



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - POSAGRO

ROSIANNE NARA THOMÉ BARBOSA

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS ENTRE *Cercospora* E *Ipomoea* spp.
(CORDAS-DE-VIOLA) VISANDO O CONTROLE BIOLÓGICO

BOA VISTA, RR

2018

ROSIANNE NARA THOMÉ BARBOSA

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS ENTRE *Cercospora* E *Ipomoea* spp.
(CORDAS-DE-VIOLA) VISANDO O CONTROLE BIOLÓGICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal de Roraima, em parceria com a Embrapa Roraima, como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Agronomia, na área de concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Pesquisador Dr. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira

Coorientador: Pesquisador Dr. Daniel Augusto Schurt

Coorientadora: Pesquisadora Dra. Kátia de Lima Nechet

BOA VISTA, RR

2018

Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Roraima

B238a Barbosa, Rosianne Nara Thomé.
Aspectos epidemiológicos entre *Cercospora* e *Ipomoea* spp.
(Cordas-de-Viola) visando o controle biológico / Rosianne Nara Thomé.
– Boa Vista, 2018.
87 f. : il.

Orientador: Pesquisador Dr. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira.
Coorientadores: Pesquisador Dr. Daniel Augusto Schurt e
Pesquisadora Dra. Kátia de Lima Nchet.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Roraima, Programa de
Pós-Graduação em Agronomia.

1 – *Ipomoea grandifolia*. 2 – *Ipomoea heredifolia*. 3 – *Ipomoea nil*. 4
– *Ipomoea quamoclit* 5 – Epidemiologia. I – Título. II – Vieira,
Bernardo de Almeida Halfeld (Orientador). III – Schurt, Daniel
Augusto (coorientador). IV – Nchet, Kátia de Lima (coorientadora).

CDU – 632.1

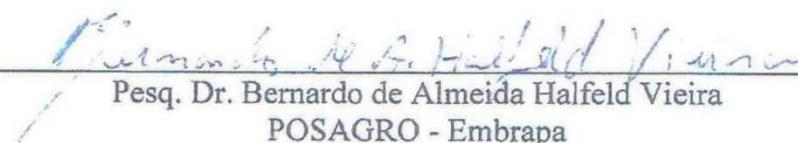
Ficha Catalográfica elaborada pela: Bibliotecária/Documentalista:
Marcilene Feio Lima - CRB-11/507-AM

ROSIANNE NARA THOMÉ BARBOSA

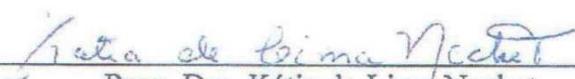
ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS ENTRE *Cercospora* E *Ipomoea* spp.
(CORDAS-DE-VIOLA) VISANDO O CONTROLE BIOLÓGICO

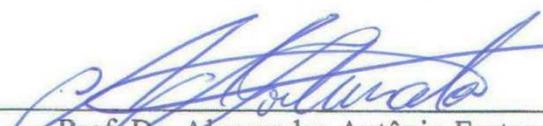
Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal de Roraima, em parceria com a Embrapa Roraima, como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Agronomia, na área de concentração: Produção Vegetal.

Aprovado: 06 de abril de 2018.


Pesq. Dr. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira
POSAGRO - Embrapa


Pesq. Dr. Daniel Augusto Schurt
Coorientador - Embrapa


Pesq. Dra. Kátia de Lima Nechet
Coorientadora - Embrapa


Prof. Dr. Alessandro Antônio Fortunato
UFRR


Profa. Dra. Kedma da Silva Matos
UFRR

À DEUS, Senhor de minha vida.

Dedico e agradeço.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Roraima e Embrapa Roraima, pelo Programa de Pós-graduação em Agronomia.

Ao Dr. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira e a Dra. Kátia de Lima Nechet, mesmo à distância, pela confiança a mim concedida, paciência e excelente orientação.

Ao Dr. Daniel Augusto Schurt, pela excelente orientação e, principalmente, por suportar todo meu estresse e ainda ser meu amigo.

Aos membros da banca, Dra. Hyanameyka Evangelista de Lima Primo, Dr. Alessandro Antônio Fortunato e Dra. Kedma da Silva Matos, por aceitarem o convite e pelas sugestões para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do curso, pelo amor dedicado a sua profissão e excelente trabalho desenvolvido no curso.

Ao Dr. Jefferson Fernandes do Nascimento, pelo incentivo, para tornar realidade o que era apenas um sonho.

Ao Engenheiro Agrônomo Roberto Carlos da Silva, que me concedeu a oportunidade de trilhar esse novo desafio.

À Álvaro Luís Calegari, Wellington Costa Rodrigues Do Ó e Erwin João de Moraes Lima, pelo apoio no início do curso de Doutorado em Agronomia.

À Sra. Consolata Faria Alves, Coordenadora Geral de Recursos Humanos do Governo do Estado de Roraima, por conceder-me horário especial para cursar o Doutorado em Agronomia.

Ao Secretário de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Gilzimar Almeida Barbosa, aos Engenheiros Agrônomos, Wolney Costa Parente Júnior, Eliézer de Souza Campos e Francisco Wolney Costa da Silva, aos servidores do DATER e Divisão Técnica, pelo apoio incondicional durante todo o curso de Doutorado em Agronomia.

À Aline Ferreira dos Santos, Gabriela Queiroz Pelzer, Giovanni Ribeiro de Souza, Inaira Leoni de Souza, Maria Santana Xavier Filha, Moriele Ladislau de Oliveira, Richarles Martins Izidório e Victor Castro da Silva, equipe do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Roraima, pelo companheirismo, amizade e constante apoio na execução deste trabalho.

Aos funcionários da Embrapa Roraima, em especial, Adebaldo Sampaio Teles, Eliane do Nascimento Cunha Farias, Márcio André de Melo e Silva, Hugo Moreira da Costa, Ilda Maria Sobral de Almeida e Waldir Pereira de Matos, pela ajuda e amizade, durante a condução deste trabalho.

Aos meus pais, Lázaro Barbosa e Ivilete Thomé Barbosa, ao meu esposo, Antônio Maurício da Silva Peixoto, à minhas irmãs, Rossana Cristine Thomé Barbosa Almeida e Rosirene Cláudia Thomé Barbosa, pela compreensão, quando estive inúmeras vezes ausente.

Aos meus sobrinhos, Emanuele Maria, Amanda Cristine, Analu e Nicolas, pelo carinho a mim concedido, e que meu esforço seja inspiração para o seu futuro profissional.

À todos, serei eternamente grata. Muitíssimo obrigada.

Deus não dá prova superior às forças daquele que a pede; só permite as que podem ser cumpridas. Se tal não sucede, não é que falte possibilidade: falta à vontade.

(SANTO AGOSTINHO, 1862)

RESUMO

As cordas-de-viola (*Ipomoea* spp.) são as principais plantas invasoras da cultura da cana-de-açúcar no Brasil. No sistema de cana-crua, germinam sob a camada de palha e seus ramos se fixam aos colmos dificultando a colheita mecanizada. A manutenção da palhada no solo tem reduzido à eficácia dos herbicidas e comprometido o controle dessa invasora. Neste contexto, o uso de mico-herbicidas pode ser uma estratégia de controle alternativo das espécies de corda-de-viola. Assim, objetivo do trabalho foi selecionar isolados de *Cercospora* com potencial de controle de *Ipomoea* spp. para fins de desenvolvimento de um mico-herbicida. Oito isolados de *Cercospora* foram inoculados em *Ipomoea nil* para a seleção dos mais agressivos a partir de avaliações semanais de incidência e severidade da doença e desfolha. Quatro isolados, CMAA-1441, CMAA-1444, CMAA-1449 e CMAA-1710, foram selecionados para os estudos epidemiológicos de concentração de inóculo, de período de molhamento foliar e estágio fenológico da planta para identificar as condições ótimas de desenvolvimento da cercosporiose em condições controladas. Os ensaios foram conduzidos separadamente e com avaliações semanais de incidência da doença e desfolha. A partir do estabelecimento dos parâmetros epidemiológicos para o desenvolvimento da cercosporiose em *I. nil*, foi realizada a inoculação dos isolados em *Ipomoea grandifolia*, *Ipomoea hederifolia* e *Ipomoea quamoclit* e avaliações semanais de incidência e severidade da doença e desfolha. Os isolados de *Cercospora* CMAA-1441, CMAA-1444, CMAA-1449 e CMAA-1710 foram selecionados na etapa inicial por causarem maior incidência e maior severidade final da doença. Além disso, os isolados CMAA-1449 e CMAA-1710 causaram desfolha em *I. nil*. Nos ensaios epidemiológicos, a maior incidência de doença e desfolha de *I. nil* foi obtida em plantas inoculadas no estágio de 2 a 3 folhas definitivas, utilizando-se 10^7 fragmentos de micélio mL⁻¹, e submetidas a 6 h (CMAA-1441, CMAA-1444 e CMAA-1449) e 12 h (CMAA-1710) de molhamento foliar. Além de *I. nil*, os isolados CMAA-1441 e CMAA-1710 foram patogênicos a *I. quamoclit*, *I. hederifolia* e *I. grandifolia*. O isolado CMAA 1449 foi específico a *I. nil* e *I. quamoclit*, enquanto o isolado CMAA-1444 foi específico a *I. nil*. Apenas os isolados CMAA-1441 e CMAA-1449 causaram desfolha e, esta foi restrita a *I. nil*

Palavras-chave: *Ipomoea grandifolia*, *Ipomoea hederifolia*, *Ipomoea nil*, *Ipomoea quamoclit*, Epidemiologia, Mico-herbicida.

ABSTRACT

Morningglories (*Ipomoea* spp.) are important weeds of sugarcane in Brazil. In the system of raw cane, these species germinate under the layer of straw and its branches are fixed to the stems reducing the efficiency of the mechanical harvest. The sugarcane straw left on the ground has reduced the effectiveness of the herbicides and compromised the control of these weeds. In this context, the use of mycoherbicides may be an alternative control strategy for morningglory species. Thus, the objective of the work was to select isolates of *Cercospora* with potential to control *Ipomoea* weed species. for purposes of developing a mycoherbicide. Eight isolates of *Cercospora* were inoculated in *Ipomoea nil* for selection of the most aggressive based on evaluations of incidence and severity of disease and defoliation. Four isolates were selected for the epidemiological studies of inoculum concentration, dew period and plant phenological stage to identify optimal conditions of development of cercospora leaf spot under controlled conditions. The trials were conducted separately and the evaluations of disease incidence and plant defoliation were performed at weekly interval during 4 weeks. After that, the isolates were inoculated on *Ipomoea grandifolia*, *Ipomoea hederifolia* and *Ipomoea quamoclit* plants considering the epidemiological parameter previously selected. The evaluations of disease incidence and severity, and defoliation were performed at weekly interval during 4 weeks. The isolates CMAA-1441, CMAA-1444, CMAA-1449 and CMAA-1710 were selected in previous based on the higher disease incidence and final severity of the disease. In addition, the isolates CMAA-1449 and CMAA-1710 caused higher defoliation on *I. nil* plants compared to controls. In the epidemiological studies, the highest incidence of disease and defoliation on *I. nil* were obtained in plants inoculated at the stage of 2-3 leaves, using 10^7 fragments of mycelium mL^{-1} and submitted to 6 h (CMAA-1441, CMAA-1444 and CMAA-1449) and 12 h (CMAA-1710) of dew period. In addition, the isolates CMAA-1441 and CMAA-1710 were pathogenic to *I. quamoclit*, *I. hederifolia* and *I. gradifolia*. The isolate CMAA 1449 was specific to *I. nil* and *I. quamoclit*, while the isolate CMAA-1444 was specific to *I. nil*. The defoliation was observed only on plants inoculated with the isolates CMAA-1441 and CMAA-1449, and it was restricted to *I. nil*.

Key-words: *Ipomoea grandifolia*, *Ipomoea heredifolia*, *Ipomoea nil*, *Ipomoea quamoclit*, Epidemiology, Mycoherbicide.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Sintomas de cercosporiose em plantas de *Ipomoea nil* inoculadas com suspensão de 10^5 conídios mL^{-1} de *Cercospora* sp. 27
- Figura 2 - Sintomas de cercosporiose em plantas de *Ipomoea nil* inoculadas com suspensão de 10^5 fragmentos de micélio mL^{-1} de isolados de *Cercospora*..... 32
- Figura 3 - Área abaixo da curva do progresso da incidência da doença (AACPID) (A) e severidade final da doença (B) em plantas de *Ipomoea nil* inoculadas com fragmentos de micélio de isolados de *Cercospora*. 33
- Figura 4 - Área abaixo da curva do progresso de emissão de folhas (AACPEF) em plantas de *Ipomoea nil* inoculadas com fragmentos de micélio de isolados de *Cercospora*. ... 34
- Figura 5 - Área abaixo da curva do progresso da incidência da doença (AACPID) em plantas de *Ipomoea nil* inoculadas com diferentes concentrações de fragmentos de micélio dos isolados de *Cercospora* CMAA-1441 (A), CMAA-1444 (B), CMAA-1449 (C) e CMAA-1710 (D). 35
- Figura 6 - Área abaixo da curva do progresso de emissão de folhas (AACPEF) em plantas de *Ipomoea nil* inoculadas com diferentes concentrações de fragmentos de micélio dos isolados de *Cercospora* CMAA-1441 (A), CMAA-1444 (B), CMAA-1449 (C) e CMAA-1710 (D). 36
- Figura 7 - Área abaixo da curva do progresso da incidência da doença (AACPID) em plantas de *Ipomoea nil* submetidas a diferentes períodos de molhamento foliar após a inoculação dos isolados de *Cercospora* CMAA-1441 (A), CMAA-1444 (B), CMAA-1449 (C) e CMAA-1710 (D). 38
- Figura 8 - Área abaixo da curva do progresso de emissão de folhas (AACPEF) em plantas de *Ipomoea nil* submetidas a diferentes períodos de molhamento foliar após a inoculação dos isolados de *Cercospora* CMAA-1441 (A), CMAA-1444 (B), CMAA-1449 (C) e CMAA-1710 (D). 39
- Figura 9 - Área abaixo da curva do progresso de incidência da doença (AACPID) em plantas de *Ipomoea nil* inoculadas com os isolados de *Cercospora* CMAA-1441 (A), CMAA-1444 (B), CMAA-1449 (C) e CMAA-1710 (D), nos seguintes estádios fenológicos: folhas cotiledonares (E1), 2 a 3 folhas definitivas (E2), plantas com flores (E3) e plantas com frutos (E4). 40
- Figura 10 - Área abaixo da curva do progresso de emissão de folhas (AACPEF) em plantas de *Ipomoea nil* inoculadas com os isolados de *Cercospora* CMAA-1441 (A), CMAA-1444 (B), CMAA-1449 (C) e CMAA-1710 (D), nos seguintes estádios fenológicos: folhas cotiledonares (E1), 2 a 3 folhas definitivas (E2), plantas com flores (E3) e plantas com frutos (E4). 41
- Figura 11 - Área abaixo da curva do progresso da incidência da doença (AACPID) (A), área abaixo da curva do progresso da severidade da doença (AACPSD) (B) e área

- abaixo da curva do progresso de emissão de folhas (AACPEF) (C) em plantas de *Ipomoea nil* inoculadas com os isolados de *Cercospora* CMAA-1441, CMAA-1444, CMAA-1449 e CMAA-1710. 58
- Figura 12 - Área abaixo da curva do progresso da incidência da doença (AACPID) (A), área abaixo da curva do progresso da severidade da doença (AACPSD) (B) e área abaixo da curva do progresso de emissão de folhas (AACPEF) (C) em plantas de *Ipomoea grandifolia* inoculadas com os isolados de *Cercospora* CMAA-1441 e CMAA-1710. 59
- Figura 13 - Área abaixo da curva do progresso da incidência da doença (AACPID) (A), área abaixo da curva do progresso da severidade da doença (AACPSD) (B) e área abaixo da curva do progresso de emissão de folhas (AACPEF) (C) em plantas de *Ipomoea hederifolia* inoculadas com os isolados de *Cercospora* CMAA-1441 e CMAA-1710. 60
- Figura 14 - Área abaixo da curva do progresso da incidência da doença (AACPID) (A), área abaixo da curva do progresso da severidade da doença (AACPSD) (B) e área abaixo da curva do progresso de emissão de folhas (AACPEF) (C) em plantas de *Ipomoea quamoclit* inoculadas com os isolados de *Cercospora* CMAA-1441, CMAA-1449 e CMAA-1710. 62
- Figura 15 - Folhas de *Ipomoea grandifolia* (A), *Ipomoea hederifolia* (B) e *Ipomoea quamoclit* (C) com sintomas observados após inoculação do isolado de *Cercospora* CMAA-1441 e seus respectivos controles (D, E e F). 66

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REFERENCIAL	4
2.1	<i>Ipomoea</i> spp.....	4
2.2	CONTROLE BIOLÓGICO DE PLANTAS DANINHAS	6
2.2.1	Controle biológico inundativo	7
2.3	<i>Cercospora</i>	9
3	JUSTIFICATIVA	12
4	HIPÓTESES	13
5	OBJETIVOS	13
5.1	OBJETIVO GERAL.....	13
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
	REFERÊNCIAS	14
6	ARTIGO A: EFEITO DO INÓCULO, PERÍODO DE MOLHAMENTO FOLIAR E DO ESTÁDIO FENOLÓGICO DE <i>Ipomoea nil</i> NO DESENVOLVIMENTO DA CERCOSPORIOSE	22
6.1	RESUMO	22
6.2	ABSTRACT	23
6.3	INTRODUÇÃO.....	24
6.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
6.4.1	Origem das sementes de <i>I. nil</i>	27
6.4.2	Origem dos isolados fúngicos	28
6.4.3	Produção de inóculo	28
6.4.3.1	Seleção de isolados de <i>Cercospora</i>	29
6.4.3.2	Efeito da concentração de inóculo	29
6.4.3.3	Efeito do período de molhamento foliar	29
6.4.3.4	Efeito do estágio fenológico da planta	30
6.4.3.5	Avaliações	30
6.5	RESULTADOS	32
6.5.1	Seleção de isolados de <i>Cercospora</i>	32
6.5.2	Efeito da concentração de inóculo.....	34

6.5.3	Efeito do período de molhamento foliar.....	37
6.5.4	Efeito do estágio fenológico da planta	40
6.6	DISCUSSÃO	42
6.7	CONCLUSÕES	45
	REFERÊNCIAS	46
7	ARTIGO B: SELEÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Cercospora</i> PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE CORDAS-DE-VIOLA	49
7.1	RESUMO	49
7.2	ABSTRACT	50
7.3	INTRODUÇÃO.....	51
7.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	54
7.4.1	Origem das sementes de <i>Ipomoea</i> spp.	54
7.4.2	Origem dos isolados de <i>Cercospora</i>	54
7.4.3	Produção de inóculo	54
7.4.4	Seleção de isolados de <i>Cercospora</i>	55
7.4.4.1	Avaliações	55
7.5	RESULTADOS	57
7.6	DISCUSSÃO	64
7.7	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS	68
8	CONCLUSÕES GERAIS	71

1 INTRODUÇÃO

As plantas daninhas, definidas como todo e qualquer vegetal capaz de crescer onde não é desejado (LORENZI, 2006), estão entre os fatores que mais comprometem a economia agrícola, pois causam tanto perdas às culturas quanto oneram o custo de produção (SOUZA; MARTINS; PEREIRA, 2013). Os herbicidas foram a classe de agrotóxicos mais comercializada no Brasil em 2016, acima de 322 mil toneladas, correspondendo a 59% do volume total de ingredientes ativos desse insumo vendidos no país (IBAMA, 2016).

O gênero *Ipomoea* L. possui 149 espécies amplamente distribuídas no Brasil e, algumas dessas são comumente conhecidas como cordas-de-viola (SIMÃO-BIANCHINI; FERREIRA, 2015). As cordas-de-viola são consideradas plantas invasoras em culturas de importância econômica, como café, soja, milho e cana-de-açúcar, competindo diretamente por recursos (CORREIA; KRONKA, 2010) ou indiretamente prejudicando a colheita, devido ao hábito trepador (MARTINS et al., 2010; KARAM et al., 2011). Dentre as espécies do gênero, destacam-se como importantes plantas daninhas *Ipomoea hederifolia* L., *Ipomoea quamoclit* L., *Ipomoea purpurea* (L.) Roth, *Ipomoea triloba* L., *Ipomoea nil* (L.) Roth (KISSMANN; GROTH, 1999) e *Ipomoea grandifolia* (Dammer) O'Donnell (SILVA et al., 2009).

Em canaviais colhidos sem queima prévia, as cordas-de-viola são a flora infestante predominante devido à capacidade de germinar sob a camada de palha normalmente encontrada no campo (CAVENAGHI et al., 2007). Nesta condição, a palha pode reduzir a eficácia de herbicidas pré e pós-emergentes no controle das cordas-de-viola, ocasionando o surgimento de novos fluxos de emergência de plântulas (MONQUERO et al., 2009; PIZZO et al., 2010), as quais à medida que crescem, interferem no desempenho operacional das colhedoras (LORENZI, 1994). A falha do controle químico de cordas-de-viola em áreas com palhada vem tornando-as um alvo ideal para o desenvolvimento de estratégias alternativas de controle, incluindo programas de controle biológico, na busca por alternativas de manejo mais eficientes e de menor impacto ambiental.

O controle biológico de plantas daninhas é um método que emprega organismos vivos para controlar ou reduzir populações de espécies de plantas indesejáveis (VAN DEN BOSH; MESSENGER; GUTIERREZ, 1987). Normalmente, com o uso de métodos biológicos busca-se o equilíbrio populacional entre o organismo vivo e a planta daninha hospedeira e, conseqüentemente, a redução da competição com as culturas agrícolas (CARVALHO, 2013). Atualmente, duas estratégias são utilizadas para controle biológico de

plantas daninhas: o clássico ou método inoculativo e o bioherbicida ou método inundativo (CHARUDATTAN; DINOOR, 2000).

O método de controle biológico inundativo é definido como o uso de fitopatógeno por meio de aplicações repetitivas de inóculo (CHARUDATTAN, DINOOR, 2000). Esse método envolve o aumento de propágulo do fitopatógeno candidato, a fim de gerar um alto nível de doença, com conseqüente morte ou supressão de crescimento da espécie hospedeira (CHARUDATTAN, 1991). Além de oferecer menor risco às espécies cultivadas, o método inundativo apresenta um forte apelo comercial já que não é esperado que o organismo vivo se perpetue no ambiente (MELLO; RIBEIRO, 1998) e, por isso, o produto formulado com o fitopatógeno normalmente necessita de reaplicação (TEBEEST, 1988).

Entre os microrganismos empregados no método inundativo, os fungos são os mais estudados como agente de biocontrole, pois são encontrados em abundância na natureza, de maneira geral de fácil cultivo em meios artificiais, podendo ser formulados e aplicados em larga escala (SCHROEDER, 1992; TEBEEST; YANG; CISAR, 1992). Como os fungos são os agentes mais utilizados nesse método, o produto desenvolvido é chamado de mico-herbicida (MELLO; RIBEIRO, 1998).

Os fungos fitopatogênicos apresentam potencial como agentes de controle biológico de plantas daninhas (EVANS; GREAVES; WATSON, 2001). No Brasil, fungos fitopatogênicos têm sido estudados desde 1980 como uma fonte potencial de agentes biológicos para ser usada contra as plantas daninhas já estabelecidas (ROCHA; PEREIRA; BARRETO, 2007). Nos últimos anos, alguns estudos relataram a ocorrência do fungo *Cercospora* sp. Fresen. ex Fuckel associado às cordas-de-viola (NECHET; HALFELD-VIEIRA, 2012), e seu potencial como agente de controle biológico (NECHET; HALFELD-VIEIRA, 2014; SANTOS et al., 2016). Os resultados mostram que o fungo *Cercospora* sp. pode ser considerado para estudos de desenvolvimento de um mico-herbicida e que o uso de 10^7 conídios mL⁻¹ intensificou a desfolha na planta hospedeira (NECHET; SANTOS; HALFELD-VIEIRA, 2016).

O uso de mico-herbicidas representa um componente estratégico de programas de manejo integrado de plantas daninhas (BARRETO; EVANS, 1998), e segue uma tendência global para a busca de métodos de controle alternativo ao uso do controle químico, que sejam eficazes, econômicos e de baixo impacto ambiental (MACHADO; MOCHI; MONTEIRO, 2013).

A identificação de fungos do gênero *Cercospora* com potencial mico-herbicida pode ser considerada uma importante oportunidade para o desenvolvimento de métodos de controle

alternativo das cordas-de-viola a ser explorada tanto na agricultura convencional, como na agricultura orgânica que não tem alternativa no controle de plantas daninhas. Embora o fungo *Cercospora* tenha sido identificado como potencial para desenvolvimento de um micoherbicida (SANTOS et al., 2016), a dependência de alta concentração de inóculo, quando se utiliza esporos, para causar desfolha nas plantas pode ser uma limitação para seu uso efetivo. Assim, a investigação em relação à epidemiologia da cercosporiose e aos fatores que influenciam seu desenvolvimento nas cordas-de-viola quando se utiliza como tipo de inóculo os fragmentos de micélio do fungo é essencial para superar as limitações encontradas até o momento.

