118, 1993.
- GASPAROTTO, L., FERREIRA, F.A., JUNQUEIRA, N.T.V. Mancha de *Corynespora* em folhas de seringueira (*Hevea brasiliensis*) no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 13, p. 278-280. 1988.

- GLADDING, S. *Lantana camara*. **Australian Journal of Medicinal Herbalism**, v.7, p. 5-9. 1995.
- GREATHEAD, D.J. Biological control of *Lantana* - A review and discussion of recent developments in East Africa. **PANS (C)**, v.14, p.167-175, 1968.
- GREEN, S., STEWART-WADE, S.M., BOLAND, G.J., TESHLE, M.P., LIU, S.H. Formulating microorganisms for biological control of weeds. In: BOLAND, G.J., KUYKENDALL, L.D. (Eds.). **Plant-microbe interactions and biological control**. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 249-281.
- HANNAN-JONES, M.A. The seasonal response of *Lantana camara* to selected herbicides. **Weed Research**, v.38, p. 413-423, 1998.
- HARLEY, K.L.S. Biological control of *Lantana*. **PANS**, v.17, p. 433-437, 1971.
- HASAN, S., WAPSHERE, A.J. The biology of *Puccinia chondrillina* a potential biological control agent of skeleton weed. **Annual Applied Biology**, v.74, p. 325-332, 1973.
- HAWKSWORTH, D.L., KIRK, P.M., SUTTON, B.C., PEGLER, D.N. **Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi**. 8. ed. Egham: CAB International, 1995. 616p.
- HENDERSON, L. **Plant invaders of South Africa**. Pretória: Plant Protection Research Institute, 1995. 177p. (Handbook, 5).
- HENNEN, J.F., FIGUEIREDO, M.B. The life cycle of *Hemileia vastatrix*? In: SIMPÓSIO SOBRE FERRUGENS DO CAFEEIRO, 1984. Oeiras. **Proceedings...** Oeiras, Portugal: Instituto de Investigação Científica Tropical, p. 47-56.
- HOLM, L.G., PANCHO, J.V., HERBERGER, J.P., PLUCKNETT, D.U. **A geographical atlas of world weeds**. New York: John Wiley and Sons, 1979. 391p.
- HOLM, L.G., PLUCKNETT, D.L., PANCHO, J.V, et al. **The world's worst weeds. Distribution and biology**. Honolulu: University Press of Hawaii, 1977. 609p.
- JACKSON, M.A., SCHISLER, D.A., SLININGER, P.J., BOYETTE, C.D., SILMAN, R.W., BOTHAST, R.J. Fermentation strategies for improving the fitness of a bioherbicide. **Weed Technology**, v. 10, p. 645-650, 1996.

- JOHNSTON, A., BOOTH, C. **Plant pathologist's pocketbook**. 2. ed. Slough: CAB International, 1983. 439p.
- JULIEN, M.H. **Biological control of weeds: a world catalogue of agents and their target weeds**. 3. ed. Brisbane: CAB International, 1992. 186p.
- KILLGORE, E.M., SUGYIAMA, S., BARRETO, R.W., GARDENER, D.E. Evaluation of *Colletorichum gloeosporioides* for biological control of *Miconia calvescens* in Hawaii. **Plant Disease**, v.83, p. 964. 1999.
- KISSMANN, K.G., GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF Brasileira, 1991. v.3, 683p.
- LAMP, C., COLLET, F. **Field guide to weeds in Australia**. Melbourne: Inkata Press, 1989. 300 p.
- LEROY, M., LOURD, M. Doença foliar fo tomateiro causada por *Corynespora cassiicola* em Manaus. **Fitopatologia Brasileira**, v. 14, p. 32-38, 1989.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 1991, 440p.
- MAIERO, M., BEAN, G.A., NG, T.J. Toxin production by *Alternaria solani* and its related phytotoxicity to tomato breeding lines. **Phytopatology**, v. 81, p. 1030-1033, 1991.
- MEENU, M., KAMAL, K. New species of *Corynespora*. **Mycological Research**, v. 102, p. 344-346, 1998.
- MORRIS, M.J., WOOD, A.R., DEN BREEÿ, A. Plant pathogens and biological control of weeds in South Africa: a review of projects and progress during the last decade. **African Entomology Memoir**, v.1, p. 129-137, 1999.
- MORTON, J.F. Lantan or red sage (*Lantana camara* L., [Verbenaceae]), notorious weed and popular garden flower: some cases of poisoning in Florida. **Economic Botany**, v.48, p.259-270, 1994.
- MUNIR, A.A. A taxonomic review of *Lantana camara* L. and *L. montividentis* (Spreng.) Briq. (Verbenaceae) in Australia. **Journal of Adelaide Botanical Garden**, v.17, p.1-27, 1996.