2 REFERENCIAL

2.1 *Ipomoea* spp.

Ipomoea é o gênero que abrange o maior número de espécies da família Convolvulaceae, com 500 espécies (STEFANOVIC; AUSTIN; OLMSTEAD, 2003). O gênero é nativo do continente Americano (KISSMANN; GROTH, 1999), mas ocorre em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo (MILLER; McDONALD; MANOS, 2004). É constituído de plantas anuais e perenes, arbustos e até mesmo pequenas árvores, sendo que a maioria das espécies tem hábito trepador (DAS, 2011).

No Brasil, algumas espécies de *Ipomoea* são conhecidas popularmente como corda-de-viola (SILVA et al., 2009). São encontradas em todo o país, sendo muito apreciadas como plantas ornamentais por apresentarem flores vistosas e intensamente coloridas. Porém, nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, são consideradas plantas daninhas altamente prejudiciais em culturas anuais de verão (KISSMANN; GROTH, 1999). Pagnoncelli et al. (2017) relataram que uma planta de *Ipomoea* spp. m^{-2} , por exemplo, pode reduzir o rendimento de grãos da soja em 26% e, em densidade de 20 plantas m^{-2} , diminuiram a produtividade da cultura próximo a 80%.

Entre as espécies do gênero, destacando-se *I. hederifolia*, *I. quamoclit*, *I. purpurea*, *I. triloba*, *I. nil* (KISSMANN; GROTH, 1999) e *I. grandifolia* (SILVA et al., 2009). Kuva et al. (2007) destacaram *I. nil*, *I. quamoclit*, *I. hederifolia*, *I. grandifolia* e *I. purpurea* como espécies infestantes em 17 de 28 canaviais colhidos no sistema mecanizado, sem queima prévia da palha, sendo que em cinco dessas áreas foram as plantas daninhas predominantes.

As espécies de corda-de-viola são altamente competitivas com as culturas, e possuem alta capacidade de extrair nutrientes do solo e, logo, reduzem a produtividade agrícola (CARVALHO; BIANCO; BIANCO, 2014). Apresentam hábito trepador e ciclo biológico longo, criando problemas na colheita, pois travam a colhedora (MARTINS et al., 2010; KARAM et al., 2011) e dificultam o corte mecanizado, comprometendo o rendimento das máquinas e a qualidade dos colmos em cana-de-açúcar (CORREIA; KRONKA, 2010). Ainda, se as plantas apresentarem sementes ligadas à planta-mãe no momento da colheita, seu espesso tegumento (DEFELICE, 2001) pode ser danificado pelo atrito no interior das colhedoras (AZANIA et al., 2009), favorecendo sua disseminação dentro do cultivo (SILVA et al., 2009).

Essas espécies produzem sementes capazes de germinar sob uma quantidade variável

de palha (AZANIA et al., 2002; GRAVENA et al., 2004). Possivelmente, a manutenção da palha sobre o solo favorece a germinação das sementes e o desenvolvimento das plantas, devido à menor amplitude térmica diária, à maior conservação de umidade e à melhora química e física do solo (CORREIA; KRONKA, 2010). Correia; Durigan (2004) observaram que, independente do nível de palha (5, 10 e 15 t ha⁻¹), a presença de cobertura morta sobre o solo aumentou o número de plântulas emergidas e o acúmulo de matéria seca de *I. quamoclit*, comparado ao tratamento sem palha. Do mesmo modo, Timossi; Durigan (2006) verificaram que a presença de palha (12,8 t ha⁻¹) sobre o solo após a colheita mecanizada de cana-de-açúcar, restringiu a comunidade infestante da área aos gêneros *Ipomoea* e *Merremia* Dennst. Ex Endl.

A persistência das cordas-de-viola sob a palhada tem sido constatada em áreas de cana-de-açúcar no sistema de plantio direto e de colheita mecanizada (DUARTE JÚNIOR; COELHO; FREITAS, 2009). No sistema de colheita mecanizada, a palha reduz a eficácia de herbicidas pré e pós-emergentes no controle das cordas-de-viola, ocasionando o surgimento de novos fluxos de emergência de plântulas (MONQUERO et al., 2009; PIZZO et al., 2010). À medida que cresce, a corda-de-viola envolve-se nos colmos da cana-de-açúcar e dificulta a absorção de luz, com conseqüente prejuízo à fotossíntese, à produtividade (AZANIA et al., 2009) e ao desempenho operacional das colhedoras (LORENZI, 1994). *I. hederifolia*, por exemplo, convivendo com a cana-soca, foi capaz de reduzir em 34%, o número final de colmos, e em 46%, a produtividade da cultura (SILVA et al., 2009).

A tolerância natural ao herbicida glifosato é outra característica atribuída às cordas-de-viola (BALDWIN, 1995; OWEN, 2008). A tolerância provém da habilidade inata da espécie em suportar aplicações de herbicidas, nas doses recomendadas, sem alterações marcantes em seu crescimento e desenvolvimento (CHRISTOFFOLETI et al., 2000). A tolerância ao glifosato tem sido relatada em *I. grandifolia* (MONQUERO; CHRISTOFFOLETI, 2003; MONQUERO et al., 2004), *Ipomoea hederacea* Jacq. (SINGH et al., 2011), *Ipomoea indivisa* (Vell.) Hallier f. e *I. purpurea* (PAZUCH et al., 2013), *I. nil* (GALON et al., 2013) e *Ipomoea lacunosa* L. (RIBEIRO et al., 2015) e, é atribuída a limitada absorção e/ou translocação do herbicida pela planta (MONQUERO et al., 2004; SINGH et al., 2011; GALON et al., 2013; PAZUCH et al., 2013; RIBEIRO et al., 2015).

2.2 CONTROLE BIOLÓGICO DE PLANTAS DANINHAS

O controle biológico foi utilizado no manejo de plantas daninhas muito antes do desenvolvimento dos herbicidas químicos e seus princípios foram desenvolvidos por entomologistas empregando inimigos naturais de insetos utilizando o controle biológico clássico (WAAGE, 1997; EVANS; SEIER, 2001). O primeiro programa bem-sucedido de controle biológico de planta daninha, iniciado em 1902, foi realizado pelo Departamento de Agricultura do Havaí através da introdução de insetos do México para controlar *Lantana camara* L. no Havaí (WATERHOUSE; NORRIS, 1987). Em 1925, a traça *Cactoblastis cactorum* Berg. da Argentina foi introduzida na Austrália para controlar a pera espinhosa (*Opuntia stricta* (Haw.) Haw.) (MCFAYDEN; WILSON, 1997).

Atualmente, as principais modalidades de métodos estabelecidos para o controle biológico são: o clássico ou método inoculativo, que consiste na importação e liberação de patógenos da região de origem das plantas daninhas, e o bioherbicida ou método inundativo baseado na multiplicação massal e aplicações periódicas do patógeno (SCHROEDER, 1983).

O uso de fitopatógenos como agentes de controle de plantas daninhas iniciou-se na década de 70, tendo como primeiro exemplo a introdução na Austrália da ferrugem *Puccinia chondrillina* Bubay & Syd. proveniente da região Mediterrânea para o controle de *Chondrilla juncea* L. (TE BEEST; YANG; CISAR, 1992). Além da estratégia inoculativa, o uso da estratégia do bioherbicida ou inundativo com fitopatógenos foi realizado pela primeira vez durante experimentos conduzidos com arroz consorciado com *Aeschynomene virginica* (L.) Britton, Poggenb. & Stems, no Arkansas, EUA, em 1969, quando a planta daninha foi erradicada nas parcelas experimentais pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. f. sp. *aeschynomene* (SMITH JUNIOR et al., 1973).

A principal diferença entre as duas estratégias é a necessidade de reaplicação do inóculo em áreas infestadas quando se considera a estratégia do bioherbicida. Na estratégia clássica, o agente se estabelece na área infestada e não há necessidade de reaplicações e, após seu estabelecimento há redução da população da planta-alvo com controle a longo prazo (BOYETCHKO, 1997). O controle biológico de plantas daninhas na maioria das vezes não erradica populações inteiras que ocorrem em determinadas áreas, mas reduz a sua densidade a níveis aceitáveis ou subeconômicos (TESSMANN, 2011). Boari; Vurro (2004) observaram redução de 60% no número e peso de plântulas de *Orobanche ramosa* L., e redução de 70% no número de tubérculos ligados às raízes após a infestação do solo com *Fusarium oxysporum* Schltdl. e *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. Já Ray; Vijayachandran (2013) verificaram 100% de

mortalidade de *Trianthema portulacastrum* L. aos 60 dias após a aplicação de *Phoma herbarum* Westend.

No controle biológico de plantas daninhas, o patógeno deve ser específico, atacando uma ou poucas espécies dentro de um mesmo gênero de plantas, e altamente seletivo para não provocar danos às plantas cultivadas (FONTES et al., 2003). Por isso, a pesquisa com o controle biológico de plantas daninhas envolve etapas sucessivas, como seleção de espécies de plantas daninhas a serem controladas; seleção de patógenos mais eficientes; determinação da especificidade dos hospedeiros; acompanhamento da introdução e do estabelecimento do agente de controle biológico no campo; e avaliação da efetividade em diferentes épocas do ano, a fim de correlacionar os níveis de infecção com a redução da densidade populacional do hospedeiro (BARRETO, 2009; SILVA et al., 2007).

2.2.1 Controle biológico inundativo

O controle biológico inundativo teve início nos anos 1960 (SMITH JUNIOR et al., 1973) e o seu uso se baseia na capacidade do homem de manipular certos sistemas patógeno-plantas daninhas para causar níveis altamente prejudiciais de epidemias durante períodos críticos de interferência das plantas, minimizando o seu impacto negativo nas áreas de cultivo (CHARUDATTAN, 2005).

Neste método utilizam-se fitopatógenos endêmicos, predominantemente fungos associados à planta daninha alvo (BARRETO, 2009). O inóculo do fitopatógeno é produzido massalmente e aplicado durante a estação de crescimento das plantas (KLAIC et al., 2015). A aplicação deve coincidir com a condição ambiental e o estágio fenológico mais propícios para a ocorrência da epidemia e a supressão da planta daninha (TEMPLETON; SMITH; TEBEEST, 1986; CHARUDATTAN, 1991).

Com esta estratégia, *Sclerotinia minor* Jagger. (ingrediente ativo do mico-herbicida Sarritor registrado e comercializado no Canadá) causou 100% de mortalidade em *Taraxacum officinale* Weber ex F. H. Wigg. com quatro e seis semanas de idade, sem recuperação das plantas após duas semanas da aplicação (ABU-DIEYEH; WATSON, 2007a). Porém, deve-se atentar que as condições ambientais para que o patógeno seja eficaz também devem ser consideradas. ABU-DIEYEH; WATSON (2007b) relatam que a aplicação de *S. minor* deve ocorrer entre a primavera e início do outono, quando as temperaturas médias diárias variaram de 9 a 20°C, a umidade relativa do ar está acima de 58% e o ponto de orvalho varia de 3,6 a

17,4°C. No método inundativo, as restrições naturais asseguram o retorno da população do fitopatógeno a um nível baixo (WALL; PRASAD; SHAMOUN, 1992), sendo necessárias aplicações regulares de inóculo para manter a planta daninha sob controle. Na ausência de *T. officinale*, o micélio de *S. minor* declina rapidamente em 10 dias (WATSON, 2007), pois raramente o fungo produz escleródios (STEWART-WADE et al., 2002).

Para que o mico-herbicida seja uma estratégia viável no manejo de plantas daninhas, o patógeno deve ser cultivável em meio artificial; o inóculo deve ser produzido abundantemente por métodos convencionais de cultivo; o produto final deve ser geneticamente estável e específico à espécie alvo; o armazenamento, manuseio e os métodos de aplicação devem ser compatíveis com as práticas agrícolas atuais; e o agente patogênico deve ser suficientemente eficaz sob diferentes condições ambientes para permitir uma aplicação viável (TEMPLETON; TEBEEST; SMITH, 1979). Além disso, o inóculo deve apresentar baixo custo de produção (LIMA et al., 2010).

Atualmente, dos nove mico-herbicidas já desenvolvidos e registrados, apenas cinco são comercializados nos EUA e no Canadá, como LockDown[®] (antigo Collego[®]), Smoulder[®], Phoma, Chontrol[®] Pastes e Sarritor[®] (CORDEAU et al., 2016). No Brasil, apenas um mico-herbicida teve seu desenvolvimento concluído, o Milobern-Lc, obtido a partir do fungo *Lewia chlamidosporiformans* B. S. Vieira & R. W. Barreto, para o controle de *Euphorbia heterophylla* L. em soja e outras culturas anuais. Contudo, o produto não foi registrado e também não está disponível para comercialização (BARRETO, 2009).

Essa situação reflete as limitações que ainda existem no desenvolvimento de mico-herbicidas e na sua adoção como estratégia no manejo integrado de plantas daninhas (ASH, 2010). A maioria dos fungos fitopatogênicos avaliados para o desenvolvimento como mico-herbicidas falha devido às limitações biológicas, tecnológicas ou comerciais. A necessidade de longos períodos de molhamento e baixa virulência são os principais desafios no desenvolvimento de mico-herbicidas (BARRETO, 2009).

Apesar disso, o emprego de fitopatógenos é um recurso eficaz para o manejo de plantas daninhas e para a mitigação dos problemas ambientais e econômicos causados por essas plantas. Por isso, é imprescindível que a importância do controle biológico de plantas daninhas, e particularmente a aplicação de fitopatógenos como agentes de controle, seja elevada progressivamente e os benefícios para o manejo sustentável de ecossistemas (BARRETO; EVANS, 1996) advindo de aplicações bem-sucedidas desse método, finalmente sejam reconhecidos (BARRETO, 2009).

2.3 *Cercospora*

Cercospora é considerado um dos maiores e mais heterogêneos gêneros do grupo dos Hyphomycetes (CROUS; BRAUN, 2003). O gênero foi estabelecido por Fresenius em 1863 (FUCKEL, 1863) com a designação de apenas quatro espécies (PONS; SUTTON, 1988). Em 1954, mais de 1.800 nomes de espécies foram listados em uma monografia do gênero (CHUPP, 1954). Após 33 anos, em 1987, Pollack listou mais de 3.000 espécies de *Cercospora* (POLLACK, 1987). Porém, em 2003, o gênero foi revisado e muitas espécies foram reduzidas a sinônimas e, conseqüentemente, um total de 659 espécies de *Cercospora* foi reconhecido (CROUS; BRAUN, 2003). Várias dessas espécies de *Cercospora*, mais de 281, foram nomeadas como *Cercospora apii* s. lat., por serem morfologicamente indistinguíveis de *C. apii* Fresen., sendo colocadas no complexo *C. apii* (ELLIS, 1971). Atualmente, a identificação das espécies de *Cercospora* é baseada em caracteres morfológicos combinado com a análise filogenética de um conjunto de regiões específicas do DNA (GROENEWALD et al., 2013).

As espécies de *Cercospora* estão entre os mais comuns e destrutivos patógenos de plantas (POLLACK, 1987). Dentre essas se destacam: *Cercospora apii* Fresen., *Cercospora arachidicola* Hori, *Cercospora beticola* Sacc., *Cercospora canescens* Ellis & Martin, *Cercospora coffeicola* (sin. *Mycosphaerella coffeicola* (Cooke) Stev & Wellmann), *Cercospora kikuchii* Matsumoto & Tomoyasu, *Cercospora nicotianae* Ellis & Everh., *Cercospora personata* (sin. *Mycosphaerella berkeleyi* Jenkins.), *Cercospora sojina* Hara e *Cercospora zae-maydis* Tehon & E. Y. Daniels (GROENEWALD et al., 2013). São capazes de infectar inúmeras culturas economicamente importantes, incluindo cereais, hortaliças, plantas ornamentais, espécies florestais e gramíneas (WEILAND; KOCH, 2004), além de várias espécies de plantas nativas, em diferentes tipos de clima em todo o mundo, causando desde manchas foliares até lesões necróticas em flores, frutos, brácteas, sementes e pedicelos (GOODWIN; DUNKLE; ZISMANN, 2001; CROUS; BRAUN, 2003). Na maioria dos hospedeiros, as manchas foliares são irregularmente circulares a angulares, com ou sem uma borda distinta, e muitas vezes coalescem constituindo extensas áreas necrosadas (AGRIOS, 2005).

Os conídios de *Cercospora* podem ser hialinos, sub-hialinos a pálidos ou marrons; longos, comumente com mais de três septos transversais; retos ou curvos, com base obcônica

ou truncada, extremidade aguda a obtusa; de paredes finas; formados sucessivamente em conidióforos delgados, com coloração verde oliva ou marrom pálido a muito escuro, que emergem em fascículos ou grupos de estômatos e, apresentam articulações ou cicatrizes onde conídios são produzidos (HORST, 2008). Os conídios são facilmente destacados dos conidióforos (AGRIOS, 2005) e dispersos sobre plantas hospedeiras pelo vento ou chuva. Sob condições úmidas, tubos germinativos emergem dos conídios e crescem sobre a superfície foliar sempre se reorientando para interceptarem os estômatos. Ao atingí-los, diferenciam-se em apressórios e introduzem o peg de penetração através do poro estomático. Após a penetração, colonizam intercelularmente o mesófilo foliar e, posteriormente, induz lesões necróticas distintas. Em seguida, conidióforos emergem através dos estômatos e produzem conídios, que são dispersos para plantas vizinhas, iniciando os ciclos de infecção secundária (KIM et al., 2011).

As espécies de *Cercospora* produzem uma toxina fotoativada, a cercosporina, que é considerada um fator de patogenicidade primária. A cercosporina apresenta toxicidade quase universal às plantas (DAUB; EHRENSHAFT, 2000) devido à produção de espécies reativas de oxigênio, como oxigênio singlete (1O_2) e superóxido (O_2^-) (YAMAZAKI et al., 1975; DAUB, 1982b). Quando exposta à luz, essa toxina absorve energia luminosa, sendo convertida a um estado tripleto ativado energeticamente. Esta molécula reage com o oxigênio molecular e gera as espécies de oxigênio ativado (SPIKES, 1989). Deste modo, a cercosporina lesiona rapidamente, em torno de 1 a 2 minutos, as membranas expostas, provocando peroxidação de lipídios da membrana celular e degradação da membrana plasmática da planta hospedeira, que resulta em perda de eletrólitos dos tecidos, diminuição da permeabilidade da membrana e morte celular (DAUB, 1982a). O extravasamento de nutrientes das células danificadas sustenta o crescimento e a esporulação das espécies de *Cercospora* na planta hospedeira (DAUB; EHRENSHAFT, 2000).

O gênero *Cercospora* está entre os fungos fitopatogênicos avaliados no controle biológico de plantas daninhas (ROCHA; PEREIRA; BARRETO, 2007). Apenas um mico-herbicida, obtido a partir de uma espécie desse gênero, foi desenvolvido para o controle de aguapé (*Eichhornia crassipes* [Martius] Solms Laubach), com a intenção de tornar o produto disponível para comercialização. Esse mico-herbicida foi registrado pela United States Environmental Protection Agency (US-EPA), sob a patente US4097261 (FREEMAN; CHARUDATTAN, 1984), e contém *Cercospora rodmanii* Conway, que é um fungo patogênico específico à *E. crassipes* (TEBEEST, 1991).

Outro potencial candidato para o desenvolvimento de um mico-herbicida contra

aguapé é *Cercospora piaropi* Tharp. Essa espécie foi avaliada nos Estados Unidos e México em condições controladas quanto à especificidade de hospedeiro, a eficácia de biocontrole e eficiência de formulação (BABU; SAJEENA; SEETHARAMAN, 2003; EL-MORSY; DOHLOB; HYDE, 2006; DAGNO et al., 2012).

Cercospora caricis Dearn. & House é outra espécie considerada como um promissor micro-herbicida para o controle de tiririca (*Cyperus rotundus* L.) (ALY et al., 2001). No Brasil, um isolado de *C. caricis*, designado CG672, foi testado quanto à patogenicidade em laboratório e casa-de-vegetação, causando severa necrose e desfolha em *C. rotundus*. Devido à combinação de eficácia e especificidade, o isolado CG672 foi selecionado como um candidato a micro-herbicida (INGLIS et al., 2001).

Nos últimos anos, isolados de *Cercospora* foram selecionados por serem prevalentes em espécies de cordas-de-viola (*Ipomoea* spp.) (NECHET; HALFELD-VIEIRA, 2012). O fungo foi testado quanto à patogenicidade e a eficiência de biocontrole em casa-de-vegetação. Os sintomas observados, caracterizados por manchas foliares seguidas de amarelecimento e desfolha, indicaram que isolados do gênero *Cercospora* podem ser considerados para estudos de desenvolvimento de um micro-herbicida para *I. nil*, *I. hederifolia* e *I. grandifolia* (NECHET; HALFELD-VIEIRA, 2014; SANTOS et al., 2016). Além disso, avaliou-se o efeito da concentração do inóculo na intensidade da doença em *I. nil* e os resultados indicaram que a maior incidência da cercosporiose e desfolha foram obtidas com o uso de 10^7 conídios mL^{-1} (NECHET; SANTOS; HALFELD-VIEIRA, 2016).

3 JUSTIFICATIVA

As espécies de plantas daninhas, conhecidas como cordas-de-viola, são consideradas invasoras em culturas economicamente importantes no Brasil, como café, cana-de-açúcar, milho e soja. A interferência exercida pelas cordas-de-viola no crescimento, desenvolvimento, produtividade e qualidade dos colmos é um dos fatores mais prejudiciais à cultura da cana-de-açúcar, particularmente em áreas com sistema de colheita mecanizada. Nesse sistema, quando os herbicidas são aplicados sobre a palha, essa se torna uma barreira e causa a volatilização, fotodecomposição ou lixiviação do produto para o solo. Quando não controladas, as cordas-de-viola germinam, se envolvem nos colmos e folhas, interferindo nas operações de colheita e comprometendo a qualidade da cana. Do mesmo modo, as cordas-de-viola têm comprometido o crescimento de espécies arbóreas em áreas de restauração ecológica, pois reduzem o conteúdo de macro e micronutrientes nas plantas.

Os prejuízos gerados pelas cordas-de-viola em cultivos agrícolas e florestais no Brasil indicam que são espécies particularmente problemáticas e devem ser reconhecidas como alvo potencial para novas formas de manejo. O uso de mico-herbicidas representa uma oportunidade para incorporar o controle biológico como um componente do manejo integrado dessas plantas no Brasil, sobretudo em cultivos agrícolas orgânicos e, em áreas de recuperação florestal, onde o uso de agrotóxicos é proibido ou restrito. Contudo, só recentemente, se iniciou estudo para o desenvolvimento de mico-herbicidas destinado ao controle biológico das cordas-de-viola.

O fungo *Cercospora* foi identificado como agente causal da cercosporiose em cordas-de-viola e pode ser considerado um potencial agente de controle biológico dessas espécies. Esse fungo causa manchas necróticas nas folhas que resultam em desfolha das plantas. Apesar disso, existem restrições que ainda impossibilitam o uso desse fungo como mico-herbicida em programas de manejo integrado de plantas do “complexo cordas-de-viola” (*Ipomoea* spp.), particularmente em relação à epidemiologia da doença e aos fatores que influenciam seu desenvolvimento, como a concentração de inóculo, o molhamento foliar mínimo e o estágio fenológico em que a planta é mais suscetível, quando se utiliza os fragmentos de micélio do fungo. Deste modo, propõe-se no presente trabalho definir as condições epidemiológicas exigidas por *Cercospora* para o desenvolvimento adequado da doença e que subsidiem o desenvolvimento de um mico-herbicida constituído por fragmentos de micélio para o controle de *Ipomoea* spp.

4 HIPÓTESES

O uso de fragmentos de micélio de *Cercospora* como inóculo permite o desenvolvimento da cercosporiose em *I. nil*.

A desfolha de *I. nil* causada por *Cercospora* está diretamente relacionada a combinação dos fatores epidemiológicos estudados.

Os isolados de *Cercospora* são capazes de causar desfolha e controlar *I. grandifolia*, *I. hederifolia*, *I. nil* e *I. quamoclit* em condições controladas.

Há isolados de *Cercospora* promissores para o desenvolvimento de um mico-herbicida para o controle de *I. grandifolia*, *I. hederifolia*, *I. nil* e *I. quamoclit*.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Determinar as condições epidemiológicas ideais que subsidiem o desenvolvimento de um mico-herbicida constituído por fragmentos de micélio de *Cercospora* para o controle de *Ipomoea* spp.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a concentração de inóculo e o período de molhamento foliar para o desenvolvimento da cercosporiose em *I. nil*;

Determinar o estágio fenológico de *I. nil* mais suscetível aos isolados de *Cercospora*;

Estabelecer um protocolo, baseado na concentração de inóculo, período de molhamento foliar mínimo e estágio fenológico mais suscetível do hospedeiro, para obtenção de máxima intensidade de cercosporiose em *Ipomoea* spp; e

Identificar isolados capazes de causar danos em *I. grandifolia*, *I. hederifolia*, *I. nil* e *I. quamoclit*.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. Plant diseases caused by fungi. In: AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5.ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005, p. 385-614.
- ABU-DIEYEH, M. H.; WATSON, A. K. Efficacy of *Sclerotinia minor* for dandelion control: effect of dandelion accession, age and grass competition. **Weed Research**, v. 4, p. 63–72, 2007a.
- ABU-DIEYEH, M. H.; WATSON, A. K. Population dynamics of broadleaf weeds in turfgrass as influenced by chemical and biological control methods. **Weed Science**, v. 55, p. 371–380, 2007b.
- ALY, R.; HALPERN, N.; RUBIN, B.; DOR, E.; GOLAN, S.; HERSHENHORN, J. Biolistic transformation of *Cercospora caricis*, a specific pathogenic fungus of *Cyperus rotundus*. **Mycological Research**, v. 105, n. 2, p. 150-152, 2001.
- ASH, G.J. The science, art and business of successful bioherbicides. **Biological Control**, v.52, p. 230-240, 2010.
- AZANIA, A. A. P. M.; AZANIA, C. A. M.; GRAVENA, R.; PAVANI, M. C. M. D.; PITELLI, R. A. Interferência da palha de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) na emergência de espécies de plantas daninhas da família Convolvulaceae. **Planta Daninha**, v. 20, n. 2, p. 207-212, 2002.
- AZANIA, C. A. M.; AZANIA, A. A. P. M.; PIZZO, I. V.; SCHIAVETTO, A. R.; ZERA, F. S.; MARCARI, M. A.; SANTOS, J.L. Manejo químico de convolvulaceae e euphorbiaceae em cana-de-açúcar em período de estiagem. **Planta Daninha**, v. 27, n. 4, p. 841-848, 2009.
- BABU, R. M.; SAJEENA, A.; SEETHARAMAN, K. Bioassay of the potentiality of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler as a bioherbicide to control water hyacinth and other aquatic weeds. **Crop Protection**, v. 22, p. 1005-1013, 2003.
- BALDWIN, F. L. Weed control in Roundup tolerant soybeans. **Proceeding Southern Weed Science Society**, v. 48, p. 46, 1995.
- BARRETO, R. W.; EVANS, H. C. Fungal biocontrol of weed and its potential role in ecosystem sustainability. In: CHAPELA, H. I.; PALM, M .E. **Mycology in sustainable development: Expanding concepts and vanishing borders**. Boone: Parkway Publishers, 1996.
- BARRETO, R. W.; EVANS, H. C. Fungal pathogens of *Euphorbia heterophylla* and *E. hirta* in Brazil and their potential as weed biocontrol agents. **Mycopathologia**, v. 141, n. 1, p. 21-36, 1998.
- BARRETO, R. W. Controle biológico de plantas daninhas com fitopatógenos. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 101-128.

- BOARI, A.; VURRO, M. Evaluation of *Fusarium* spp. and other fungi as biological control agents of broomrape (*Orobanche ramosa*). **Biological Control**, v. 30, p. 212-219, 2004.
- BOYETCHKO, S. M. Principles of biological weed control with microorganisms. **HortScience**, v.32, n. 2, p. 201-205, 1997.
- CARVALHO, L. B. de. **Plantas Daninhas**. 1.^a ed. Lages: Carvalho, 2013. 82 p.
- CARVALHO, L.B.; BIANCO, S.; BIANCO, M.S. Estudo comparativo do acúmulo de massa seca e macronutrientes por plantas de *Zea mays* e *Ipomoea hederifolia*. **Planta Daninha**, v. 32, n. 1, p. 99-107, 2014.
- CAVENAGHI, A. L. et al. Dinâmica do herbicida amicarbazone (Dinamic) aplicado sobre palha de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). **Planta Daninha**, v. 25, n. 4, p. 831-837, 2007.
- CHARUDATTAN, R. The mycoherbicide approaches with plant pathogens. In: TE BEEST (Ed.) **Microbial control of weeds**. New York: Chapman and Hall, 1991. p. 24-57.
- CHARUDATTAN, R; DINOOR, A. Biological control of weeds using plant pathogens: accomplishments and limitations. **Crop Protection**, v. 19, n. 1, p. 691-695, 2000.
- CHARUDATTAN, R. Use of plant pathogens as bioherbicides to manage weeds in horticultural crops. **Proceeding of the Florida State Horticultural Society**, v. 118, p.208-214, 2005.
- CHRISTOFFOLETI, P. J.; MEDEIROS, D.; MONQUEIRO, P. A.; PASSINI, T. Plantas daninhas à cultura da soja: controle químico e resistência a herbicidas. In: CÂMARA, G.M.S. (Ed.) **Soja: tecnologia da produção**. Piracicaba: ESALQ, 2000. p.179-202.
- CHUPP, C. **A monograph of the fungus genus *Cercospora***. Ithaca, New York: Published by the author, 1954.
- CORDEAU, S.; TRIOLET, M.; WAYMAN, S.; STEINBERG, C.; GUILLEMIN, J. Bioherbicides: Dead in the water? A review of the existing products for integrated weed management. **Crop Protection**, v. 87, p. 44-49, 2016.
- CORREIA, N. M.; DURIGAN, J. C. Emergência de plantas daninhas em solo coberto com palha de cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, v. 22, n. 1, p. 11-17, 2004.
- CORREIA, N. M.; KRONKA JR., B. Controle químico de plantas dos gêneros *Ipomoea* e *Merremia* em cana-soca. **Planta Daninha**, v. 28, número especial, p. 1143-1152, 2010.
- CROUS, P. W.; BRAUN, U. ***Mycosphaerella* and its anamorphs 1. Names published in *Cercospora* and *Passalora***. Series, 1. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2003. 571 p.
- DAS, S. Congruence between morphological and molecular approach in understanding species relationship in *Ipomoea* spp.: A rare event in taxonomy. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 10, n. 4, p. 263-268, 2011.

- DAGNO, K.; LAHLALI, R.; DIOURTE, M.; JIJAKLI, M. H. Present status of the development of mycoherbicides against water hyacinth: successes and challenges. A review. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, v. 16, n. 3, p. 360-368, 2012.
- DAUB, M. E. Peroxidation of tobacco membrane lipids by the photosensitizing toxin, cercosporin. **Plant Physiology**, v. 69, p. 1361-1364, 1982a.
- DAUB, M. E. Cercosporin, a photosensitizing toxin from *Cercospora* species. **Phytopathology**, v. 72, p. 370-374, 1982b.
- DAUB, M. E.; EHRENSHAFT, M. The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin: Contributions to plant disease and fundamental biology. **Annual Review Phytopathology**, v. 38, p. 461-490, 2000.
- DEFELICE, M. S. Tall morningglory, *Ipomoea purpurea* (L.) Roth - Flower or Foe? **Weed Technology**, v. 15, p. 601-606, 2001.
- DUARTE JÚNIOR, J. B.; COELHO, F. C.; FREITAS, S. P. Dinâmica de populações de plantas daninhas na cana-de-açúcar em sistema de plantio direto e convencional. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 3, p. 595-612, 2009.
- ELLIS, M. B. **Dematiaceous Hyphomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1971.
- EL-MORSY, E. M., DOHLOB, S. M.; HYDE, K. D. Diversity of *Alternaria alternata* a common destructive pathogen of *Eichhornia crassipes* in Egypt and its potential use in biological control. **Fungal Diversity**, v. 23, p. 139-158, 2006.
- EVANS, H. C.; GREAVES, M. P.; WATSON, A. K. Fungal biocontrol agents of weeds. In: BUTT, T. M.; JACKSON, C. W.; MAGAN, N. (Eds). **Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential**. London: CAB International, 2001. p.169-192.
- EVANS, H. C.; SEIER, M. K. **A strategy for management of *Rhododendron ponticum* in the British isles**. Eghan: CABI Bioscience, 2001.
- FONTES, J. R. A.; SHIRATSUCHI, L. S.; NEVES, J. L.; JÚLIO, L. de; SODRÉ FILHO, J. **Manejo integrado de plantas daninhas**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003. 48 p. (Documentos, 103).
- FREEMAN, T. E.; CHARUDATTAN, R.. ***Cercospora rodmanii* Conway, a potential biocontrol agent for water hyacinth**. Florida Agricultural Experimental Station Technical Bulletin No. 842. Gainesville: University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences, 1984.
- FUCKEL, K. W. G. L. Fungi Rhenani exsiccati, Fasc. I-IV. **Hedwigia**, v. 2, p. 132-136, 1863.

GALON, L.; FERREIRA, E. A.; ASPIAZÚ, I.; CONCENÇO, G.; SILVA, A. F.; SILVA, A. A.; VARGAS, L. Glyphosate translocation in herbicide tolerant plants. **Planta Daninha**, v. 31, n. 1, p. 193-201, 2013.

GOODWIN, S. B.; DUNKLE, L. D.; ZISMANN, V. L. Phylogenetic analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. **Phytopathology**, v. 91, p. 648-658, 2001.

GRAVENA, R.; RODRIGUES, J. P. R. G.; SPINDOLA, W.; PITELLI, R. A.; ALVES, P. L. C. A. Controle de plantas daninhas através da palha de cana-de-açúcar associada à mistura dos herbicidas trifloxysulfuron sodium + ametrina. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 22, n. 2, p. 419-427, 2004.

GROENEWALD, J. Z.; NAKASHIMA, C.; NISHIKAWA, J.; SHIN, H. -D.; PARK, J. -H.; JAMA, A. N.; GROENEWALD, M.; BRAUN, U.; CROUS, P. W. Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. **Studies in Mycology**, v. 75, p. 115-170, 2013.

HARLEY, K. L. S.; FORNO, I. W. **Biological control of weeds: a handbook for practitioners and students**. Sydney: Inkata Press, 1992. 74 pp.

HORST, R. K. Plant Diseases and Their Pathogens. In: HORST, R. K. **Westcott's plant disease handbook**. 7 ed. Ithaca: Springer, 2008. p. 81-698.

IBAMA. Boletim: Vendas por classes de usos dos produtos formulados. In: _____. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. Brasília: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2016. Disponível em:<ibama.gov.br/agrotóxicos/relatórios-de-comercializacao-de-agrotóxicos>. Acesso em: 20 mar. 2018.

INGLIS, P. W.; TEIXEIRA, E. A.; RIBEIRO, D. M.; VALADARES-INGLIS, M. C.; TIGANO, M. S.; MELLO, S. C. M. Molecular Markers for the Characterization of Brazilian *Cercospora caricis* Isolates. **Current Microbiology**, v. 42, p. 194-198, 2001.

KARAM, D.; MELHORANÇA, A. L.; OLIVEIRA, M. F. de; SILVA, J. A. A. Sistema de produção. Cultivo do milho. **Plantas Daninhas**, 2011. Disponível em:<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_7_ed/plantasdaninhas.htm>. Acesso em: 30 nov. 2014.

KLAIC, R; KUHN, R. C; FOLETTTO, E. L; DAL PRÁ, V; JACQUES, R. J. S; GUEDES, J. An overview regarding bioherbicide and their production methods by fermentation. In: **Fungal Biomolecules**. 1ed.: John Wiley & Sons, Ltda, 2015. p. 183-199.

KIM, H.; RIDENOUR, J. B.; DUNKLE, L. D.; BLUHM, L. D. Regulation of Pathogenesis by Light in *Cercospora zea-maydis*: An Updated Perspective. **The Plant Pathology Journal**, v. 27, n. 2, p. 103-109, 2011.

KISSMANN, K. G.; GROTH, G. **Plantas infestantes e nocivas**. 2.ed. São Paulo: BASF, 1999. 978 p.

KUVA, M. A.; PITELLI, R. A.; SALGADO, T. P.; ALVES, P. L. C. A. Fitossociologia de comunidades de plantas daninhas em agroecossistema cana-crua. **Planta Daninha**, v. 25, n. 3, p. 501-511, 2007.

LIMA, B.V.; SOARES, D.J.; BARRETO, R.W. Inoculum density of *Plectosporium alismatis*, a potential mycoherbicide, in relation to control of the aquatic weed *Sagittaria montevidensis*. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, p. 236-240, 2010.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**. 4.ed. Nova Odessa: Plantarum, 1994. 440 p.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2006. 339 p.

MACHADO, A. C. R.; MOCHI, D. A.; MONTEIRO, A. C. Crop optimization and pre-steps standardization to get a *Bipolaris euphorbiae*-based bioherbicide. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n. 4, p. 392-399, 2013.

MARTINS, T. A.; CARVALHO, L. B.; BIANCO, M. S.; BIANCO, S. Acúmulo de massa seca e macronutrientes por plantas de *Merremia aegyptia*. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 28, número especial, p. 1023-1029, 2010.

MCFADYEN, R. E. C. Biological control of weeds. **Annual Review of Entomology**, v. 43, p. 369-393, 1998.

MELLO, S. C. M.; RIBEIRO, Z. M. A. Fitopatógenos como agentes de controle de plantas daninhas. In: MELLO, I. S., AZEVEDO, J. L. (Eds.). v. 1. **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. p. 97-128.

MILLER, R. E.; McDONALD, J. A.; MANOS, P. S. Systematics of *Ipomoea* subgenus *quamoclit* (Convolvulaceae) based on ITS sequence data and a Bayesian phylogenetic analysis. **American Journal of Botany**, v. 91, p. 1208-1218, 2004.

MONQUERO, P.A.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Dinâmica do banco de sementes em áreas com aplicação frequente do herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v. 21, n. 1, p. 63-69, 2003.

MONQUERO, P. A.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; OSUNA, M. D.; DE PRADO, R. A. Absorção, translocação e metabolismo do glyphosate por plantas tolerantes e suscetíveis a este herbicida. **Planta Daninha**, v. 22, n. 3, p. 445-451, 2004.

MONQUERO, P. A.; AMARAL, L. R.; SILVA, A. C.; BINHA, D. P.; SILVA, P. V. Eficácia de herbicidas em diferentes quantidades de palha de cana-de-açúcar no controle de *Ipomoea grandifolia*. **Bragantia**, v. 68, n. 2, p. 367-372, 2009.

NECHET, K.L.; HALFELD-VIEIRA, B.A. Fungos associados a três espécies da invasora corda-de-viola (*Ipomoea* spp.). **Tropical Plant Pathology**, v. 37, Supplement, p. 847, 2012.

NECHET, K.L.; HALFELD-VIEIRA, B.A. Seleção de fungos para o controle biológico da invasora corda-de-viola (*Ipomoea nil*). **Tropical Plant Pathology**, v. 39 Supplement, p. 319, 2014.

NECHET, K. L.; HALFELD-VIEIRA, B. A.; SANTOS, T. H. F. Efeito da concentração de inóculo na intensidade da cercosporiose em *Ipomoea nil*. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 49, 2016, Maceió. **Anais...** Maceió: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2016. p. 80.

OWEN, M. D. K. Weed species shifts in glyphosate-resistant crops. **Pest Management Science**, v. 64, p. 377-387, 2008.

PAGNONCELLI, F. B.; TREZZI, M. M.; BRUM, B.; VIDAL, R. A.; PORTES, A. F.; SCALCON, E. L.; MACHADO, A. Morning glory species interference on the development and yield of soybeans. **Bragantia**, v. 76, n. 4, p.470-479, 2017.

PAZUCH, D.; TREZZI, M. M.; TORNISIELO, V. L.; DIAS, A. C. R.; VIDAL, R. A.; FERREIRA, P. P. A.; DIESEL, F. GALLON, M.; BARANCELLI, M. V. J.; PASINI, R.; BATISTEL, S. C. Populações de corda-de-viola (*Ipomoea* spp.) da região do sudoeste do Paraná: Principais espécies e tolerância ao glyphosate. **Informativo técnico**, v. 1, n. 1, p.1-5, 2013.

PIZZO, I.V.; AZANIA, C.A.M.; AZANIA, A.A.P.M.; SCHIAVETTO, A.R. seletividade e eficácia de controle de plantas daninhas pela associação entre óleo fúsel e herbicidas em cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, v. 28, n. 2, p. 347-357, 2010.

POLLACK, F. G. **An annotated compilation of *Cercospora* names**. Mycological Memoirs, v. 12, p. 1-212, 1987.

PONS, N.; SUTTON, B. C. *Cercospora* and similar fungi on yams (*Dioscorea* spp.). **Mycological Papers**, v. 160, p. 1-78, 1988.

RAY, P.; VIJAYACHANDRAN, L. S. Evaluation of indigenous fungal pathogens from horse purslane (*Trianthema portulacastrum*) for their relative virulence and host range assessments to select a potential mycoherbicidal agente. **Weed Science**, v. 61, n. 4, p. 580-585, 2013.

RIBEIRO, D. N.; NANDULA, V. K.; DAYAN, F. E.; RIMANDO, A. M.; DUKE, S. O.; REDDY, K. N.; SHAW, D. R. Possible glyphosate tolerance mechanism in pitted morningglory (*Ipomoea lacunosa* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 1689-1697, 2015.

ROCHA, F. B.; PEREIRA, O. L.; BARRETO, R. W. *Cercospora apii* causing leaf spots on two brazilian toxic weeds: *Solanum glaucophyllum* and *Xanthium strumarium*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 142-144, 2007.

SANTOS, T. H. F dos; HALFELD-VIEIRA, B. de A.; ASSIS, M. C. de; NECHET, K. de L. Patogenicidade da micobiota de *Ipomoea* spp. para prospecção de mico-herbicida. In: Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica, 10, 2016, Campinas. **Anais...** Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite, 2016. p. 1-9.

SILVA, A. A. da; FERREIRA, F. A.; FERREIRA, L. R.; SANTOS, J. B. dos. Métodos de controle de plantas daninhas. In: SILVA, A. A. da; SILVA, J. F. da. **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. Viçosa: Editora UFV, 2007. p. 41-57.

SILVA, I. A. B.; KUVA, M. A.; ALVES, P. L. C. A.; SALGADO, T. P. Interferência de uma comunidade de plantas daninhas com predominância de *Ipomoea hederifolia* na cana-soca. **Planta Daninha**, v. 27, n. 2, p. 265-272, 2009.

SIMÃO-BIANCHINI, R.; FERREIRA, P. P. A. *Ipomoea* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB7021>>. Acesso em: 16 dez. 2017.

SCHROEDER, D. Biological control of weeds. In: FLETCHER, W. W. (Ed.). **Recent advances in weed research**. Kew: Commonwealth Agricultural Bureaux, 1983. p. 41-78.

SCHROEDER, D. Biological control of weeds: A review of principles and trends. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, p. 191-212, 1992.

SINGH, M.; SHARMA, S. D.; RAMIREZ, A. H.M.; JHALA, A. J. Glyphosate efficacy, absorption, and translocation in selected four weed species common to Florida citrus. **HortTechnology**, v. 21, n. 5, p. 599-605, 2011.

SMITH JUNIOR, R. J.; DANIEL, J. T.; FOX, W. T.; TEMPLETON, G. E. Distribution in Arkansas of a fungus disease used for biocontrol of northern jointvetch in rice. **Plant Disease Reporter**, v. 57, p. 695-697, 1973.

SOUZA, G. S. F.; MARTINS, D.; PEREIRA, M. R. R. Efeito da chuva na eficiência de herbicidas aplicados em pós-emergência sobre corda-de-viola. **Planta Daninha**, v. 31, n. 1, p. 175-184, 2013.

SPIKES, J. D. Photosensitization. In: SMITH, K. C. **The Science of Photobiology**. New York: Plenum Press, 1989. p 79-110.

STEFANOVIC, S.; AUSTIN, D. F.; OLMSTEAD, R. G. Classification of Convolvulaceae: A Phylogenetic Approach. **Systematic Botany**, v. 28, n. 4, p. 791-806, 2003.

STEWART-WADE, S. M.; NEUMANN, S.; COLLINS, L.; BOLAND, G. J. The biology of Canadian weeds. 117. *Taraxacum officinale* G.H. Weber ex Wiggers. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 82, p. 825-853, 2002.

TEBEEEST, D. O. Additions to host range of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschyromene*. **Plant Disease**, v. 72, n. 1, p. 16-18, 1988.

TEBEEEST, D. O. **Microbial control of weeds**. New York: Chapman and Hall, 1991.

TEBEEEST, D. O.; YANG, X. B.; CISAR, C. R. The status of biological control of weeds with fungal pathogens. **Annual Review Phytopathology**, v. 30, p. 637-657, 1992.

TEBEEEST, D. O. Biological control of weeds with plant pathogens and microbial pesticides. **Advances in Agronomy**, v. 56, p. 115-137, 1996.

TEMPLETON, G. E., TEBEEEST, D. O.; SMITH, R. J. Biological weed control with microherbicides. **Annual Review Phytopathology**, v. 17, p. 301-310, 1979.

TESSMANN, D. J. Controle biológico: Aplicações na área de ciências das plantas daninhas. In: OLIVEIRA JR., R. S. (Eds.). **Biologia e manejo de plantas daninhas**, 2011. p. 79-94.

TIMOSSI, P.C.; DURIGAN, J.C. Manejo de convolvuláceas em dois cultivares de soja semeada diretamente sob palha residual de cana crua. **Planta Daninha**, v. 24, n. 1, p. 91-98, 2006.

VAN DEN BOSH, R.; MESSENGER, P. S.; GUTIERREZ, A. **An introduction to biological control**. New York: Plenum Press, 1987. 247 p.

VELINI, E. D.; NEGRISOLI, E. Controle de plantas daninhas em cana crua. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 22, 2000, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, 2000. p. 148-164.

WAAGE, J. Global developments in biological control and the implications for Europe. **OEPP/EPP Bulletin**, v. 27, p. 5-13, 1997.

WALL, R. E.; PRASAD, R.; SHAMOUN, S. F. The development and potential role of mycoherbicide for forestry. **Journal of the Ancient Chronology Forum**, v. 68, p. 736-741, 1992.

WATERHOUSE, D. F. W.; NORRIS, K. R. **Biological control: Pacific prospects**. Canberra: ACIAR Monograph n. 12, 1987. 125p.

WATSON, A. K. *Sclerotinia minor* - biocontrol target or agent? In: VURRO, M.; GRESSEL, J. eds. **Novel biotechnologies for biocontrol agent enhancement and management**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 205-211.

WEILAND, J.; KOCH, G. Sugarbeet leaf spot disease (*Cercospora beticola* Sacc.). **Molecular Plant Pathology**, v. 5, p. 157-166, 2004.

YAMAZAKI, S., OKUBO, A.; AKIYAMA, Y.; FUWA, K. Cercosporin, a novel photodynamic pigment isolated from *Cercospora kikuchii*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 39, p. 287-288, 1975.

6 ARTIGO A: EFEITO DO INÓCULO, PERÍODO DE MOLHAMENTO FOLIAR E DO ESTÁDIO FENOLÓGICO DE *Ipomoea nil* NO DESENVOLVIMENTO DA CERCOSPORIOSE

6.1 RESUMO

Isolados do fungo *Cercospora* foram identificados como agentes causais da cercosporiose em cordas-de-viola (*Ipomoea* spp.), consideradas invasoras no Brasil. O fungo pode ser considerado como potencial agente de biocontrole, mas não há estudos sobre os parâmetros epidemiológicos que influenciam o desenvolvimento da doença em *Ipomoea nil*, quando se utiliza fragmentos de micélio como tipo de inóculo. Assim, o objetivo do trabalho foi determinar os efeitos da concentração de inóculo de *Cercospora*, período de molhamento foliar e do estágio fenológico de *Ipomoea nil* na intensidade da cercosporiose e desfolha de plantas. Dos oitos isolados de *Cercospora*, os isolados CMAA-1441, CMAA-1444, CMAA-1449 e CMAA-1710 foram selecionados por causar maior incidência e severidade final da doença; além disso, CMAA-1449 e CMAA-1710 também reduziram a emissão foliar de *I. nil* em relação ao controle. Para esses isolados, observou-se maior incidência da doença e desfolha em plantas inoculadas no estágio de 2 a 3 folhas definitivas, utilizando-se 10^7 fragmentos de micélio mL^{-1} , e submetidas a 6 h (CMAA-1441, CMAA-1444 e CMAA-1449) e 12 h (CMAA-1710) de molhamento foliar. Os resultados demonstram que a desfolha de *I. nil* causada por *Cercospora* depende de uma combinação de fatores epidemiológicos.

Palavras-chave: *Cercospora*, Corda-de-viola, Controle biológico, Mico-herbicida.