- NESER, S., CILLIERS, C.J. Work towards biological control of *Lantana camara*: perspectives. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM BIOLOGICAL CONTROL OF WEEDS, 7, 1988, Roma. **Proceedings...** Italy: Federconsorzi Conference Hall, 1990. p.363-369.
- OEHRENS, E.B. Biological control of blackberry through the introduction of rust *Phragmidium violaceum* in Chile. **FAO Plant Protection Bulletin**, v.25, p.26-28, 1977.
- ONESIROSAN, P.T., ARNY, D.C., DURBIN, R.D. Host specificity of Nigerian and North American isolates of *Corynespora cassiicola*. **Phytopathology**, v. 64, p. 1364-1367, 1974.
- ONESIROSAN, P.T., MABUNI, C.T., DURBIN, R.D. MORIN, R.B., RICH, D.H., ARNY, D.C. Toxin production by *Corynespora cassiicola*. **Physiological Plant Pathology**, v.5, p. 289-295, 1975.
- PALMER, W.A., PULLEN, K.R. The phytophagous arthropods associated with *Lantana camara*, *L. hirsuta*, *L. urticifolia*, and *L. urticoides* (Verbenaceae) in North America. **Biological Control**, v.5, p.54-72, 1995.
- PARSONS, W.T., CUTHBERTSON, E.G. Common lantana. In: PARSONS, W.T., CUTHBERTSON, E.G. (Eds.). **Noxious weeds of Australia**. Melbourne: Inkata Press, 1992. p. 627-632.
- PEREIRA, J.M. **A micobiota fitopatogênica associada à planta invasora *Lantana camara* L. com ênfase no Estado de Minas Gerais- Brasil**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 72p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- PÉREZ, S. Diferenciación de aislamientos de *Alternaria solani* sor por la toxicidad de sus filtrados. **Revista of Protección Vegetal**, v.12, p. 127-129, 1997.
- PFIRTER, H.A., GUNTALI, D., RUESS, M., DÉFAGO, G. Preservation, mass production and storage of *Stagonospora convolvuli*, a bioherbicide candidate for field bindweed (*Convolvulus arvensis*). **BioControl**, v. 44, p. 437-447, 1999.
- POLLACK, F.G., STEVENSON, J.A. A fungal pathogen of *Broussonetia papyrifera* collected by George Washington Carver. **Plant Disease Reporter**, v. 57, p. 296-297, 1973.
- POMELLA, A.W.V. **Estudo do patógeno *Duosporium yamadanum* (Matsuura) Tsuda & Ueyama como micoherbicida para o controle de**

- Cyperus rotundus* L. (tiririca) no Brasil.** Viçosa, MG: UFV, 1999. 218p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- POUND, G.S., STAHMANN, M.A. The production of a toxic material by *Alternaria solani* and its relation to the early blight disease of tomato. **Phytopathology**, v. 41, p. 1104-114, 1951.
- REZENDE, D.V. **Patogênese da ferrugem (*Prospodium tecomicola*) do ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*).** Viçosa, MG: UFV, 1986. 52p. Tese (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 1986.
- SADLER, D.A., CARTWRIGHT, R.D., TEMPLETON, G.E. The holomorph connection of *Aecidium pluchae* and *Puccinia angustatoides*. **Mycologia**, v.88, n.2, p. 171-173, 1996.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- SANTOS-SEIXAS, C.D., PEREIRA, J.M., BARRETO, R.W. Caldo de vegetais-ágar: um substituto adequado para o meio V8®- ágar. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 419, 2000.
- SARMA, Y.R., NAYUDU, M.V. Toxin production by *Corynespora cassicola* (Berk and Curt) Wei. **Current Science**, v.44, p.172, 1975.
- SCOTT, L., GRAHAM. G.C., HANNAN-JONES, M., YEATES, D.K. DNA profiling resolves the limited importance of flower colour in defining varieties of *Lantana camara*. **Electrophoresis**, v. 18, p.1560-1563, 1997.
- SEN SARMA, P.K., MISHRA, S.C. Biological control of forest weeds in India - Retrospect and prospects. **Indian Forester**, v.112, p. 1088-1093, 1986.
- SHUTTLEWORTH, F.S. Studies of subtropical rusts. I- *Prospodium transformans*. **Mycologia**, v. 45, p. 437-449, 1953.
- SILVA, W.P.K., DEVERALL, B.J., LYON, B.R. Molecular, physiological and pathological characterization of *Corynespora* leaf spot fungi from rubber plantations in Sri Lanka. **Plant Pathology**, v.47, p. 267-277, 1998.
- SILVA, W.P.K., MULTANI, D.S., DEVERALL, B.J., LYON, B.R. RFLP and RAPD analyses in the identification and differentiation of isolates of the