EFFECT OF INOCULUM, LEAF WETNESS PERIOD AND *Ipomoea nil* PHENOLOGICAL STATES ON CERCOSPORA LEAF SPOT DEVELOPMENT

6.2 ABSTRACT

Isolates of *Cercospora* fungus were identified as causal agent of cercospora leaf spot in morningglories (*Ipomoea* spp.), considered invasive in Brazil. The fungus can be considered as a potential biocontrol agent, but there are no studies of the epidemiological parameters that influence the disease development on *Ipomoea nil* by using mycelial fragments as inoculum type. Thus, the objective of this work was to select isolates of *Cercospora* with control potential, and to determine the effects of *Cercospora* inoculum concentration, leaf wetness period and *Ipomoea nil* phenological stage on the intensity of cercospora leaf spot and plant defoliation. Of the eight isolates of *Cercospora*, the isolates CMAA-1441, CMAA-1444, CMAA-1449 and CMAA-1710 were selected once they caused a higher incidence and final severity of the disease; in addition, CMAA-1449 and CMAA-1710 also reduced the leaf emission of *I. nil* compared to the control. For these isolates, it was observed a higher incidence of the disease and defoliation in inoculated plants in the stage of 2-3 leaves, using 10^7 fragments of mycelium mL^{-1} , and submitted to 6 h (CMAA-1441, CMAA-1444 and CMAA -1449) and 12 h (CMAA-1710) of dew period. The results demonstrate that *I. nil* defoliation caused by *Cercospora* depends on a combination of epidemiological parameters.

Key-words: *Cercospora*, Morningglory, Biological control, Micoherbicide.

6.3 INTRODUÇÃO

A corda-de-viola, *Ipomoea nil* (L.) Roth., é considerada uma das mais problemáticas plantas invasoras em culturas de interesse econômico no Brasil, sobretudo em cana-de-açúcar, milho e soja. Competem com as culturas, principalmente por potássio e nitrogênio, afetando seu desenvolvimento e produtividade (DUARTE et al., 2008). A redução no rendimento de grãos da soja, em função da interferência de *I. nil* associada a *Brachiaria plantaginea* (Link) Hitchc., *Digitaria horizontalis* Wild. e *Cyperus rotundus* L. varia de acordo com a densidade dessas invasoras por área, sendo estimadas perdas de 82 a 92,5% (SILVA et al., 2009). A espécie causa perdas em canaviais infestados, ocasionando tombamento de colmos e interferindo nas operações de colheita (GIANCOTTI et al., 2014).

A implantação da colheita mecanizada na cana-de-açúcar provocou importantes modificações no sistema produtivo, como a manutenção de palha sobre o solo (SOUZA et al., 2005) e o surgimento de plantas invasoras que antes não eram recorrentes nos canaviais, como as cordas-de-viola (SILVA; MONQUERO; MUNOZ, 2015). Como são espécies com hábito de crescimento trepador e seu ciclo biológico só termina após a maturação da cultura, as cordas-de-viola acabam prejudicando o desempenho operacional das colhedoras (LORENZI, 1994). Já a manutenção de quantidades de palha de cana-de-açúcar maiores que 10 t ha⁻¹ sobre o solo, em áreas infestadas com as cordas-de-viola, reduz a eficácia dos herbicidas aplicados em pré-emergência (MONQUERO et al., 2009), já que são interceptados pela superfície da palha e podem ser volatilizados e/ou fotodecompostos, até mesmo serem lixiviados para o solo (LOCKE; BRYSON, 1997).

As perdas provocadas pelas cordas-de-viola no Brasil mostram que o conjunto de técnicas utilizado para o manejo destas invasoras apresenta limitações e, que se faz necessária à introdução de métodos alternativos, como o controle biológico, que possam reduzir os prejuízos causados às culturas e a dependência do controle químico. Não há informação sobre o uso de fungos como agentes de controle biológico para o “complexo cordas-de-viola”. Nos últimos anos, alguns estudos relataram a ocorrência de fungos fitopatogênicos, como *Alternaria* sp. Ness, *Bipolaris* sp. Shoemaker e *Cercospora* sp. Fresen. ex Fuckel, associados às cordas-de-viola, com potencial para serem investigados como estratégia de controle alternativo (NECHET; HALFELD-VIEIRA, 2012) e, dentre eles observou-se que o gênero *Cercospora* é prevalente e ocorre naturalmente em maior número de espécies de *Ipomoea*. Os sintomas observados, caracterizados por manchas foliares seguidas de amarelecimento e

desfolha, indicaram que esse fungo pode ser considerado para estudos de desenvolvimento de um mico-herbicida (NECHET; HALFELD-VIEIRA, 2014).

Cercospora é um dos gêneros de fungos fitopatogênicos avaliados no controle biológico de plantas daninhas (ROCHA; PEREIRA; BARRETO, 2007). Segundo Charudattan et al. (1985) e Hasan; Ayres (1990) espécies de *Cercospora* são consideradas potenciais agentes de controle biológico de plantas daninhas devido a capacidade destrutiva, a alta especificidade aparente e o ciclo de vida assexuado simples. Espécies desse gênero, como *Cercospora caricis* Dearn. & House, *Cercospora mitracarpi-hirti* Pereira & Barreto e *Cercospora sagittariae* Ellis & Kellerm., foram identificadas como micobiota associada à *Cyperus rotundus* L. (RIBEIRO et al., 1997), *Mitracarpus hirtus* (Linn.) DC. (PEREIRA; BARRETO, 2005) e *Sagittaria montevidensis* Cham. & Schltdl (SOARES; BARRETO; BRAUN, 2009), respectivamente, e indicadas como potenciais candidatos a agentes de controle biológico dessas invasoras no Brasil. Os resultados obtidos mostraram que todas as espécies causaram severa necrose, mas apenas *C. caricis* e *C. mitracarpi-hirti* provocaram desfolha em seus hospedeiros.

O desenvolvimento de um mico-herbicida requer, primeiramente, a descoberta e identificação de fungos fitopatogênicos associados à planta daninha alvo, e em seguida a avaliação do potencial do patógeno candidato como agente de controle biológico (ASH, 2010). A identificação de fungos fitopatogênicos com potencial para desenvolver um mico-herbicida é considerada relativamente fácil, mas o caminho para o desenvolvimento de um novo produto é longo e complexo (AULD; HETHERINGTON; SMITH, 2003). De acordo com Barreto (2009) a determinação da concentração de inóculo e o efeito do agente de controle biológico sobre a planta-alvo em diferentes estádios de desenvolvimento são etapas importantes dentro de um conjunto amplo de testes realizados para a completa avaliação do fungo candidato a mico-herbicida sob condições controladas.

Embora *Cercospora* possa ser considerado um potencial agente de biocontrole das cordas-de-viola, o uso desse fungo como mico-herbicida, quando se utiliza os conídios, pode ser limitado em função da dificuldade de esporulação *in vitro*, da necessidade de uso da técnica difásica para a produção de conídios e da dependência de uma alta concentração de conídios mL^{-1} para causar desfolha nessas plantas daninhas (NECHET; SANTOS; HALFELD-VIEIRA, 2016; SANTOS; HALFELD-VIEIRA; NECHET, 2016; SILVA et al., 2016). O uso de fragmentos de micélio de *Cercospora*, obtidos por meio da técnica de

fermentação líquida, pode ser uma alternativa para superar essas limitações e viabilizar o desenvolvimento desse fitopatógeno como mico-herbicida.

Apesar disso, até o momento, não há estudo determinando as condições exigidas por *Cercospora* para estabelecimento da infecção e desenvolvimento da doença em corda-de-violão, quando se utiliza como tipo de inóculo os fragmentos de micélio, por isso, se faz necessário estabelecer uma metodologia de inoculação para o desenvolvimento da doença e, posterior seleção de isolado com potencial para a produção de um mico-herbicida. Objetivou-se com o trabalho determinar a concentração de fragmentos de micélio como inóculo, o molhamento foliar mínimo e o estágio fenológico de *I. nil* mais suscetível à infecção por *Cercospora*.

6.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no período de março de 2016 a maio de 2017, no Laboratório de Fitopatologia e em casa-de-vegetação na Embrapa Roraima, Boa Vista, RR, Brasil. Durante os ensaios, a temperatura ficou em torno de 30°C (uso de termômetro digital de máxima e mínima temperatura) e a umidade relativa do ar em 83% (uso de higrômetro de bulbo seco e úmido). A irrigação das plantas foi feita por aspersão com acionamento automático ajustado para quatro ciclos de rega por dia, com duração de um minuto e vazão de 1,9 L.

6.4.1 Origem das sementes de *I. nil*

A espécie de corda-de-viola utilizada nos ensaios foi *I. nil*, por ser suscetível a todos os isolados de *Cercospora* avaliados neste trabalho, conforme estudo prévio realizado na Embrapa Meio Ambiente por SANTOS et al. (2016). Sintomas de cercosporiose em plantas de *I. nil* estão apresentados na Figura 1.

Figura 1 – Sintomas de cercosporiose em plantas de *Ipomoea nil* inoculadas com suspensão de 10^5 conídios mL^{-1} de *Cercospora* sp.



Fotos: Nechet, K. L (2016).

As sementes desta espécie foram adquiridas comercialmente. Para obtenção de plantas nos estádios fenológicos estudados, as sementes foram depositadas em vasos plásticos de $1,0 \text{ dm}^3$ (primeiro experimento) e $2,0 \text{ dm}^3$ (segundo ao quarto experimento) contendo substrato preparado com solo, areia e esterco bovino curtido, na proporção de 1:1:1 (v/v/v).

6.4.2 Origem dos isolados fúngicos

Os isolados de *Cercospora* utilizados nesse estudo encontram-se depositados na Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental (CMAA) da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, São Paulo. O código de cada isolado, hospedeiro de origem, coletor e local de coleta são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Isolados de *Cercospora* utilizados neste estudo obtidos de *Ipomoea* spp.

Isolado	Hospedeiro de origem	Coletor	Local de coleta
CMAA-1440	<i>Ipomoea nil</i>	Nechet, K. L.	Jaguariúna-SP
CMAA-1441	<i>I. nil</i>	Nechet, K. L.	Holambra-SP
CMAA-1444	<i>Ipomoea triloba</i>	Nechet, K. L.	Jaguariúna-SP
CMAA-1445	<i>Ipomoea hederifolia</i>	Nechet, K. L.	Jaguariúna-SP
CMAA-1447	<i>Ipomoea indivisa</i>	Nechet, K. L.	Iracemápolis-SP
CMAA-1448	<i>Ipomoea grandifolia</i>	Nechet, K. L.	Jaguariúna-SP
CMAA-1449	<i>I. nil</i>	Nechet, K. L.	Jaguariúna-SP
CMAA-1710	<i>I. nil</i>	Nechet, K. L.	Jaguariúna-SP

Fonte: Nechet, K. L. (2015).

Os isolados recebidos da coleção foram repicados para placas de Petri contendo meio de cultura de Batata Dextrose Ágar (BDA) e mantidos em incubadora a 25°C com fotoperíodo de doze horas (luz do dia e luz negra) para uso na obtenção de inóculo dos isolados.

6.4.3 Produção de inóculo

Para a obtenção de fragmentos de micélio, os isolados foram semeados em placas de Petri contendo meio BDA e mantidos por 15 dias em incubadora a 25°C e fotoperíodo de doze horas (luz do dia e luz negra) para obtenção da colônia. Após esse período, cinco discos de micélio, retirados da periferia das colônias, foram transferidos para Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL do meio líquido Batata Dextrose (BD). Os Erlenmeyers foram mantidos em incubadora com agitação orbital (Shaker) a 180 rpm, a 28°C por sete dias. Posteriormente, a massa micelial obtida foi filtrada em gaze, suspensa em água destilada esterilizada e triturada por um minuto utilizando um triturador mecânico de laboratório. Uma alíquota de 1,0 mL da suspensão triturada foi retirada para quantificação de fragmentos de micélio, utilizando-se a câmara de Neubauer sob um microscópio de luz (adaptado de SANTOS et al., 2016).

6.4.3.1 Seleção de isolados de *Cercospora*

Plantas de *I. nil*, no estágio de 2 a 3 folhas definitivas (folhas sem ferimentos), foram inoculadas com suspensões de inóculo de cada um dos isolados utilizados nesse estudo na concentração de 10^5 fragmentos de micélio mL^{-1} e acrescidas de Tween 20 a 0,05%. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida, utilizando-se sacos plásticos transparentes umedecidos, por 24 h. Posteriormente, as plantas foram mantidas em condições de casa-de-vegetação. Plantas pulverizadas com água acrescida de Tween 20 a 0,05% constaram como controle (adaptado de SANTOS et al., 2016). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com nove tratamentos (oito isolados e o controle) e cinco repetições, sendo cada repetição um vaso com uma planta. As avaliações de número total de folhas e incidência de folhas com sintomas foram realizadas diariamente, durante 15 dias. A severidade final da doença foi realizada no último dia da avaliação.

6.4.3.2 Efeito da concentração de inóculo

A partir dos resultados do experimento anterior, o efeito da concentração de inóculo foi avaliado na intensidade das doenças causada por quatro isolados de *Cercospora* selecionados. Plantas de *I. nil*, no estágio de 2 a 3 folhas definitivas (folhas sem ferimentos), foram inoculadas com suspensões nas concentrações de 10^5 , 10^6 e 10^7 fragmentos de micélio mL^{-1} acrescidas de Tween 20 a 0,05%. Plantas pulverizadas com água acrescida de Tween 20 a 0,05% constaram como controle. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida, utilizando-se sacos plásticos transparentes umedecidos, por 24 h. Após esse período, as plantas foram mantidas em condições de casa-de-vegetação (adaptado de NECHET; SANTOS; HALFELD-VIEIRA, 2016). As avaliações de número total de folhas e incidência de folhas com sintomas foram realizadas diariamente, durante 28 dias. Para cada isolado, os ensaios foram conduzidos separadamente em delineamento experimental inteiramente casualizado, com três tratamentos (concentrações de fragmentos de micélio) e cinco repetições, sendo cada repetição um vaso com duas plantas.

6.4.3.3 Efeito do período de molhamento foliar

As plantas de *I. nil*, no estágio de 2 a 3 folhas definitivas (folhas sem ferimentos),

foram inoculadas com suspensões na concentração de 10^7 fragmentos de micélio acrescidas de Tween 20 a 0,05%. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida, utilizando-se sacos plásticos transparentes umedecidos, por 6, 12, 24 e 48 h. Plantas do tratamento 0 foram inoculadas e, imediatamente submetidas às condições de casa-de-vegetação. As plantas submetidas aos demais períodos de molhamento foliar foram retiradas da câmara úmida e mantidas em condições de casa-de-vegetação após cada período estabelecido (adaptado de NECHET; HALFELD-VIEIRA, 2011). As avaliações de número total de folhas e incidência de folhas com sintomas foram realizadas diariamente durante 23 dias. Para cada isolado, os ensaios foram conduzidos separadamente em delineamento experimental inteiramente casualizado, em arranjo fatorial com cinco períodos de molhamento, dois tratamentos (inoculado e não inoculado) e cinco repetições, sendo cada repetição um vaso com duas plantas. Plantas submetidas aos mesmos períodos de molhamento foliar pulverizadas com água destilada acrescida de Tween 20 a 0,05% constaram como controle.

6.4.3.4 Efeito do estágio fenológico da planta

A semeadura de *I. nil* foi realizada nos intervalos pré-determinados para se obter, na época de inoculação, plantas em quatro estádios fenológicos: 1) estágio cotiledonar (E1); 2) 2 a 3 folhas definitivas (E2); 3) plantas com flores (E3); e 4) plantas com frutos (E4). Plantas nos diferentes estádios fenológicos foram pulverizadas com suspensões de fragmentos de micélio mL^{-1} acrescidas de Tween 20 a 0,05%, e mantidas em câmara úmida, pelo período selecionado individualmente para cada um dos isolados de *Cercospora* no ensaio anterior. Após o período, as plantas foram mantidas em condições de casa-de-vegetação. Plantas nos mesmos estádios fenológicos pulverizadas com água acrescida de Tween 20 a 0,05% constaram como controle. As avaliações de número total de folhas e incidência de folhas com sintomas foram realizadas diariamente durante 23 dias. Para cada isolado, os ensaios foram conduzidos separadamente em delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (estádios fenológicos) e cinco repetições, sendo cada repetição um vaso com duas plantas.

6.4.3.5 Avaliações

A intensidade da doença foi avaliada com base na porcentagem do número de folhas

com sintomas, a partir do cálculo: Incidência (%) = Número de folhas com sintomas *100/número total de folhas. A desfolha da planta foi baseada no número total de folhas da planta do dia da inoculação até a finalização de cada ensaio. Os dados de intensidade de doença foram transformados em área abaixo da curva de progresso da incidência da doença (AACPID). A partir dos dados de número total de folhas calculou-se a área abaixo da curva de progresso de emissão de folhas (AACPEF). No final do ensaio de seleção, as folhas sintomáticas foram coletadas, escaneadas e as imagens analisadas utilizando o software ASSESS 2.0 para obtenção da porcentagem da severidade final da doença.

Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias, comparadas pelo teste de Fisher LSD a 5% de probabilidade, utilizando-se o software SAS versão 12 (SAS Institute Inc., Cary, USA).

6.5 RESULTADOS

6.5.1 Seleção de isolados de *Cercospora*

Todos os isolados de *Cercospora* testados foram patogênicos a *I. nil*, quando se utilizou fragmentos de micélio como inóculo. Sintomas de cercosporiose em plantas de *I. nil* estão apresentados na Figura 2.

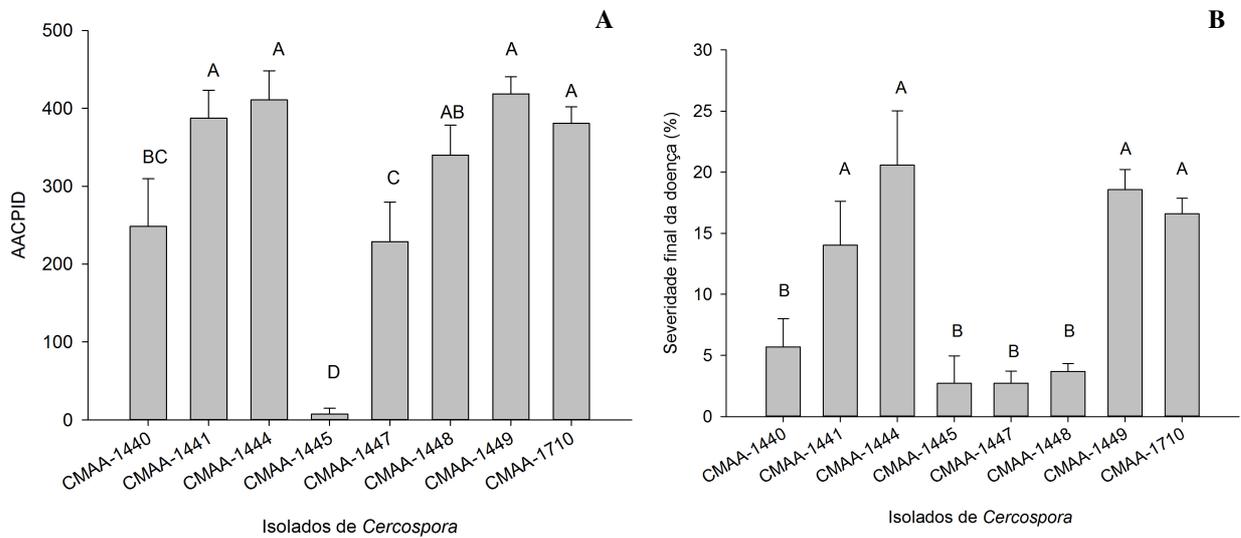
Figura 2 - Sintomas de cercosporiose em plantas de *Ipomoea nil* inoculadas com suspensão de 10^5 fragmentos de micélio mL⁻¹ de isolados de *Cercospora*.



Fotos: Barbosa, R. N. T. (2017).

Houve diferença entre os isolados quanto à incidência de folhas com sintomas e a severidade final da doença. Maior intensidade da doença foi observada em plantas inoculadas com os isolados CMAA-1449, CMAA-1444, CMAA-1441 e CMAA-1710. Os valores de AACPID foram 419 (CMAA-1449), 411 (CMAA-1444), 387 (CMAA-1441) e 381 (CMAA-1710). Para os demais isolados, os valores de AACPID foram 340 (CMAA-1448), 249 (CMAA-1440), 229 (CMAA-1447) e 8 (CMAA-1445) (Figura 3A). Os maiores valores de severidade final da doença foram 21% (CMAA-1444); 19% (CMAA-1449); 17% (CMAA-1710) e 14% (CMAA-1441). Para os demais isolados, os valores foram 6% (CMAA-1440), 4% (CMAA-1448) e 3% (CMAA-1447 e CMAA-1445) (Figura 3B).

Figura 3 - Área abaixo da curva do progresso da incidência da doença (AACPID) (A) e severidade final da doença (B) em plantas de *Ipomoea nil* inoculadas com fragmentos de micélio de isolados de *Cercospora*.

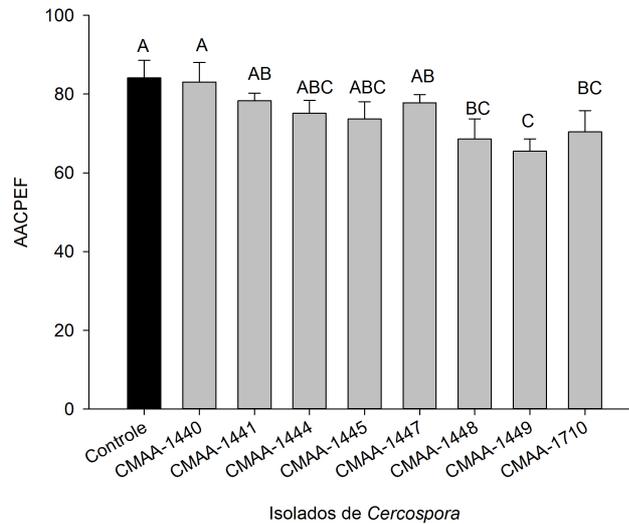


Os segmentos verticais em cada barra representam o erro padrão. Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre tratamentos não diferem estatisticamente pelo teste de Fisher LSD a 5% de probabilidade.

Baseado nos resultados obtidos para a severidade final da doença verificou-se que plantas de *I. nil* foram mais suscetíveis aos isolados CMAA-1449, CMAA-1444, CMAA-1441 e CMAA-1710, mostrando que os mesmos são capazes de causar um rápido coalescimento das lesões e o aumento da porcentagem da área lesionada. Plantas inoculadas com os isolados CMAA-1448, CMAA-1440, CMAA-1447 e CMAA-1445 não apresentaram progresso da doença semelhante no mesmo período, o que influenciou na severidade final.

Quanto à emissão de folhas, apenas as plantas inoculadas com CMAA-1449 (AACPEF= 66) e CMAA-1710 (AACPEF= 70) apresentaram diferença estatística em relação ao controle (AACPEF= 84), mostrando que os isolados são capazes de causar desfolha. Observou-se uma redução de 21% na emissão de folhas para CMAA-1449 e de 17% para CMAA-1710. As plantas inoculadas com CMAA-1448 (AACPEF= 68) também diferiram estatisticamente em relação ao controle, mas o isolado não se mostrou capaz de causar desfolha. A redução ocorreu por um declínio na emissão de folhas, e não por desfolha causada pela morte do limbo foliar. Com exceção de CMAA-1445, os demais isolados causaram desfolha, apesar das plantas inoculadas não diferirem estatisticamente do controle (Figura 4).

Figura 4 - Área abaixo da curva do progresso de emissão de folhas (AACPEF) em plantas de *Ipomoea nil* inoculadas com fragmentos de micélio de isolados de *Cercospora*.



Os segmentos verticais em cada barra representam o erro padrão. A barra na cor preta representa o controle e as barras na cor cinza representam os tratamentos. Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre tratamentos não diferem estatisticamente pelo teste de Fisher LSD a 5% de probabilidade.

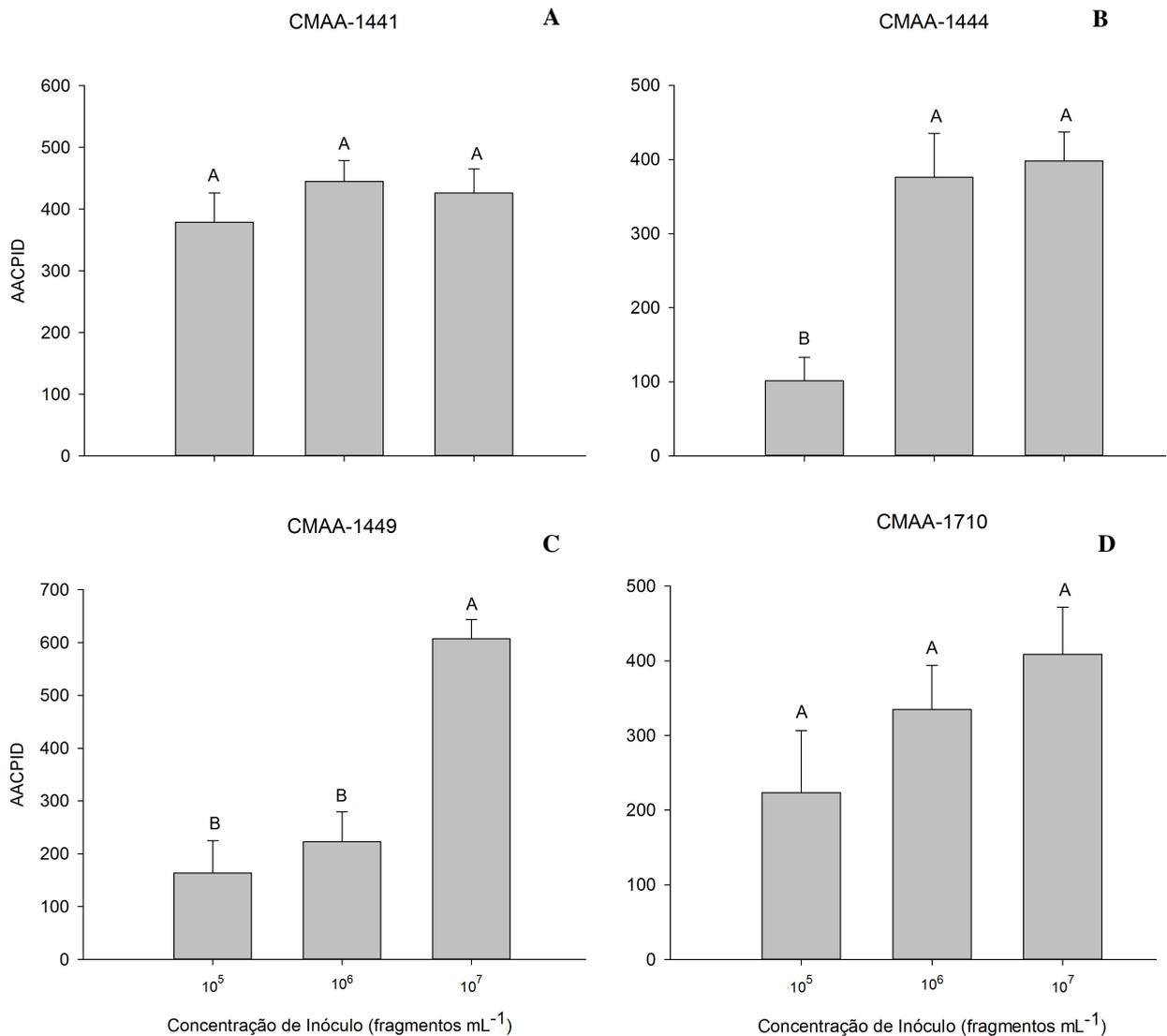
Para os isolados CMAA-1441, CMAA-1444, CMAA-1449 e CMAA-1710, o uso de fragmentos de micélio como inóculo permitiu o desenvolvimento da cercosporiose em casa-de-vegetação e a obtenção de maiores valores de incidência da doença e severidade final da doença. Baseado nos resultados de incidência e severidade final da doença, os isolados CMAA-1441, CMAA-1444, CMAA-1449 e CMAA-1710 foram selecionados para utilização nos ensaios epidemiológicos.

6.5.2 Efeito da concentração de inóculo

Para os isolados CMAA-1441 e CMAA-1710, não houve diferença estatística entre as plantas de *I. nil* inoculadas com as concentrações de 10^5 , 10^6 e 10^7 fragmentos de micélio mL^{-1} (Figuras 5A e D). Verificou-se diferença estatística na intensidade da doença entre as concentrações utilizadas para os isolados CMAA-1444 e CMAA-1449. Para o isolado CMAA-1444, não houve diferença estatística em plantas de *I. nil* inoculadas com as concentrações de 10^6 e 10^7 fragmentos de micélio mL^{-1} . Os maiores valores de incidência da doença foram obtidos em plantas de *I. nil* inoculadas com as concentrações 10^7 (AACPID= 398) e 10^6 (AACPID= 376) fragmentos de micélio mL^{-1} para CMAA-1444 (Figura 5B). Para o isolado CMAA-1449, houve diferença estatística apenas em plantas de *I. nil* inoculadas com

a concentração de 10^7 fragmentos de micélio mL^{-1} (AACPID= 607) (Figura 5C).

Figura 5 - Área abaixo da curva do progresso da incidência da doença (AACPID) em plantas de *Ipomoea nil* inoculadas com diferentes concentrações de fragmentos de micélio dos isolados de *Cercospora* CMAA-1441 (A), CMAA-1444 (B), CMAA-1449 (C) e CMAA-1710 (D).

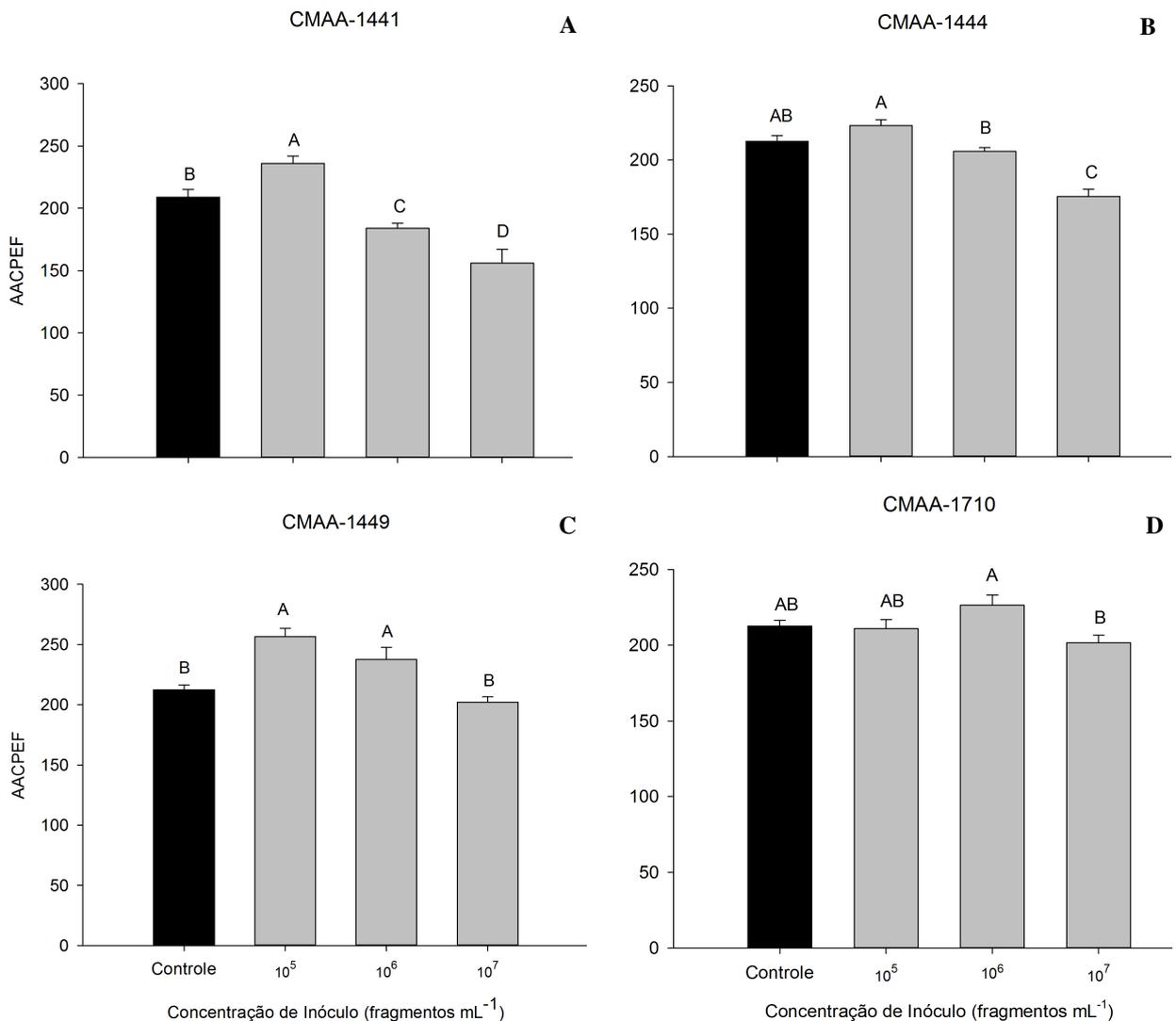


Os segmentos verticais em cada barra representam o erro padrão. Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre tratamentos não diferem estatisticamente pelo teste de Fisher LSD a 5% de probabilidade.

A emissão de folhas em plantas de *I. nil* variou em função do isolado e da concentração de inóculo (Figura 6). Para os isolados CMAA-1441 e CMAA-1444, as plantas inoculadas com 10^7 fragmentos de micélio mL^{-1} diferiram estatisticamente de 10^5 e 10^6 fragmentos e do controle (Figura 6A e B). Para esses dois isolados observou-se que quanto

maior a concentração de inóculo menor a emissão foliar. Para o isolado CMAA-1449, o valor de AACPEF das plantas inoculadas com 10^7 fragmentos de micélio mL^{-1} foi menor e diferente estatisticamente dos valores de AACPEF das plantas inoculadas com 10^5 e 10^6 fragmentos de micélio mL^{-1} , porém não diferiu da emissão foliar das plantas controle (Figura 6C). Para o isolado CMAA-1710, o valor de AACPEF das plantas inoculadas com 10^7 fragmentos de micélio mL^{-1} diferiu estatisticamente apenas das inoculadas com 10^6 fragmentos de micélio mL^{-1} (Figura 6D).

Figura 6 - Área abaixo da curva do progresso de emissão de folhas (AACPEF) em plantas de *Ipomoea nil* inoculadas com diferentes concentrações de fragmentos de micélio dos isolados de *Cercospora* CMAA-1441 (A), CMAA-1444 (B), CMAA-1449 (C) e CMAA-1710 (D).



Os segmentos verticais em cada barra representam o erro padrão. A barra na cor preta representa o controle e as barras na cor cinza representam os tratamentos. Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre tratamentos não diferem estatisticamente pelo teste de Fisher LSD a 5% de probabilidade.

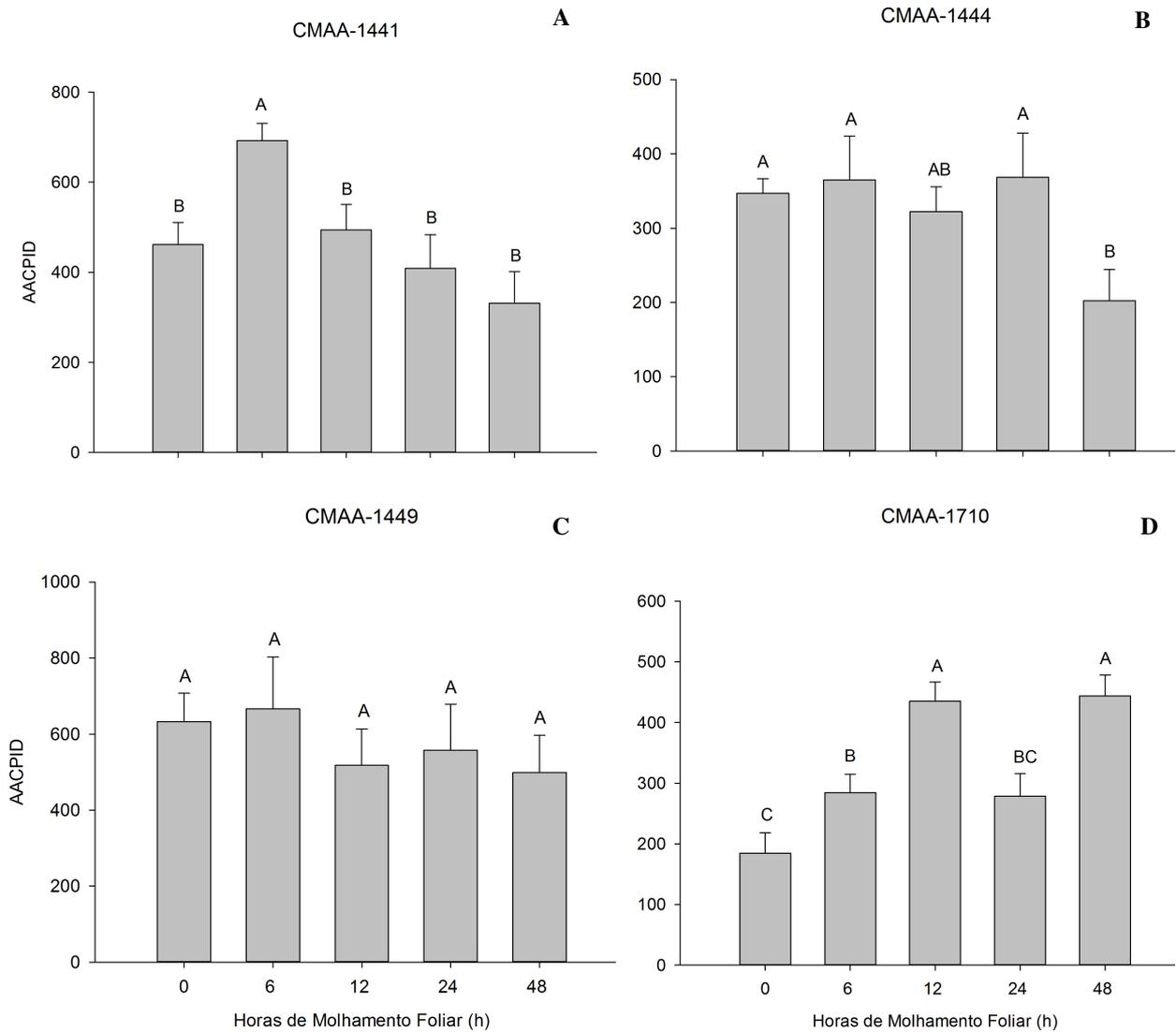
Baseado nos resultados obtidos em relação à intensidade da doença e redução de emissão foliar para todos os isolados, selecionou-se a concentração de 10^7 fragmentos de micélio mL^{-1} para continuidade dos ensaios.

6.5.3 Efeito do período de molhamento foliar

A intensidade da doença em função do período de molhamento foliar foi diferenciada para cada isolado utilizado (Figura 7).

Para o isolado CMAA-1441, a maior intensidade da doença foi observada nas plantas submetidas a 6 h de molhamento foliar após a inoculação (AACPID= 692) (Figura 7A). Para o isolado CMAA-1444, a intensidade da doença não diferiu estatisticamente para os períodos de 0 a 24 h de molhamento foliar após a inoculação. Os maiores valores de incidência foram obtidos em plantas submetidas a 24 h (AACPID= 368), 6 h (AACPID= 365) e plantas não expostas a um período de molhamento foliar após a inoculação (AACPID= 347) (Figura 7B). Plantas submetidas a 48 h de molhamento foliar após a inoculação com o isolado CMAA-1444 apresentaram menor intensidade da doença (Figura 7B). O período de molhamento foliar não influenciou na intensidade da doença em plantas inoculadas com o isolado CMAA-1449 (Figura 7C). Para o isolado CMAA-1710, os maiores valores de intensidade foram obtidos em plantas submetidas a 48 h (AACPID= 444) e 12 h (AACPID= 435) após a inoculação (Figura 7D).

Figura 7 - Área abaixo da curva do progresso da incidência da doença (AACPID) em plantas de *Ipomoea nil* submetidas a diferentes períodos de molhamento foliar após a inoculação dos isolados de *Cercospora* CMAA-1441 (A), CMAA-1444 (B), CMAA-1449 (C) e CMAA-1710 (D).



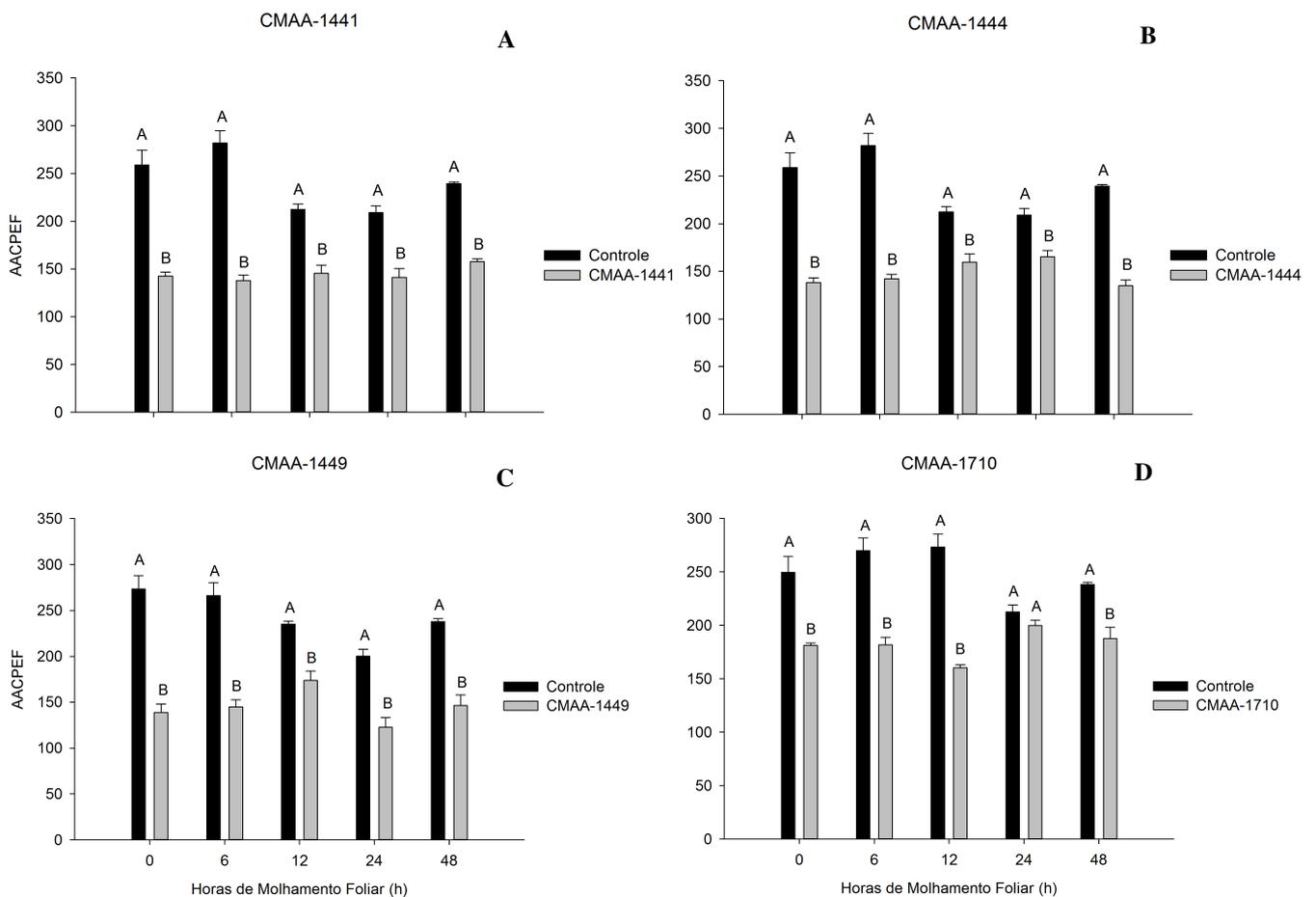
Os segmentos verticais em cada barra representam o erro padrão. Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre tratamentos não diferem estatisticamente pelo teste de Fisher LSD a 5% de probabilidade.

Para os isolados CMAA-1441, CMAA-1444 e CMAA-1449, houve diferença estatística entre a emissão de folhas de todos os períodos de molhamento foliar com o controle. Para CMAA-1710, observou-se diferença estatística entre a emissão de folhas dos períodos de 0, 6, 12 e 48 h.

Os valores da AACPEF dos períodos de molhamento foliar diferiram estatisticamente para cada isolado utilizado. Para CMAA-1441, CMAA-1444 e CMAA-1449, a inoculação reduziu o progresso da emissão de folhas em todos os períodos de molhamento

(Figuras 8A, B e C). Mas, verificaram-se as maiores reduções (51% - CMAA-1441; 50% - CMAA-1444; e 45% - CMAA-1449) na emissão de folhas em plantas submetidas a 6 h de molhamento após a inoculação quando comparadas ao controle. Plantas inoculadas com CMAA-1710 apresentaram redução do progresso da emissão de folhas nos períodos de molhamento foliar 0, 6, 12 e 48 h (Figura 8D). Porém, as plantas submetidas a 12 h de molhamento após a inoculação apresentaram a maior redução (41%) na emissão de folhas quando comparadas ao controle. Os resultados indicam que o uso de 6 h (CMAA-1441, CMAA-1444 e CMAA-1449) e 12 h (CMAA-1710) de molhamento foliar após a inoculação foi suficiente para permitir o desenvolvimento da cercosporiose e obter maior desfolha em *I. nil*.

Figura 8 - Área abaixo da curva do progresso de emissão de folhas (AACPEF) em plantas de *Ipomoea nil* submetidas a diferentes períodos de molhamento foliar após a inoculação dos isolados de *Cercospora* CMAA-1441 (A), CMAA-1444 (B), CMAA-1449 (C) e CMAA-1710 (D).

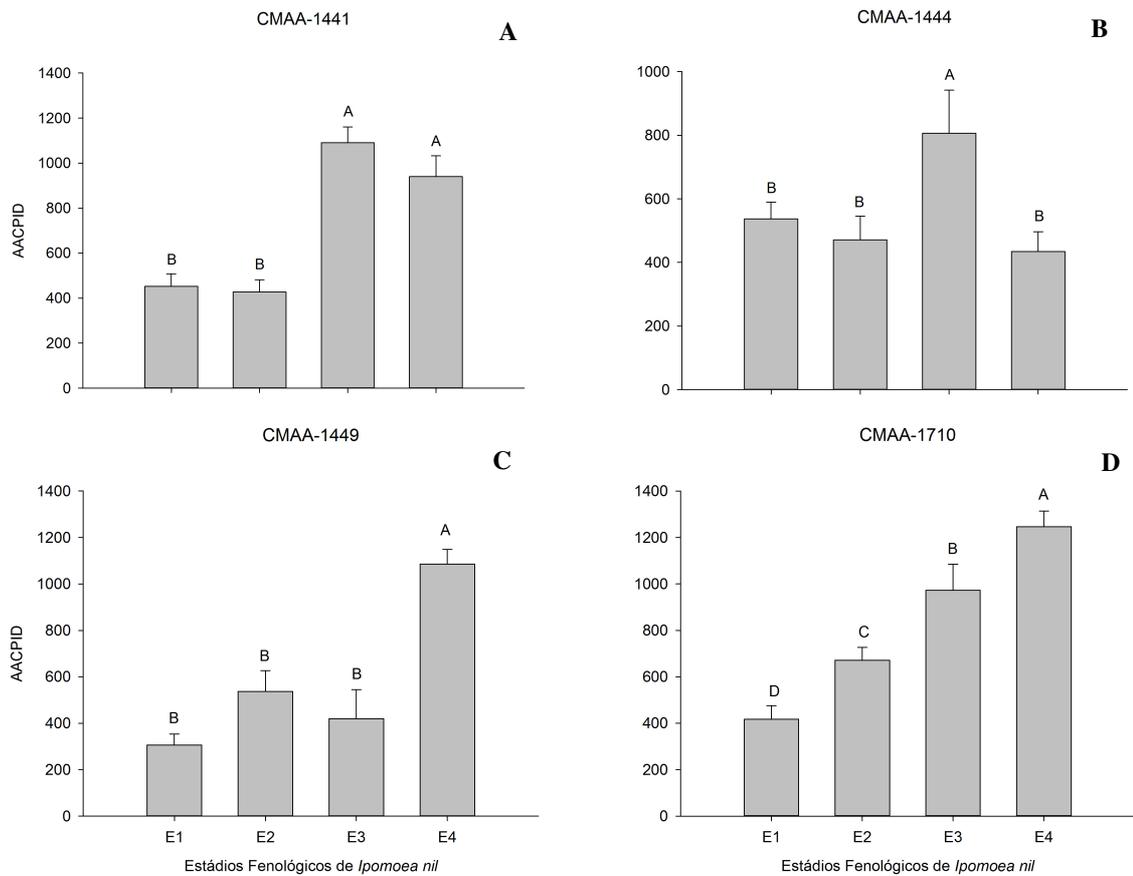


Os segmentos verticais em cada barra representam o erro padrão. As barras na cor preta representam os controles e as barras na cor cinza representam os tratamentos. Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre tratamentos não diferem estatisticamente pelo teste de Fisher LSD a 5% de probabilidade.