- leaf spot fungus *Corynespora cassiicola*. **Australian Journal of Botany**, v. 43, p. 609-618, 1995.
- SHTIENBER, D., VINTAL, H. Environment influences on the development of *Puccinia helianthi* in sunflower. **Phytopathology**, v.85, p. 1388-1393, 1995.
- SPENCER, J.A., WALTERS, H.J. Variations in certain isolates of *Corynespora cassiicola*. **Phytopathology**, v.59, p. 58-60, 1969.
- STIRTON, C.H. Lantana. In: STIRTON, C.H. (Ed.). **Plant invaders: beautiful, but dangerous**. Cape Town: The Department of Nature and Environmental Conservation of the Cape Provincial Administration, 1980. p. 88-91.
- STIRTON, C.H. Some thoughts on the polyploid complex *Lantana camara* L. In: NATIONAL WEED CONFERENCE, 2, 1977, Cape Town. **Proceedings...** Cape Town: University of Cape Town, 1977. p.321-344.
- SWARBRICK, J.T. History of the lantanas in Australia and origins of the weedy biotypes. **Plant Protection Quarterly**, v.1, p. 115-121, 1986.
- TANAKA, Y., MURATA, N., KATO, K. Behavior of nucleic acid and chromosomes during ascus development in the mating between either rice-strain or weeping lovegrass-strain and ragi-strain of *Pyricularia*. **Annual Phytopathology Society of Japan**, v.45, p. 182-191, 1979.
- TAYLOR, E.E. A history of biological control of *Lantana camara* in New South Wales. **Plant Protection Quarterly**, v.4, p. 61-65. 1989.
- TEBEEST, D.O., YANG, X.B, CISAR, C.R. The status of biological control of weeds with fungal pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.30, p. 637-657, 1992.
- THOMAS, S.E., ELLISON, C.A. A century of classical biological control of *Lantana camara*: can pathogens make a significant difference? In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF BIOLOGICAL CONTROL OF WEEDS, 10, 1999, Montana. **Abstracts...** Montana, 1999. p. 70.
- TRUJILLO, E.E., NORMAN, D.J. Septoria leaf spot of Lantana from Ecuador: a potential biological control for bush lantana in forests of Hawaii. **Plant Disease**, v.79, p. 819-821, 1995.
- TURNER, C.E. Biological approaches to weed management. In: MADDEN, J.P. (Ed.). **Beyond pesticides: biological approaches to pest**

- management in California.** California: University of California, 1992, p.32-67.
- VÉZINA, C., KARTAR, S., SEHGAL, S.N. Sporulation of filamentous fungi in submerged culture. **Mycologia**, v. 57, p. 722-736, 1965.
- WAPSHERE, A.J. A strategy for evaluating the safety of organisms for biological weed control. **Annual Applied Biology**, v.77, p.201-211,1974.
- WATERHOUSE, D.F., NORRIS, K.R. *Lantana camara* Linnaeus. In: WATERHOUSE, D.F., NORRIS, K.R. (Ed.). **Biological control: pacific prospects.** Melbourne: Inkata Press, 1987. p. 355-372.
- WATSON, A.K. The classical approach with plant pathogens. In: TE BEEST, D.O. (Ed.). **Microbial control of weeds.** New York: Chapman and Hall, 1991. p. 3-23.
- WINDER, J.A., HARLEY, K.L.S. The effects of natural enemies on the growth of *Lantana* in Brazil. **Bulletim Entomology Research**, v.27, p.599-616, 1982.
- WINDER, J.A., HARLEY, K.L.S. The phytophagous insects on *Lantana* in Brazil and their potential for biological control in Australia. **Tropical Pest Management**, v.29, p. 346- 362, 1983.
- WHITE, T.J., BRUNS, T.D., LEE, S., TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal DNA gens for phylogenetics. In: INNIS, M.A., GELFAND, D.H., SNINSKY, J.J., WHITE, T.J. (Eds.). **PCR protocols.** New York: Academic Press. 1990.
- YON, C.S., GLAWE, D.A., SHAW, P.D. A method for rapid small-scale preparation of fungal DNA. **Mycologia**, v.83, p. 835-838, 1991.
- ZAMBOLIM, L., CHAVES, G.M. Efeito de baixas temperaturas e do binômio temperatura-umidade relativa sobre a variabilidade dos uredosporos de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. e *Uromyces phaseoli typice* Arth. **Experientiae**, v.17, p. 151-184, 1974.