6.5.4 Efeito do estágio fenológico da planta

Houve diferença estatística entre os valores obtidos para a intensidade da doença em função do estágio fenológico do hospedeiro para todos os isolados utilizados (Figura 9). Para o isolado CMAA-1441, os maiores valores de intensidade da doença foram observados em plantas nos estádios fenológicos E3 (AACPID= 1090) e E4 (AACPID= 940) (Figura 9A). Para o isolado CMAA-1444, o maior valor de intensidade da doença foi observado no estágio E3 (AACPID= 806) (Figura 9B). Para os isolados CMAA-1449 e CMAA-1710, maior intensidade da doença foi observada no estágio E4 (AACPID=1086; AACPID=1247, respectivamente) (Figura 9C e D).

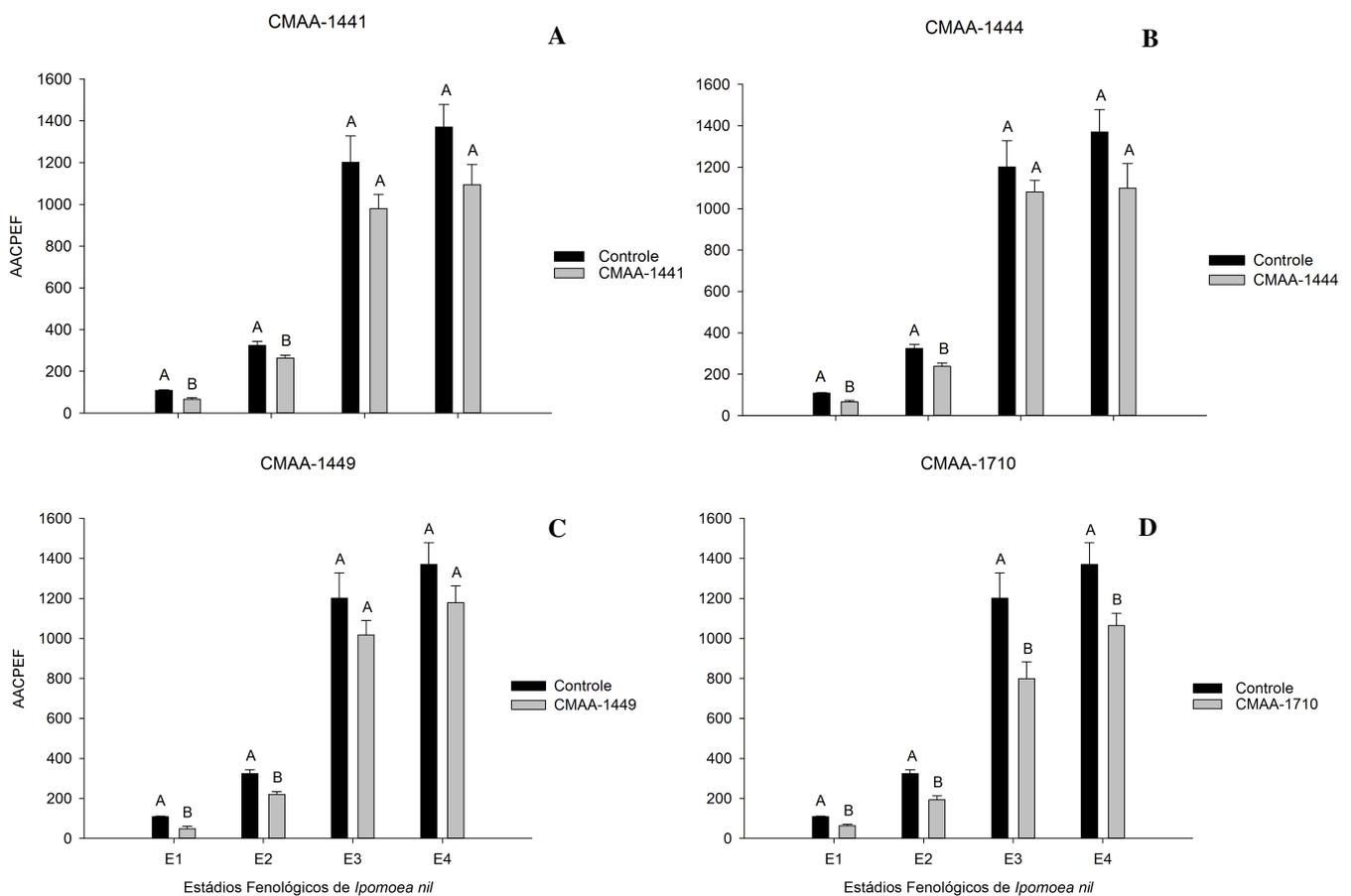
Figura 9 - Área abaixo da curva do progresso de incidência da doença (AACPID) em plantas de *Ipomoea nil* inoculadas com os isolados de *Cercospora* CMAA-1441 (A), CMAA-1444 (B), CMAA-1449 (C) e CMAA-1710 (D), nos seguintes estádios fenológicos: folhas cotiledonares (E1), 2 a 3 folhas definitivas (E2), plantas com flores (E3) e plantas com frutos (E4).



Os segmentos verticais em cada barra representam o erro padrão. Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre tratamentos não diferem estatisticamente pelo teste de Fisher LSD a 5% de probabilidade.

Observou-se diferença estatística nos valores obtidos para a AACPEF dos estádios fenológicos da planta para cada isolado utilizado em relação ao controle (Figura 10). Plantas inoculadas com os isolados CMAA-1441, CMAA-1444 e CMAA-1449 apresentaram desfolha (menores valores de AACPEF) apenas nos estádios fenológicos E1 e E2 (Figuras 10A, B e C). Para CMAA-1710, observou-se que em todos os estádios utilizados a inoculação reduziu a emissão de folhas pelas plantas (Figura 10D). Os resultados obtidos mostram que plantas de *I. nil* são mais suscetíveis aos isolados CMAA-1441, CMAA-1444, CMAA-1449 e CMAA-1710 no estágio de 2 a 3 folhas definitivas.

Figura 10 - Área abaixo da curva do progresso de emissão de folhas (AACPEF) em plantas de *Ipomoea nil* inoculadas com os isolados de *Cercospora* CMAA-1441 (A), CMAA-1444 (B), CMAA-1449 (C) e CMAA-1710 (D), nos seguintes estádios fenológicos: folhas cotiledonares (E1), 2 a 3 folhas definitivas (E2), plantas com flores (E3) e plantas com frutos (E4).



Os segmentos verticais em cada barra representam o erro padrão. As barras na cor preta representam os controles e as barras na cor cinza representam os tratamentos. Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre tratamentos não diferem estatisticamente pelo teste de Fisher LSD a 5% de probabilidade.

6.6 DISCUSSÃO

O presente trabalho identificou os parâmetros epidemiológicos para o desenvolvimento da cercosporiose e desfolha de *I. nil*. Os resultados demonstram que há diferença entre os requisitos selecionados em função do isolado de *Cercospora* utilizado. O uso de fragmentos de micélio de *Cercospora* como inóculo mostrou-se eficaz para infectar e causar desfolha em *I. nil*. Os isolados CMAA-1441, CMAA-1444, CMAA-1449 e CMAA-1710 foram selecionados por apresentarem maior agressividade com o uso deste inóculo e superarem os resultados obtidos com os isolados CMAA-1440, CMAA-1445, CMAA-1447 e CMAA-1448.

O uso de uma concentração alta de inóculo (10^7 fragmentos de micélio mL^{-1}) dos isolados selecionados foi um fator importante tanto para a ocorrência da infecção quanto para uma maior desfolha das plantas inoculadas, sugerindo que a doença apresenta um maior desenvolvimento nesta concentração, além de um período de incubação menor (sete dias) quando comparado com o período de incubação dos outros tratamentos (dez a doze dias).

Os resultados obtidos por Nechet; Santos; Halfeld-Vieira (2016), relacionados à determinação da concentração de inóculo de *Cercospora* para inoculação de *I. nil*, indicam que apenas a concentração de 10^7 conídios mL^{-1} de *Cercospora* sp. foi capaz de causar maior intensidade da doença e desfolha em plantas de *I. nil*. Embora a concentração de inóculo seja a mesma quando se utiliza como tipo de inóculo os fragmentos de micélio e os conídios de *Cercospora*, a facilidade de se produzir fragmento de micélio apenas utilizando meio líquido pode ser considerada uma vantagem frente a técnica difásica, que é utilizada para a produção de conídios de *Cercospora*, além de reduzir o tempo de produção do inóculo. Em outros patossistemas, o uso de micélio como inóculo aumentou a eficácia de fungos testados como mico-hercibidas no controle das plantas-alvo. Bailey et al. (2011) verificaram que apenas o micélio de *Phoma macrostoma* Mont. aplicado em pré ou pós-emergência ao solo causou fotodegradação e redução de peso fresco de *Taraxacum officinale* Weber ex F. H. Wigg. Boyette; Hoagland; Stetina (2014) obtiveram 90% de controle de *Sesbania exaltata* (Raf.). Rydb. Ex A. W. Hill, quando utilizaram 50 g de micélio seco L^{-1} de *Myrothecium verrucaria* (Alb. & Schwein.). Ditmar.

A exposição das plantas inoculadas com os isolados CMAA-1441, CMAA-1444, CMAA-1449 e CMAA-1710 a um período mínimo de 6h e 12 h molhamento após a inoculação causou uma maior desfolha de *I. nil*. Com o tempo mínimo de molhamento, os isolados demandaram de um menor período de tempo para iniciar a infecção (sete dias após a

inoculação) e foram capazes de causar doença em intensidade similar ou superior aos demais tratamentos. A partir deste resultado, estabeleceu-se 6 h e 12 h de molhamento foliar como os períodos mínimos necessários para o desenvolvimento da cercosporiose e a obtenção de maior desfolha em plantas de *I. nil*. Para algumas espécies de *Cercospora*, o molhamento foliar é considerado um fator condicionante para a ocorrência da infecção e a intensidade da doença (SILVA; POZZA; RESENDE, 2015). Trabalhos com diferentes patossistemas mostram que o aumento da intensidade da doença não está necessariamente relacionado a um maior período de molhamento foliar (PITELLI; AMORIM, 2003; ALVES et al., 2009; NECHET; HALFELD-VIEIRA, 2011).

Os estádios fenológicos de planta com flores e plantas com frutos apresentaram a maior de incidência de doença, quando pulverizados com os isolados CMAA-1441, CMAA-1444 e CMAA-1449, mas as maiores reduções na emissão de folhas de *I. nil* foram obtidas em plantas nos estádios cotiledonar (39% - CMAA-1441 e CMAA-1444; e 55% - CMAA-1449) e de 2 a 3 folhas definitivas (19% - CMAA-1441; 27% - CMAA-1444; e 32% - CMAA-1449). Além disso, no estágio cotiledonar foi observada uma porcentagem de 20% (CMAA-1441 e CMAA-1444) e de 55% (CMAA-1449) de plantas mortas. Como a maior desfolha só ocorreu nos estádios E1 e E2 é possível que o uso dos isolados seja mais indicado para estádios mais jovens da planta no momento da aplicação, pois não apresentaram capacidade para emitir novas folhas, à medida que a incidência de doença aumentava, como os estádios E3 e E4. Por outro lado, o isolado CMAA-1710 foi capaz de reduzir a emissão de folhas de *I. nil* em qualquer estágio fenológico (41% em E1; 40% em E2; 33% em E3; e 22% em E4) e manter o progresso da incidência de doença, à medida em que a planta emitiu folhas. Isso indica que o isolado pode ter apresentado ciclos secundários da doença, produzindo inóculo suficiente para iniciar novas infecções nas plantas. A alta concentração de inóculo proporciona uma melhor distribuição do propágulo na superfície da planta e, conseqüentemente, induz alta produção de inóculo inicial, a partir do qual podem ocorrer ciclos sucessivos de infecção (CHARUDATTAN, 1988; VAN DER PLANK, 1975).

No patossistema *I. nil* x *Cercospora*, plantas no estágio fenológico de 2 a 3 folhas definitivas foram mais suscetíveis à cercosporiose. Neste estágio, as plantas sofreram desfolhas e não foram capazes de emitir novas folhas como as plantas nos estádios E3 e E4. A suscetibilidade de diferentes plantas daninhas às potenciais agentes de controle biológico pode variar com a idade da planta (NEUMANN; BOLAND, 2002). Contudo, alguns estudos mostram que plantas em estádios mais jovens são mais suscetíveis a potenciais agentes de

controle biológico do que plantas em estádios mais avançado. Neumann; Boland (2002) observaram que *T. officinale* com quatro semanas de idade foram mais suscetíveis a *Phoma herbarum* Westend do que as plantas com seis e oito semanas de idade, contendo botões florais e flores. Já *Fallopia japonica* (Houtl.). Ronse Decr. foi mais suscetível a *Mycosphaerella polygони-cuspidati* Hara no estágio de folha jovem (sete a doze dias após a emergência) (KUROSE et al., 2015). Boyette et al. (2015) obtiveram um controle mais efetivo de *Commelina diffusa* Burm. f. quando *Phoma commelinicola* (E. Young) Gruyter foi inoculado nos estádios cotiledonar e de primeiras folhas verdadeiras.

A produção de mico-herbicidas a baixos custos é facilitada pela utilização de micélio fresco (BOYETTE et al., 1991). No presente trabalho, a técnica de cultivo de micélio de *Cercospora* produziu inóculo suficiente para avaliar o patossistema e identificar os parâmetros epidemiológicos que influenciam o desenvolvimento da cercosporiose em condições controladas. A produção de micélio de *Cercospora* atendeu a uma das exigências para o desenvolvimento de fitopatógenos como mico-herbicidas, a fácil produção em massa do fungo *in vitro*, o que representaria um êxito para a viabilidade comercial de um mico-herbicida para controlar plantas do “complexo cordas-de-viola”. Como mencionado na literatura, a produção comercial de um mico-herbicida exige que o inóculo do fungo seja produzido em massa sob condições controladas (LIMA; SOARES; BARRETO, 2010).

A partir dos resultados obtidos, identificou-se a concentração de inóculo de *Cercospora*, o período de molhamento foliar e o estágio fenológico de *I. nil* que influenciam na intensidade da cercosporiose e na desfolha de plantas causada *Cercospora* em condições controladas. Os resultados obtidos mostram que, para cada isolado de *Cercospora* utilizado, a desfolha de plantas de *I. nil* é dependente de uma combinação dos fatores epidemiológicos estudados. Estas informações definiram um protocolo visando à seleção de isolados de *Cercospora* com potencial para o desenvolvimento de um mico-herbicida em condições controladas, onde se deve inocular as plantas no estágio de 2 a 3 folhas definitivas na concentração de 10^7 fragmentos de micélio mL⁻¹ e submetidas a 6 h e 12 h de molhamento foliar após a inoculação para se obter condições favoráveis ao desenvolvimento da cercosporiose.

6.7 CONCLUSÕES

Fragmentos de micélio de *Cercospora* podem ser utilizados como inóculo para o desenvolvimento da cercosporiose em *Ipomoea nil*.

A maior intensidade da cercosporiose e desfolha de *I. nil* foram obtidas com a concentração de 10^7 fragmentos de micélio mL⁻¹ e o molhamento foliar variando entre seis e doze horas, em plantas no estágio de 2 a 3 folhas definitivas.

REFERÊNCIAS

- ALVES, M. C.; POZZA, E. A.; COSTA, J. C. B.; FERREIRA, J. B.; ARAÚJO, D. V. de. Intensidade do oídio *Microsphaera diffusa* Cke. & Pk. em cultivares de soja [*Glycine max* (L.) Merr.] sob diferentes temperaturas e períodos de molhamento foliar. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. spe, p. 1926-1930, 2009.
- ASH, G. J. The science, art and business of successful bioherbicides. **Biological Control**, v.52, p. 230-240, 2010.
- AULD, B. A.; HETHERINGTON, S. D.; SMITH, H. E. Advances in bioherbicide formulation. **Weed Biology and Management**, v. 3, p. 61-67, 2003.
- BARRETO, R. W. Controle biológico de plantas daninhas com fitopatógenos. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 101-128.
- BAILEY, K. L.; PITT, W. M.; LEGGETT, F.; SHEEDY, C.; DERBY, J. Determining the infection process of *Phoma macrostoma* that leads to bioherbicidal activity on broadleaved weeds. **Biological Control**, v. 59, p. 268–276, 2011.
- BOYETTE, C. D.; WEIDEMANN, G. J.; TE BEEST, D. O.; QUIMBY JR., P. C. Biological control of jimsonweed (*Datura stramonium*) with *Alternaria crassa*. **Weed Science**, v. 39, n. 4, p. 678-681, 1991.
- BOYETTE, C. D.; HOAGLAND, R. E.; STETINA, K. C. Biological control of the weed hemp sesbania (*Sesbania exaltata*) in rice (*Oryza sativa*) by the fungus *Myrothecium verrucaria*. **Agronomy**, v. 4, n. 1, p. 74-89, 2014.
- BOYETTE, C. D.; HOAGLAND, R. E.; STETINA, K. C. Biological control of the spreading dayflower (*Commelina diffusa*) with the fungal pathogen *Phoma commelinicola*. **Agronomy**, v. 5, n. 4, p. 519-536, 2015.
- CHARUDATTAN, R., LINDA, S. B., KLUEPFEL, M., OSMAN, Y. A., Biocontrol efficacy of *Cercospora rodmanii* on waterhyacinth. **Phytopathology**, v. 75, n. 11, p. 1263–1269, 1985.
- CHARUDATTAN, R. Inundative control of weeds with indigenous fungal pathogens. In: BURGE, M.N. (Ed.). **Fungi in Biological Control Systems**. Manchester: Manchester University Press, 1988. p. 88–110.
- DUARTE, D. J.; BIANCO, S.; MELO, M. N.; CARVALHO, L. B. Crescimento e nutrição mineral de *Ipomoea nil*. **Planta Daninha**, v. 26, n. 3, p. 577-583, 2008.
- GIANCOTTI, P. R. F.; TOLEDO, R. E. B.; ALVES, P. L. C. A.; VICTORIA FILHO, R.; CASON, J. B.; ROCHA, M. G. Chemical control of morningglory as a function of water restriction levels. **Planta Daninha**, v. 32, n. 2, p. 345-353, 2014.
- HASAN, S.; AYRES, P. G. The control of weeds through fungi: Principles and prospects.

New Phytologist, v. 115, n. 23, p. 201-222, 1990.

KUROSE, D.; FURUYA, N.; SEIER, M. K.; DJEDDOUR, D. H.; EVANS, H. C.; MATSUSHITA, Y.; TSUCHIYA, K.; TSUSHIMA, S. Factors affecting the efficacy of the leaf-spot fungus *Mycosphaerella polygona-cuspidati* (Ascomycota): A potential classical biological control agent of the invasive alien weed *Fallopia japonica* (Polygonaceae) in the UK. **Biological Control**, v. 85, p. 1–11, 2015.

LIMA, B. V.; SOARES, D. J.; BARRETO, R. W. Inoculum density of *Plectosporium alismatis*, a potential mycoherbicide, in relation to control of the aquatic weed *Sagittaria montevidensis*. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 4, p. 236-240, 2010.

LOCKE, M.A.; BRYSON, C.T. Herbicide-soil interaction in reduced tillage and plant residue management systems. **Weed Science**, v. 45, n. 2, p. 307-320, 1997.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**. 4. ed. Nova Odessa: Plantarum, 1994. 440 p.

MONQUERO, P. A.; AMARAL, L. R.; SILVA, A. C.; BINHA, D. P.; SILVA, P. V. Eficácia de herbicidas em diferentes quantidades de palha de cana-de-açúcar no controle de *Ipomoea grandifolia*. **Bragantia**, v. 68, n. 2, p. 367-372, 2009.

NECHET, K. de L.; HALFELD-VIEIRA, B. A. Efeito do inóculo, período de molhamento foliar e do estágio fenológico do feijão-caupi no desenvolvimento da mela. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. 2, p. 104-109, 2011.

NECHET, K. L.; HALFELD-VIEIRA, B. A. Fungos associados a três espécies da invasora corda-de-viola (*Ipomoea* spp.). **Tropical Plant Pathology**, v. 37, Supplement, p. 847, 2012.

NECHET, K. L.; HALFELD-VIEIRA, B. A. Seleção de fungos para o controle biológico da invasora corda-de-viola (*Ipomoea nil*). **Tropical Plant Pathology**, v. 39, Supplement, p. 319, 2014.

NECHET, K. L.; HALFELD-VIEIRA, B. A.; SANTOS, T. H. F. Efeito da concentração de inóculo na intensidade da cercosporiose em *Ipomoea nil*. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 49, 2016, Maceió. **Anais...** Maceió: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2016. p. 80.

NEUMANN, S.; BOLAND, G. J. Influence of host and pathogen variables on the efficacy of *Phoma herbarum*, a potential biological control agent of *Taraxacum officinale*. **Canadian Journal of Botany**, v. 80, n. 4, p. 425–429, 2002.

PEREIRA, O. L.; BARRETO, R. W. The mycobiota of the weed *Mitracarpus hirtus* in Minas Gerais (Brazil), with particular reference to fungal pathogens for biological control. **Australasian Plant Pathology**, v. 34, p. 41-50, 2005.

PITELLI, R. L. C. M.; AMORIM, L. Effects of different dew periods and temperatures on infection of *Senna obtusifolia* by a Brazilian isolate of *Alternaria cassiae*. **Biological Control**, v. 28, p. 237–242, 2003.

RIBEIRO, Z. M. A.; MELLO, S. C. M.; FURLANETTO, C.; FIGUEIREDO, G.; FONTES, E. M. G. Characteristics of *Cercospora caricis*, a potential biocontrol agent of *Cyperus rotundus*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 513-519, 1997.

ROCHA, F. B.; PEREIRA, O. L.; BARRETO, R. W. *Cercospora apii* causing leaf spots on two brazilian toxic weeds: *Solanum glaucophyllum* and *Xanthium strumarium*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 142-144, 2007.

SANTOS, T. H. F.; HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K. L. Otimização da produção de inóculo de um isolado de *Cercospora* sp. associado à *Ipomoea nil*. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 49, 2016, Maceió. **Anais...** Maceió: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2016. p. 32.

SILVA, A. F.; CONCENÇO, G.; ASPIAZÚ, I.; FERREIRA, E. A.; GALON, L.; FREITAS, M. A. M.; SILVA, A. A.; FERREIRA, F. A. Período anterior à interferência na cultura da soja-RR em condições de baixa, média e alta infestação. **Planta Daninha**, v. 27, n. 1, p. 57-66, 2009.

SILVA, P. V.; MONQUERO, P. A.; MUNHOZ, W. S. Controle em pós-emergência de plantas daninhas por herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar. **Revista Caatinga**, v. 28, n. 4, p. 21-32, 2015.

SILVA, M. G.; POZZA, E. A.; RESENDE, M. L. V. Importância de variáveis climáticas na cercosporiose do cafeeiro. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 23, 2015.

SILVA, M. G.; POZZA, E. A.; LIMA, C. V. R. V.; FERNANDES, T. J. Interação da temperatura e intensidade luminosa na esporulação e germinação de conídios de *Cercospora coffeicola*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, n. 2, p. 198-204, 2016.

SOARES, D. J.; BARRETO, R. W.; BRAUN, U. Brazilian mycobiota of the aquatic weed *Sagittaria montevidensis*. **Mycologia**, v. 101, n. 3, p. 401-416, 2009.

SOUZA, Z. M.; PRADO, R. M.; PAIXÃO, A. C. S.; CESARIN, L. G. Sistemas de colheita e manejo da palhada de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 3, p. 271-278, 2005.

VAN DER PLANK, J. E. **Principles of Plant Infection**. New York: Academic Press, 1975. 2016 p.

7 ARTIGO B: SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Cercospora* PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE CORDAS-DE-VIOLA

7.1 RESUMO

A ocorrência de cordas-de-viola (*Ipomoea* spp.) tem comprometido a colheita mecanizada da cana-de-açúcar e causado sérias perdas a produtividade da cultura, em virtude da baixa eficiência dos herbicidas na presença da palha. Nessa condição, o controle biológico pelo método de mico-herbicidas pode ser considerado uma alternativa de controle dessas espécies invasoras. Portanto, o objetivo deste trabalho foi identificar, dentre quatro isolados de *Cercospora* patogênicos a *Ipomoea nil*, isolados capazes de infectar e causar dano em *Ipomoea grandifolia*, *Ipomoea hederifolia* e *Ipomoea quamoclit*. Os isolados foram inoculados nas quatro espécies de *Ipomoea* utilizando parâmetros epidemiológicos pré-selecionados (10^7 fragmentos de micélio mL⁻¹, molhamento foliar entre seis e doze horas, e plantas com 2 a 3 folhas definitivas). As avaliações de incidência e severidade da cercosporiose e de desfolha foram realizadas semanalmente. Dos quatro isolados de *Cercospora* testados, os isolados CMAA-1441 e CMAA-1710 foram patogênicos a *I. nil*, *I. quamoclit*, *I. hederifolia* e *I. gradifolia*. O isolado CMAA 1449 foi específico a *I. nil* e *I. quamoclit*, enquanto o isolado CMAA-1444 foi específico a *I. nil*. Apenas os isolados CMAA-1441 e CMAA-1449 causaram desfolha e, esta foi restrita a *I. nil*.

Palavras-chave: Cercosporiose, *Ipomoea grandifolia*, *Ipomoea hederifolia*, *Ipomoea nil*, *Ipomoea quamoclit*, Mico-herbicida.

SELECTION OF *Cercospora* ISOLATES FOR THE BIOLOGICAL CONTROL OF MORNINGGLORIES

7.2 ABSTRACT

The occurrence of morningglories have compromised mechanized harvesting of sugarcane and caused serious losses in crop productivity due to the low efficiency of herbicides in the presence of straw. In this condition, the biological control by using the myco-herbicide method can be considered an alternative in the control of these important weeds. Therefore, the objective of this work was to identify, among four isolates of *Cercospora* pathogenic to *Ipomoea nil*, the isolates capable of infecting and causing defoliation on *Ipomoea grandifolia*, *Ipomoea quamoclit* and *Ipomoea hederifolia*. The isolates were inoculated in these four *Ipomoea* species considering epidemiological parameters previously selected (10^7 mycelium fragments mL⁻¹, 6 to 12 h of dew period, plants with 2 to 3 leaves). The evaluations of the incidence and severity of cercospora leaf spot and defoliation were carried out weekly. The isolates CMAA-1441 and CMAA-1710 were pathogenic to *I. nil*, *I. quamoclit*, *I. hederifolia* and *I. grandifolia*. The isolate CMAA 1449 was specific to *I. nil* and *I. quamoclit*, while the isolate CMAA-1444 was specific to *I. nil*. The defoliation was observed only on plants inoculated with the isolates CMAA-1441 and CMAA-1449, and it was restricted to *I. nil*.

Key-words: Cercospora leaf spot, *Ipomoea grandifolia*, *Ipomoea hederifolia*, *Ipomoea nil*, *Ipomoea quamoclit*, Micoherbicide.

7.3 INTRODUÇÃO

A implantação da colheita mecanizada da cana-de-açúcar alterou significativamente a composição da flora infestante em função da manutenção de uma camada de palha sobre o solo e da supressão da prática da queimada (KUYA et al., 2008). Nesse sistema produtivo, espécies infestantes, como as cordas-de-viola, encontraram um ambiente mais favorável ao seu desenvolvimento (MONQUEIRO et al., 2011) e passaram a ser predominantes nos canaviais (SILVA, MONQUERO, MUNHOZ, 2015).

As cordas-de-viola (*Ipomoea* spp. L.) são plantas anuais, trepadeiras, herbáceas, reproduzidas por sementes (KISSMANN; GROTH, 1999), que pertencem à família Convolvulaceae (LORENZI; SOUZA, 2001), e são amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do mundo (CAO et al., 2005). No Brasil, as cordas-de-viola são consideradas plantas infestantes de importantes culturas agrícolas, como café, soja, milho e cana-de-açúcar, causando prejuízos e sérios problemas na colheita e na qualidade do produto colhido (NORSWORTHY; OLIVER, 2002). Essas espécies também têm interferido no crescimento de espécies arbóreas em áreas de restauração ecológica (MONQUERO et al., 2015).

Entre as espécies do gênero, *Ipomoea nil* (L.) Roth, *Ipomoea quamoclit* L., *Ipomoea hederifolia* L. e *Ipomoea grandifolia* (Dammer) O'Donnell destacam-se como importantes plantas daninhas, particularmente em sistemas com colheita mecanizada (KUYA et al., 2007). Na cana-de-açúcar, por exemplo, *I. hederifolia* reduziu em 36% a produtividade do açúcar total recuperável do caldo (SILVA et al., 2009). Na cultura da soja, *I. nil* associada com *Brachiaria plantaginea* (Link) Hitchc., *Digitaria horizontalis* Wild. e *Cyperus rotundus* L. causou perdas de 82 a 92,5% no rendimento de grãos (SILVA et al., 2009). Já a competição de *I. quamoclit* por nitrogênio e potássio pode comprometer o crescimento, desenvolvimento e a produtividade da cana-de-açúcar, soja e milho (CARVALHO; BIANCO; PITELLI, 2009). A interferência de espécies de corda-de-viola, como *I. grandifolia*, na dinâmica de comunidades florestais restauradas tem reduzido o conteúdo de macro e micronutrientes e, comprometido o crescimento de espécies arbóreas (MONQUERO et al., 2015).

No sistema de produção da cana-crua, o uso de herbicidas é o método de controle mais utilizado, pois as camadas de palha de até 20 t ha⁻¹ sobre o solo, não exercem efeito supressor sobre a germinação e emergência das cordas-de-viola (AZANIA; HIRATA; AZANIA, 2011). Até mesmo os herbicidas aplicados em pré e pós-emergência têm sua

eficiência reduzida com a permanência da camada de palha sobre o solo (SIMONI et al., 2006; CHRISTOFFOLETI et al., 2007), uma vez que são interceptados e podem ser fotodegradados, volatilizados e até mesmo adsorvidos pelos resíduos vegetais (MERSIE et al., 2006) antes da ação da água da chuva ou da irrigação (CORREIA; CAMILO; SANTOS, 2013). Com isso, há surgimento de novos fluxos de emergência de plântulas de cordas-de-viola (MONQUERO et al., 2009; PIZZO et al., 2010), o que acaba por dificultar o controle dessas espécies. Nesse contexto, as cordas-de-viola são reconhecidas como um alvo potencial para novas formas de manejo (SANTOS et al., 2016).

O controle biológico pode desempenhar um papel importante no manejo de plantas daninhas na produção agrícola e depende do potencial do organismo vivo como bioagente de controle (ABDEL-KADER; EL-MOUGY, 2009). Segundo Harding; Raizada (2015) os fungos, predominantemente, são os agentes causais de uma série de doenças em plantas daninhas e, conseqüentemente, podem apresentar potencial para serem desenvolvidos como mico-herbicidas. No Brasil, os fungos fitopatogênicos são estudados desde 1980 como uma fonte potencial de controle de plantas daninhas (ROCHA; PEREIRA; BARRETO, 2007). Entretanto, em função dos grupos de pesquisa na área serem reduzidos, só recentemente, se iniciou estudo para o desenvolvimento de mico-herbicidas destinado ao controle biológico de plantas do “complexo cordas-de-viola”.

No estado de São Paulo, o fungo *Cercospora* foi identificado como agente causal da cercosporiose em várias espécies de *Ipomoea* e foi testado, em casa-de-vegetação, quanto à patogenicidade em *I. nil*, *I. grandifolia*, *I. hederifolia* e *I. quamoclit*. Nesse trabalho, os resultados obtidos permitiram selecionar alguns isolados como potenciais agentes de controle biológico por causarem desfolha em mais de uma espécie de *Ipomoea* (SANTOS et al., 2016). A capacidade de um isolado causar dano em mais de uma espécie de *Ipomoea* é uma característica importante e atrativa para o mercado de produtos biológicos, pois amplia a gama de plantas-alvo do agente de controle biológico.

Os prejuízos gerados pelas cordas-de-viola na produtividade e qualidade dos colmos na cultura da cana-de-açúcar, mostram que a eficiência dos herbicidas utilizados para o seu manejo é limitada e a introdução do controle biológico, com o uso de mico-herbicidas, pode ajudar a reduzir as perdas causadas à cultura e a dependência do controle químico. O uso de mico-herbicidas, como um componente do manejo integrado das cordas-de-viola, representa uma oportunidade para incorporar o controle biológico no setor produtivo brasileiro, principalmente em cultivos agrícolas orgânicos e, em áreas de recuperação florestal, onde o uso de agrotóxicos é proibido ou restrito.

Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi identificar, dentre quatro isolados de *Cercospora* patogênicos a *I. nil*, isolados capazes de infectar e causar desfolha nas espécies *I. grandifolia*, *I. hederifolia* e *I. quamoclit*.

7.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no período de setembro a dezembro de 2017, no Laboratório de Fitopatologia e em casa-de-vegetação na Embrapa Roraima, Boa Vista, RR, Brasil. Durante os ensaios, a temperatura ficou em torno de 31°C (uso de termômetro digital de máxima e mínima temperatura) e a umidade relativa do ar em 86% (uso de higrômetro de bulbo seco e úmido). A irrigação das plantas foi feita por aspersão com acionamento automático ajustado para quatro ciclos de rega por dia, com duração um minuto e vazão de 1,9 L.

7.4.1 Origem das sementes de *Ipomoea* spp.

As espécies de corda-de-viola utilizadas nos ensaios foram *I. grandifolia*, *I. hederifolia*, *I. nil* e *I. quamoclit*. As sementes destas espécies foram adquiridas comercialmente. Para obtenção de plantas no estágio fenológico estudado, 2 a 3 folhas definitivas, as sementes foram depositadas em vasos plásticos de 2,0 dm³ contendo substrato preparado com solo, areia e esterco bovino curtido, na proporção de 1:1:1 (v/v/v).

7.4.2 Origem dos isolados de *Cercospora*

Os isolados de *Cercospora* CMAA-1441, CMAA-1444, CMAA-1449 e CMAA-1710¹ foram selecionados dentre oito isolados, em função da intensidade da doença e desfolha causada em *I. nil*. Esses isolados encontram-se depositados na Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental (CMAA) da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, São Paulo. Os isolados foram repicados para placas de Petri contendo meio de cultura de Batata Dextrose Ágar (BDA) e mantidos em incubadora a 25°C com fotoperíodo de 12 h (luz do dia e luz negra) para uso na obtenção de inóculo.

7.4.3 Produção de inóculo

Para a obtenção de fragmentos de micélio, os isolados foram semeados em placas de Petri contendo meio BDA e mantidos por 15 dias em incubadora a 25°C e fotoperíodo de 12 h

¹ Isolados cedidos pela Dr.^a Kátia de Lima Nechet, em 07 de julho de 2015, e utilizados nos ensaios de seleção de isolados de *Cercospora* com potencial de controle de *Ipomoea* spp.

(luz do dia e luz negra) para obtenção da colônia. Após esse período, cinco discos de micélio, retirados da periferia das colônias, foram transferidos para Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL do meio líquido Batata Dextrose (BD). Os Erlenmeyers foram mantidos em incubadora com agitação orbital (Shaker) a 180 rpm, a 28°C por 7 dias. Posteriormente, a massa micelial obtida foi filtrada em gaze, suspensa em água destilada esterilizada e triturada por 1 minuto utilizando um triturador mecânico de laboratório. Uma alíquota de 1 mL da suspensão triturada foi retirada para quantificação de fragmentos de micélio, utilizando-se a câmara de Neubauer sob um microscópio de luz (adaptado de SANTOS et al., 2016).

7.4.4 Seleção de isolados de *Cercospora*

Plantas de *I. grandifolia*, *I. hederifolia*, *I. nil* e *I. quamoclit*, no estágio de 2 a 3 folhas definitivas (folhas sem ferimentos), foram inoculadas com suspensões de fragmentos de micélio dos isolados de *Cercospora* CMAA-1441, CMAA-1444, CMAA-1449 e CMAA-1710 na concentração de 10^7 fragmentos de micélio mL⁻¹ e acrescidas de Tween 20 a 0,05%. Plantas de cada espécie, no estágio de 2 a 3 folhas definitivas, pulverizadas com água acrescida de Tween 20 a 0,05% constaram como controle. As plantas inoculadas foram mantidas em câmara úmida, utilizando-se sacos plásticos transparentes umedecidos, por 6 h (isolados CMAA-1441, CMAA-1444 e CMAA-1449) e 12 h (isolado CMAA-1710). Para cada isolado, o molhamento foliar utilizado foi obtido com base em estudo anteriormente realizado. Posteriormente, as plantas foram mantidas em condições de casa-de-vegetação. As avaliações de número total de folhas e incidência de folhas com sintomas foram realizadas diariamente, durante 23 dias. A avaliação da severidade da doença foi feita a cada três dias, iniciando-se logo após o aparecimento dos primeiros sintomas, durante 23 dias.

Os ensaios foram conduzidos separadamente para cada espécie de *Ipomoea*, em delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (isolados) e seis repetições, sendo cada repetição um vaso com duas plantas. Para cada espécie foram conduzidos três ensaios em casa-de-vegetação.

7.4.4.1 Avaliações

A incidência da doença foi avaliada com base na porcentagem do número de folhas com sintomas, a partir do cálculo: Incidência (%) = Número de folhas com sintomas *100/ número total de folhas. A desfolha da planta foi baseada no número total de folhas da planta

do dia da inoculação até a finalização de cada ensaio. Os dados de incidência da doença foram transformados em área abaixo da curva de progresso da incidência da doença (AACPID). A partir dos dados de número total de folhas calculou-se a área abaixo da curva de progresso de emissão de folhas (AACPEF).

A severidade da doença foi avaliada com base na porcentagem de área foliar lesionada obtida com auxílio da escala de notas com seis graus, adaptada de Hasan et al. (1995), onde 0= 0% de superfície foliar; 1= 1-25% de superfície foliar; 2= 26-50% de superfície foliar; 3= 51-75% de superfície foliar; 4= 76-100% de superfície foliar; 5= 100% de superfície foliar e pecíolo. Os valores de severidade da doença, segundo a escala descritiva, foram transformados para valores quantitativos, utilizando-se o índice de McKinney (1923), pela fórmula: Índice de Infecção = S (grau da escala x frequência) x 100/ (número total de unidades x grau máximo da escala). Os dados de severidade da doença foram transformados em área abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPSD).

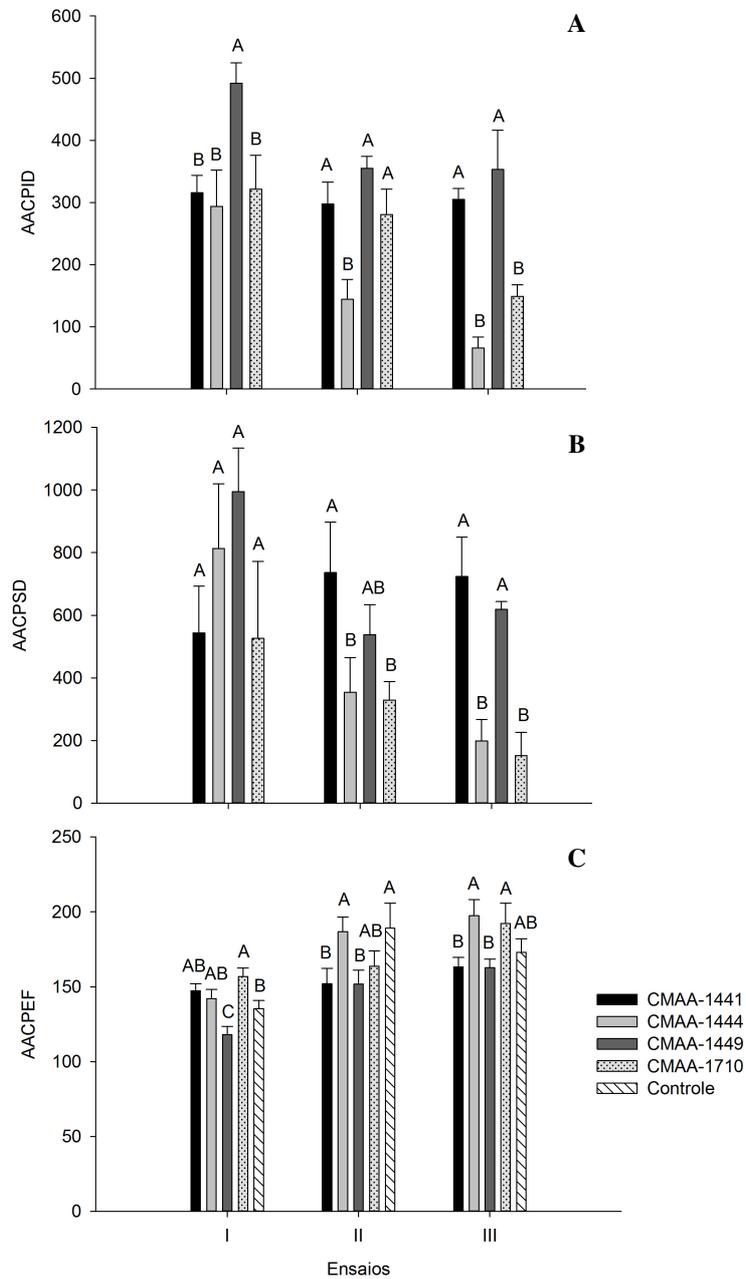
Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias, comparadas pelo teste de Fisher LSD a 5% de probabilidade, utilizando-se o software SAS versão 12 (SAS Institute Inc., Cary, USA).

7.5 RESULTADOS

Houve diferença da intensidade da doença em função do isolado de *Cercospora* e da espécie alvo de *Ipomoea*. Plantas de *I. nil* inoculadas com os isolados CMAA-1441, CMAA-1444, CMAA-1449 e CMAA-1710 apresentaram maior intensidade da cercosporiose quando comparadas às plantas das demais espécies. Além disso, somente os isolados CMAA-1449 e CMAA-1441 foram capazes de infectar e causar desfolha em *I. nil*. Já os isolados CMAA-1441 e CMAA-1710 causaram doença em *I. grandifolia*, *I. hederifolia* e *I. quamoclit*; e o isolado CMAA-1449 causou doença em *I. quamoclit*. Contudo, nessas espécies, os isolados não foram capazes de causar desfolha.

O isolado CMAA-1449 foi capaz de causar doença nas plantas de *I. nil* em todos os ensaios. Para essa espécie, o isolado incitou em 92 a 100% das plantas e, o período de incubação foi de oito dias para todos os ensaios. O isolado também causou desfolha em uma porcentagem de 67 a 92% das plantas inoculadas em dois ensaios. O isolado CMAA-1441 também causou doença em *I. nil*, mas somente em dois dos três ensaios. Nesses, 100% das plantas inoculadas ficaram doentes e o período de incubação da doença foi de oito dias, enquanto que no primeiro ensaio, o período de incubação foi de doze dias. Apenas no segundo ensaio, o isolado CMAA-1441 causou desfolha em 100% das plantas inoculadas. Para os isolados CMAA-1444 e CMAA-1710, observou-se que a intensidade da doença não foi capaz de causar desfolha em *I. nil*, independente dos ensaios, conseqüentemente a emissão de folhas foi igual ou maior que a do controle. Nesse caso, o maior período de tempo para iniciar o período de incubação afetou o progresso da doença (Figuras 11A, B e C).

Figura 11 - Área abaixo da curva do progresso da incidência da doença (AACPID) (A), área abaixo da curva do progresso da severidade da doença (AACPSD) (B) e área abaixo da curva do progresso de emissão de folhas (AACPEF) (C) em plantas de *Ipomoea nil* inoculadas com os isolados de *Cercospora* CMAA-1441, CMAA-1444, CMAA-1449 e CMAA-1710.

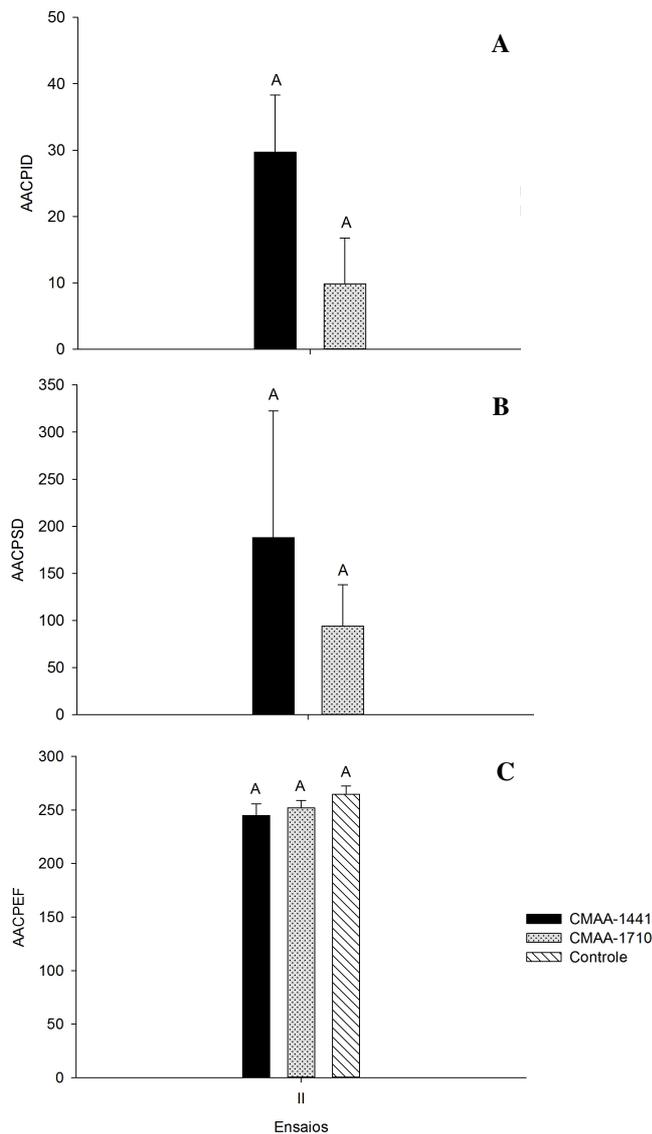


As barras verticais representam as médias dos tratamentos (isolados de *Cercospora*) e do controle em três ensaios conduzidos por 23 dias. Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre tratamentos não diferem estatisticamente pelo teste de Fisher LSD a 5% de probabilidade.

Os isolados CMAA-1441 e CMAA-1710 foram capazes de causar doença nas plantas de *I. grandifolia*. Contudo, não houve diferença estatística entre os isolados quanto à intensidade da doença. Para esta espécie, os isolados incidiram em 17% (CMAA-1710) e 67%

(CMAA-1441) das plantas inoculadas e, o período de incubação ficou entre nove e doze dias, respectivamente. Para esses isolados, observou-se que a intensidade da doença em *I. grandifolia* não foi capaz de causar desfolha nas plantas. Os isolados CMAA-1444 e CMAA-1449 não foram patogênicos a *I. grandifolia* (Figuras 12A, B e C).

Figura 12 - Área abaixo da curva do progresso da incidência da doença (AACPID) (A), área abaixo da curva do progresso da severidade da doença (AACPSD) (B) e área abaixo da curva do progresso de emissão de folhas (AACPEF) (C) em plantas de *Ipomoea grandifolia* inoculadas com os isolados de *Cercospora* CMAA-1441 e CMAA-1710.

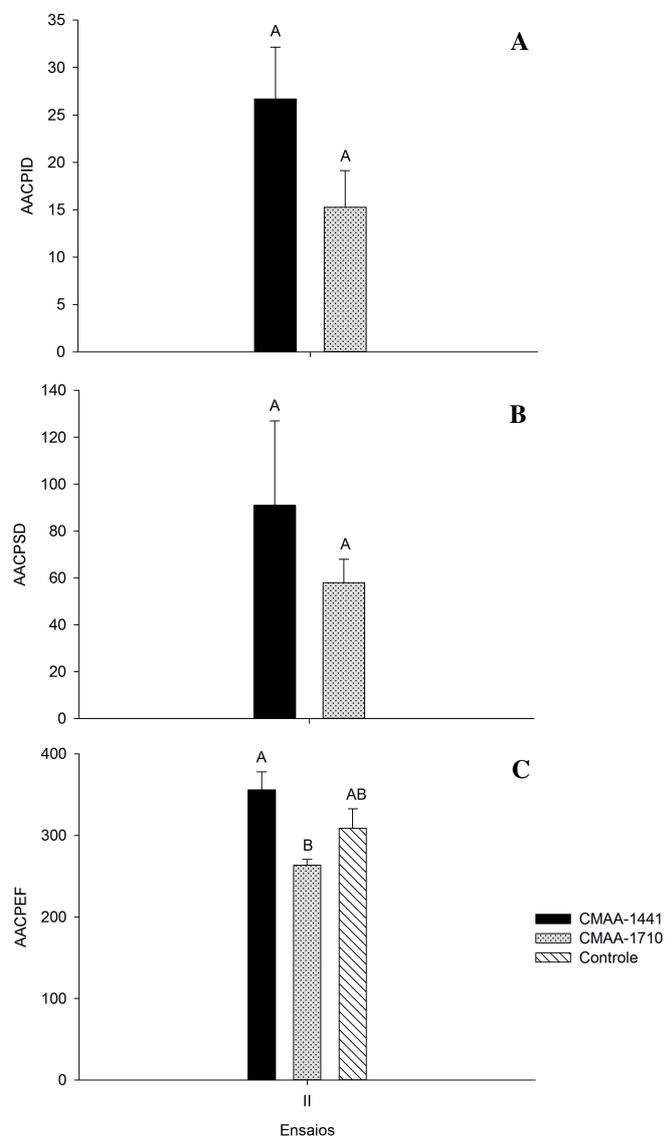


As barras verticais representam a média dos tratamentos (isolados de *Cercospora*) e do controle em ensaio conduzido por 23 dias. Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre tratamentos não diferem estatisticamente pelo teste de Fisher LSD a 5% de probabilidade.

Os isolados CMAA-1441 e CMAA-1710 foram patogênicos a *I. hederifolia*, e não

houve diferença estatística da intensidade da doença entre os isolados. Para esta espécie, os isolados incidiram em 58% (CMAA-1710) e 83% (CMAA-1441) das plantas inoculadas e, o período de incubação da doença ficou entre oito e dez dias, respectivamente. Observou-se que a intensidade da doença não foi capaz de causar desfolha nas plantas de *I. hederifolia*. Os isolados CMAA-1444 e CMAA-1449 não foram patogênicos a *I. hederifolia* (Figuras 13A, B e C).

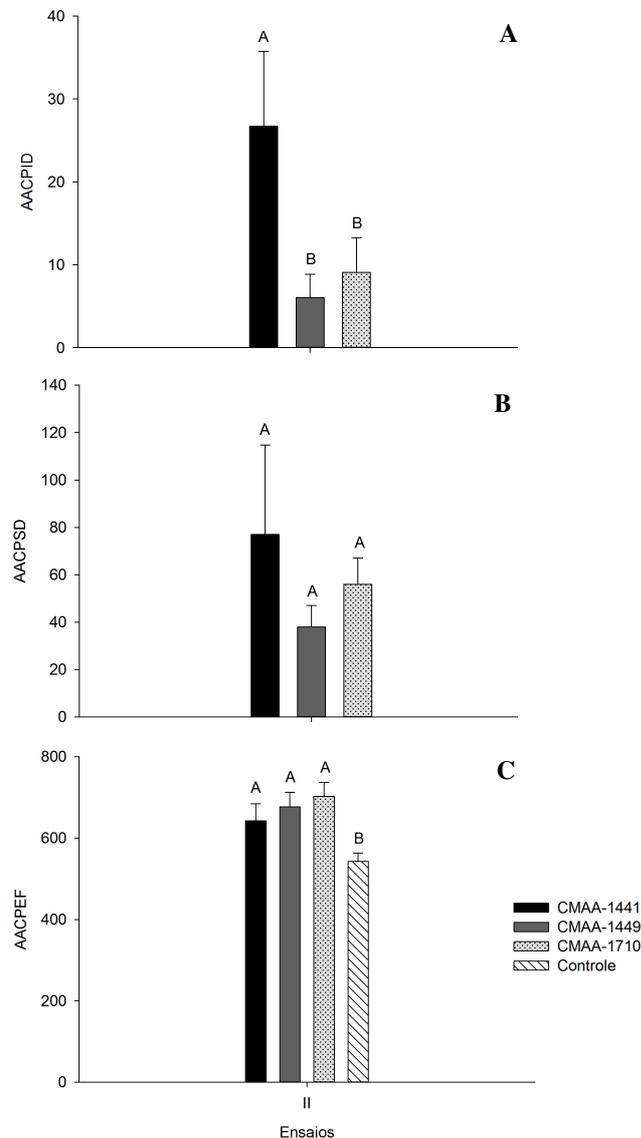
Figura 13 - Área abaixo da curva do progresso da incidência da doença (AACPID) (A), área abaixo da curva do progresso da severidade da doença (AACPSD) (B) e área abaixo da curva do progresso de emissão de folhas (AACPEF) (C) em plantas de *Ipomoea hederifolia* inoculadas com os isolados de *Cercospora* CMAA-1441 e CMAA-1710.



As barras verticais representam a média dos tratamentos (isolados de *Cercospora*) e do controle em ensaio conduzido por 23 dias. Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre tratamentos não diferem estatisticamente pelo teste de Fisher LSD a 5% de probabilidade.

Os isolados CMAA-1441, CMAA-1449 e CMAA-1710 foram capazes de causar doença em *I. quamoclit*. Nessa espécie, o isolado CMAA-1441 causou maior incidência da doença do que CMAA-1449 e CMAA-1710. Contudo, não houve diferença estatística entre os isolados quanto à severidade da doença. O isolado CMAA-1441 causou doença em 67% das plantas inoculadas e, o período de incubação foi de nove dias. Para o isolado CMAA-1449, observou-se que 42% das plantas apresentaram sintomas da doença e, que o período de incubação foi de quinze dias. Já o isolado CMAA-1710, incidiu em 58% das plantas, com período de incubação de nove dias. Apesar disso, a intensidade da doença observada em *I. quamoclit*, independente do isolado, não foi capaz de causar desfolha nas plantas. Além disso, as plantas inoculadas emitiram mais folhas que o controle (Figuras 14A, B e C). O isolado CMAA-1444 não foi patogênico a *I. quamoclit*.

Figura 14 - Área abaixo da curva do progresso da incidência da doença (AACPID) (A), área abaixo da curva do progresso da severidade da doença (AACPSD) (B) e área abaixo da curva do progresso de emissão de folhas (AACPEF) (C) em plantas de *Ipomoea quamoclit* inoculadas com os isolados de *Cercospora* CMAA-1441, CMAA-1449 e CMAA-1710.



As barras verticais representam a média dos tratamentos (isolados de *Cercospora*) e do controle em ensaio conduzido por 23 dias. Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre tratamentos não diferem estatisticamente pelo teste de Fisher LSD a 5% de probabilidade.

A partir dos resultados obtidos, observou-se que os maiores valores de incidência e severidade foram obtidos com a inoculação dos isolados de *Cercospora* na espécie *I. nil*. Os isolados selecionados como causadores de desfolha em *I. nil*, CMAA-1449 e CMAA-1441, não foram capazes de causar desfolha nas outras espécies de *Ipomoea* utilizadas nesse trabalho. Houve diferença de especificidade de isolados em relação ao hospedeiro. Dois isolados, CMAA-1441 e CMAA-1710, foram patogênicos a todas as espécies de *Ipomoea*

testadas, contudo só CMAA-1441 causou desfolha em *I. nil*. O isolado CMAA-1449 é específico a *I. nil* e *I. quamoclit*. Já o isolado CMAA-1444 é específico a *I. nil*.

7.6 DISCUSSÃO

O presente trabalho identificou diferença na intensidade da doença e na desfolha causada pelos isolados de *Cercospora* em função da espécie de *Ipomoea*. A maior intensidade da cercosporiose e desfolha foi observada em *I. nil*, quando se utilizou os fragmentos de micélio de *Cercospora* como inóculo.

Neste estudo, observou-se que as plantas de *I. nil* exibiram sintomas de coalescimento das lesões e amarelecimento das folhas. Nessa espécie, possivelmente, o inóculo utilizado foi capaz de induzir um novo ciclo da doença, promovendo um aumento no número e tamanho das lesões, o que ocasionou a necrose e o amarelecimento foliar.

Outro aspecto observado foi que em *I. nil* a ocorrência de desfolha foi dependente do progresso e severidade da cercosporiose. Nesse caso, apenas os isolados CMAA-1449 e CMAA-1441 foram capazes de causar desfolha em *I. nil*. A desfolha ocorreu após os isolados causarem necrose foliar que resultou em senescência das folhas. Pereira; Barreto (2005) também observaram que a desfolha em *Mitracarpus hirstus* (Linn.) DC. ocorreu após as lesões causadas por *Cercospora mitracarpi-hirti* Pereira & Barreto coalescerem e cobrirem todo o limbo foliar. Em outro patossistema, a morte de plântulas de *Amaranthus* spp. L. ocorreu após *Phomopsis amaranthicola* Roskopf, Charud., Shabana & Benny e *Microsphaeropsis amaranthi* (Ellis & Barthol.) Heiny & Mintz. causarem coalescimento das lesões e estrangulamento do caule (ORTIZ-RIBBING; WILLIAMS, 2006). Para os isolados CMAA-1444 e CMAA-1710, a diferença no tempo de início e progresso da doença em *I. nil* retardou a expansão das lesões e, conseqüentemente, afetou a ocorrência de desfolha. Os resultados obtidos por Souza; Maffia; Mizubuti (2012), relacionados à agressividade de isolados de *Cercospora coffeicola* em cultivares de *Coffea arabica* L., mostram que a menor severidade da doença, causada pelo isolado To02, retardou o início dos períodos de incubação e de latência e reduziu drasticamente a desfolha das plantas.

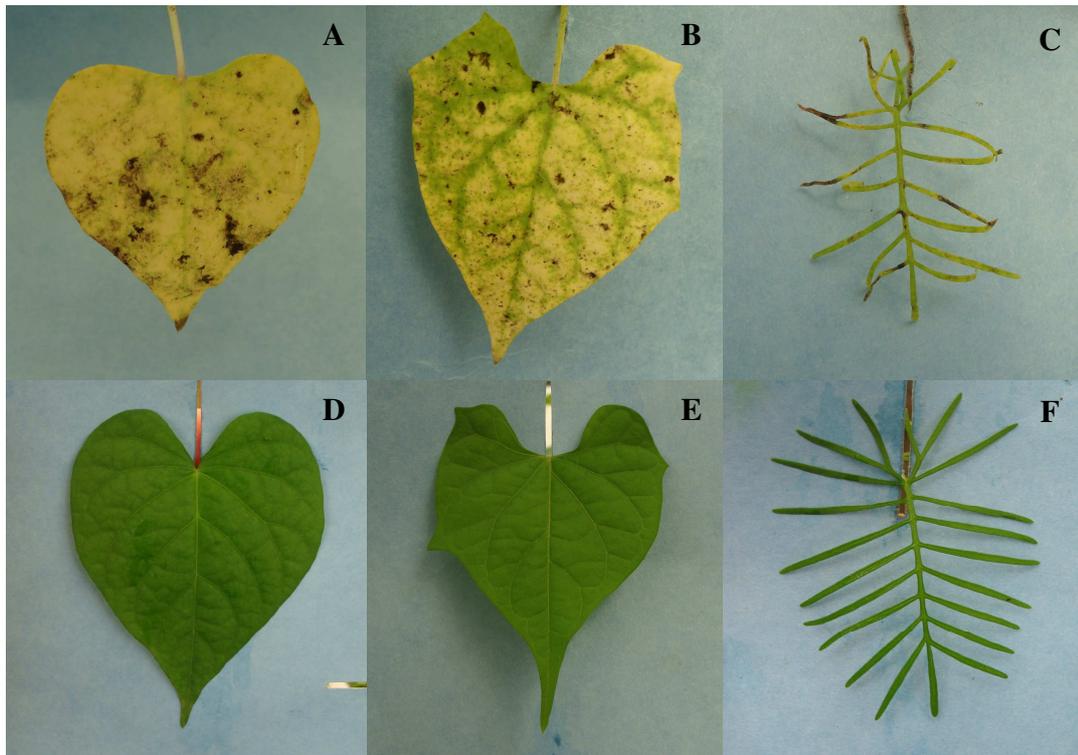
No patossistema *I. nil* x *Cercospora*, os isolados mais agressivos, CMAA-1441 e CMAA-1449, causaram severa necrose e, posteriormente, entre doze a quatorze dias após a inoculação, a desfolha das plantas. A maior agressividade dos isolados CMAA-1449 e CMAA-1441 em plantas de *I. nil* sugere possível envolvimento da alguma fitotoxina para bloquear os mecanismos físicos e químicos de defesa da planta e, causar a desfolha. Segundo Daub; Ehrenshaft (2000) a cercosporina, quando incitada pela luz, produz radicais hidroxilas e oxigênio singlete. O oxigênio singlete catalisa a peroxidação da membrana lipídica, obstrui a integridade celular e induz o extravasamento de conteúdo citoplasmático, o que ocasiona a

morte da célula. Trabalhos com outros patossistemas mostram que há uma correlação positiva entre a produção de fitotoxina e a agressividade dos isolados (AHONSI et al., 2005; TESSMANN; CHARUDATTAN; PRESTON, 2008). Uso de fitotoxinas pode ser uma alternativa na busca de metabólitos naturais de ação herbicida.

Mesmo com alta concentração de inóculo, os isolados de CMAA-1441, CMAA-1449 e CMAA-1710 não causaram desfolha em *I. grandifolia*, *I. hederifolia* e *I. quamoclit*. Nessas espécies, apenas as folhas inoculadas exibiram um amarelecimento e, posteriormente, senesceram. Observou-se que a inoculação não influenciou o crescimento de *I. grandifolia*, *I. hederifolia* e *I. quamoclit*, pois as plantas continuaram a emitir novas folhas. Nesse caso, há uma distinta reação de resistência entre as espécies de *Ipomoea* e, que possivelmente, *I. grandifolia*, *I. hederifolia* e *I. quamoclit* possuem mecanismos de defesa capazes de impedir o coalescimento de lesões.

Nas condições deste trabalho, pode-se considerar que a capacidade de causar desfolha em *I. nil* diferenciou o isolado CMAA-1449 dos demais isolados de *Cercospora* estudados. Porém, esse isolado não causou desfolha em *I. grandifolia*, *I. hederifolia* e *I. quamoclit*, o que restringiria seu possível uso como mico-herbicida à apenas *I. nil*. Os resultados obtidos sugerem que os isolados CMAA-1441 e CMAA-1710 são os mais indicados para o desenvolvimento de um mico-herbicida constituído por fragmentos de micélio, já que foram os únicos capazes de causar doença em todas as espécies de *Ipomoea* utilizadas neste trabalho. Contudo, ainda há necessidade de verificar se aumento da intensidade da doença estará associado à desfolha nessas espécies. O aumento da intensidade da doença poderia ser verificado com reaplicação de fragmentos de micélio, a mistura de isolados de *Cercospora* ou o uso da fitotoxina cercosporina, uma vez que a ação da fitotoxina não é específica. O uso da fitotoxina seria uma opção interessante para a indução de desfolha em *I. grandifolia*, *I. hederifolia* e *I. quamoclit*, uma vez que foi observado o amarelecimento das folhas inoculadas (Figura 15).

Figura 15 - Folhas de *Ipomoea grandifolia* (A), *Ipomoea hederifolia* (B) e *Ipomoea quamoclit* (C) com sintomas observados após inoculação do isolado de *Cercospora* CMAA-1441 e seus respectivos controles (D, E e F).



Fotos: Barbosa, R. N. T. (2017).

Os resultados alcançados permitem direcionar as próximas etapas de estudo visando o desenvolvimento de um mico-herbicida com isolados de *Cercospora* para o controle de plantas do “complexo corda-de-viola”.

7.7 CONCLUSÕES

O isolado CMAA-1444 foi patogênico apenas à *Ipomoea nil*.

O isolado CMAA-1449 foi patogênico a *I. nil* e *Ipomoea quamoclit*.

Os isolados CMAA-1441 e CMAA-1710 foram os únicos capazes de causar doença em todas as espécies de *Ipomoea* utilizadas e podem ser indicados para o desenvolvimento de um mico-herbicida constituído por fragmentos de micélio.

Apenas os isolados CMAA-1441 e CMAA-1449 foram capazes de causar desfolha em *I. nil*.

Nenhum dos isolados de *Cercospora* causou desfolha em *Ipomoea grandifolia*, *Ipomoea hederifolia* e *I. quamoclit* por inoculação com fragmentos de micélio.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-KADER, M. M.; EL-MOUGY, N. S. Prospects of mycoherbicides for control of broomrapes (*Orobancha* spp.) in Egypt. **Journal of Plant Protection Research**, v. 49, n. 1, p. 63-75, 2009.
- AHONSI, M. O.; MAURHOFER, M.; BOSS, D.; DÉFAGO, G. Relationship between aggressiveness of *Stagonospora* sp. isolates on field and hedge bindweeds, and *in vitro* production of fungal metabolites cercosporin, elsinochrome A and leptosphaerodione. **European Journal of Plant Pathology**, v. 111, n. 3, p. 203-215, 2005.
- AZANIA, C. A. M.; HIRATA, A. C. S.; AZANIA, A. A. P. M. **Biologia e manejo químico de corda-de-viola em cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2011. 12p. (Série Tecnologia APTA. Boletim Técnico IAC, 209).
- CAO, S.; GUZA, R. C.; WISSE, J. H.; MILLER, J. S.; EVANS, R.; KINGSTON, D. G. Ipomoeassins A-E, cytotoxic macrocyclic glycoresins from the leaves of *Ipomoea squamosa* from the Suriname rainforest. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 4, p. 487-492, 2005.
- CARVALHO, L. B.; BIANCO, S.; PITELLI, R. A. GROWTH AND MINERAL NUTRITION OF *Ipomoea quamoclit*. **Planta Daninha**, v. 27, n. 2, p. 283-288, 2009.
- CHRISTOFFOLETI, P. J.; CARVALHO, S. J. P. ; LÓPEZ-OVEJERO, R. F.; NICOLAI, M.; HIDALGO, E.; SILVA, J. E. Conservation of natural resources in Brazilian agriculture: implications on weed biology and management. **Crop Protection**, v. 26, n. 3, p. 383-389, 2007.
- CORREIA, N. M.; CAMILO, E. H.; SANTOS, E. A. Sulfentrazone efficiency on *Ipomoea hederifolia* and *Ipomoea quamoclit* as influenced by rain and sugarcane straw. **Planta Daninha**, v. 31, n. 1, p. 165-174, 2013.
- DAUB, M. E.; EHRENSHAFT, M. The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin: Contributions to plant disease and fundamental biology. **Annual Review Phytopathology**, v. 38, p. 461-490, 2000.
- HARDING D. P., RAIZADA M. N. Controlling weeds with fungi, bacteria and viruses: a review. **Frontiers in Plant Science**, v. 28, p. 6-659, 2015.
- HASAN, S.; JOURDAN, M.; BRUN, L.; SHEPPARD, A. W. Axenic culture and influence of wetness period and inoculum concentration on infection and development of cercospora blight of *Heliotropium europaeum*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 101, n. 5, p. 491-496, 1995.
- KISSMANN, K. G; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 2.ed. São Paulo: BASF, 1999. 978 p.
- KUVA, M. A.; PITELLI, R. A.; SALGADO, T. P.; ALVES, P. L. C. A. Fitossociologia de comunidades de plantas daninhas em agroecossistema cana-crua. **Planta Daninha**, v. 25, n. 3, p. 501-511, 2007.

KUVA, M. A.; PITELLI, R. A.; ALVES, P. L. C. A.; SALGADO, T. P.; PAVANI, M. C. M. D. Banco de sementes de plantas daninhas e sua correlação com a flora estabelecida no agroecossistema cana-crua. **Planta Daninha**, v. 26, p. 735-744, 2008.

LORENZI H., SOUZA V. C. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 3ª. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2001. 448p.

MERSIE, W.; SEYBOLD, C. A.; WU, J.; MCNAMEE, C. Atrazine and metolachlor sorption to switchgrass residues. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 37, n. 3-4, p. 465-472, 2006.

MONQUERO, P. A.; AMARAL, L. R.; SILVA, A. C.; BINHA, D. P.; SILVA, P. V. Eficácia de herbicidas em diferentes quantidades de palha de cana-de-açúcar no controle de *Ipomoea grandifolia*. **Bragantia**, v. 68, n. 2, p. 367-372, 2009.

MONQUERO, P. A.; SILVA, P. V.; HIRATA, A. C. S.; MARTINS, F. R. A. Monitoramento do banco de sementes de plantas daninhas em áreas com cana-de-açúcar colhida mecanicamente. **Planta Daninha**, v. 29, n. 1, p. 107-119, 2011.

MONQUERO, P. A.; ORZARI, I.; SILVA, P. V.; PENHA, A. S. Interference of weeds on seedlings of four neotropical tree species. **Acta Scientiarum**, v. 37, n. 2, p. 219-232, 2015.

NORSWORTHY J. K., OLIVER L. R. Effect of irrigation, soybean (*Glycine max*) density, and glyphosate on hemp sesbania (*Sesbania exaltata*) and pitted morningglory (*Ipomoea lacunosa*) interference in soybean. **Weed Technology**, v. 16, n. 1, p. 7-19, 2002.

ORTIZ-RIBBING, L.; WILLIAMS, M. M. Potential of *Phomopsis amaranthicola* and *Microsphaeropsis amaranthi*, as bioherbicides for several weedy *Amaranthus* species. **Crop Protection**, v. 25, p. 39-46, 2006.

PEREIRA, O. L.; BARRETO, R. W. The mycobiota of the weed *Mitracarpus hirtus* in Minas Gerais (Brazil), with particular reference to fungal pathogens for biological control. **Australasian Plant Pathology**, v. 34, p. 41-50, 2005.

PIZZO, I.V.; AZANIA, C.A.M.; AZANIA, A.A.P.M.; SCHIAVETTO, A.R. seletividade e eficácia de controle de plantas daninhas pela associação entre óleo fúsel e herbicidas em cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, v. 28, n. 2, p. 347-357, 2010.

ROCHA, F. B.; PEREIRA, O. L.; BARRETO, R. W. *Cercospora apii* causing leaf spots on two brazilian toxic weeds: *Solanum glaucophyllum* and *Xanthium strumarium*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 142-144, 2007.

SANTOS, T. H. F dos; HALFELD-VIEIRA, B. de A.; ASSIS, M. C. de; NECHET, K. de L. Patogenicidade da micobiota de *Ipomoea* spp. para prospecção de mico-herbicida. In: Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica, 10, 2016, Campinas. **Anais...** Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite, 2016. p. 1-9.

SILVA, A. F.; CONCENÇO, G.; ASPIAZÚ, I.; FERREIRA, E. A.; GALON, L.; FREITAS, M. A. M.; SILVA, A. A.; FERREIRA, F. A. Período anterior à interferência na cultura da

soja-RR em condições de baixa, média e alta infestação. **Planta Daninha**, v. 27, n. 1, p. 57-66, 2009.

SILVA, I. A. B.; KUVA, M. A.; ALVES, P. L. C. A.; SALGADO, T. P. Interferência de uma comunidade de plantas daninhas com predominância de *Ipomoea hederifolia* na cana-soca. **Planta Daninha**, v. 27, n. 2, p. 265-272, 2009.

SILVA, P. V.; MONQUERO, P. A.; MUNHOZ, W. S. Controle em pós-emergência de plantas daninhas por herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar. **Revista Caatinga**, v. 28, n. 4, p. 21-32, 2015.

SIMONI, F.; VICTORIA FILHO, R.; SAN MARTIN, H. A. M.; SALVADOR, F. L.; AALVES, A. S. R.; BREMER NETO, H. Eficácia de imazapic e sulfentrazone sobre *Cyperus rotundus* em diferentes condições de chuva e palha de cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, v. 24, n. 4, p. 769-778, 2006.

SOUZA, A. G. C.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Cultural and Aggressiveness Variability of *Cercospora coffeicola*. **Journal of Phytopathology**, v. 160, n. 10, p. 540-546, 2012.

TESSMANN, D. J.; CHARUDATTAN, R.; PRESTON, J. F. Variability in aggressiveness, cultural characteristics, cercosporin production and fatty acid profile of *Cercospora piaropi*, a biocontrol agent of water hyacinth. **Plant Pathology**, v. 57, n. 5, p. 957-966, 2008.

8 CONCLUSÕES GERAIS

O uso de fragmentos de micélio como inóculo pode ser utilizado para causar desfolha em plantas de *Ipomoea nil*.

A inoculação de *I. nil*, no estágio de 2 a 3 folhas definitivas, com 10^7 fragmentos de micélio de *Cercospora*, e a submissão das plantas a 6 h (CMAA-1441, CMAA-1444 e CMAA-1449) e 12 h (CMAA-1710) de molhamento foliar, constitui uma metodologia de inoculação para o desenvolvimento da cercosporiose em condições controladas.

A capacidade dos isolados CMAA-1441, CMAA-1444, CMAA-1449 e CMAA-1710 de causarem desfolha em plantas de *I. nil* depende da combinação entre os fatores epidemiológicos estudados.

O isolado CMAA-1444 só foi capaz de causar doença em *I. nil*.

O isolado CMAA-1449 foi capaz de causar doença em *I. nil* e *Ipomoea quamoclit*.

Os isolados CMAA-1441 e CMAA-1710 foram patogênicos a todas as espécies de *Ipomoea* e são os mais indicados para o desenvolvimento de um mico-herbicida constituído por fragmentos de micélio.

Os isolados CMAA-1449 e CMAA-1441 foram os únicos capazes de causar desfolha em *I. nil*.

Nenhum dos isolados de *Cercospora* foi capaz de causar desfolha em *Ipomoea grandifolia*, *Ipomoea hederifolia* e *I. quamoclit* por inoculação com fragmentos de micélio.