

ADRIANY PENA DE SOUZA

**FUNGOS FITOPATOGÊNICOS ASSOCIADOS A CAPIM-AMARGOSO
(*Digitaria insularis*) EM LOCALIDADES DA ZONA DA MATA E TRIÂNGULO
MINEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Informações Geoespaciais da Universidade Federal de Uberlândia, *Campus* Monte Carmelo, como parte das exigências para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador:

Prof. Dr. Bruno Sérgio Vieira

Coorientador:

Dr. Bruno Wesley Ferreira

**MONTE CARMELO
MINAS GERAIS – BRASIL
2022**

ADRIANY PENA DE SOUZA

**FUNGOS FITOPATOGÊNICOS ASSOCIADOS A CAPIM-AMARGOSO
(*Digitaria insularis*) EM LOCALIDADES DA ZONA DA MATA E TRIÂNGULO
MINEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Informações Geoespaciais da Universidade Federal de Uberlândia, *Campus* Monte Carmelo, como parte das exigências para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 22 de fevereiro de 2022

Banca examinadora

Prof. Dr. Bruno Sérgio Vieira – Instituto de Ciências Agrárias (UFU)

Prof. Edson Aparecido dos Santos - Instituto de Ciências Agrárias (UFU)

Dra. Thaisa Ferreira da Nóbrega – Departamento de Fitopatologia (UFV)

Prof. Dr. Bruno Sérgio Vieira
Instituto de Ciências Agrárias (UFU)
(Orientador)

**MONTE CARMELO
MINAS GERAIS – BRASIL
2022**

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S729	Souza, Adriany Pena de, 1996-
2022	FUNGOS FITOPATOGÊNICOS ASSOCIADOS A CAPIM AMARGOSO (Digitaria insularis) EM LOCALIDADES DA ZONA DA MATA E TRIÂNGULO MINEIRO [recurso eletrônico] / Adriany Pena de Souza. - 2022. Orientador: Bruno Sérgio Vieira. Coorientador: Bruno Wesley Ferreira. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Agricultura e Informações Geoespaciais. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.135 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Informações Geoespaciais

Rodovia LMG 746, Km 01, s/nº, Bloco 1AMC, Sala 1A202, Monte Carmelo-MG, CEP 38.500-000
Telefone: (34) 3810-1033 - ppgaig@iciag.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Agricultura e Informações Geoespaciais				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico				
Data:	22/02/2022	Hora de início:	14:00 h	Hora de encerramento:	17:30 h
Matrícula do Discente:	32012AIG001				
Nome do Discente:	Adriany Pena de Souza				
Título do Trabalho:	FUNGOS FITOPATOGÊNICOS ASSOCIADOS A CAPIM AMARGOSO (<i>Digitaria insularis</i>) EM LOCALIDADES DA ZONA DA MATA E TRIÂNGULO MINEIRO				
Área de concentração:	Informações geoespaciais e tecnologias aplicadas à produção agrícola				
Linha de pesquisa:	Sistemas integrados de produção vegetal				

Reuniu-se na sala 104, Bloco 1 A MC a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Agricultura e Informações Geoespaciais, assim composta: Dr. Edson Aparecido dos Santos, Dra. Thaísa Ferreira de Nóbrega (Universidade Federal de Viçosa), Dr. Bruno Sérgio Vieira(UFU) – orientador da candidata.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Bruno Sérgio Vieira, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Sergio Vieira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 23/02/2022, às 12:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#)



Documento assinado eletronicamente por **Thaís Ferreira da Nóbrega, Usuário Externo**, em 24/02/2022, às 18:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Edson Aparecido dos Santos, Professor(a) do Magistério Superior**, em 03/03/2022, às 13:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3391047** e o código CRC **E155DE13**.

*Dedico
Aos meus pais, a minha irmã e a todos
que colaboraram com este trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sua infinita bondade, misericórdia e graça, que me alcançam todos os dias.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Bruno Sérgio Vieira, pela orientação, dedicação, ensinamentos, paciência e amizade.

Agradeço aos meus pais, Eunice e Amarildo e à minha irmã, Ariany, que me apoiaram e incentivaram em todos os momentos.

Ao grupo de pesquisa do LAMIF, em especial, à Claudia e ao Thúlio por todas as contribuições e amizade.

Ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, principalmente ao Dr. Bruno W. Ferreira e Dr. Robert W. Barreto, que foram fundamentais na conclusão e relevância deste trabalho.

Meus agradecimentos aos amigos e familiares que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes na minha vida. À Isadora, ao Wanderson e ao João Marcos que contribuíram na montagem do experimento.

Ao meu namorado pelo carinho, apoio e compreensão nos momentos difíceis.

À Universidade Federal de Uberlândia, ao Programa de Pós-graduação em Agricultura e Informações Geoespaciais, seu corpo docente, direção e administração que realizam seu trabalho com dedicação.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação. Muito obrigada!

BIOGRAFIA

Adriany Pena de Souza - nascida em 12 de fevereiro de 1996 na cidade de Monte Carmelo - MG, filha de Eunice Gomes Pena de Souza e Amarildo Mendes de Souza. Foi diplomada em Engenharia Agrônoma em 07 de fevereiro de 2018, pela Universidade Federal de Uberlândia – Campus Monte Carmelo. Durante a graduação foi bolsista na área de Fitopatologia do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica PIBIC/FAPEMIG/UFU. Em março de 2020, na mesma Universidade, ingressou no curso de mestrado em Agricultura e Informações Geoespaciais, linha de pesquisa Sistemas Integrados de Produção Vegetal, submetendo-se à defesa de dissertação em fevereiro de 2022.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS	4
CAPÍTULO I	6
1. INTRODUÇÃO	7
2. MATERIAL E MÉTODOS	9
2.1 Amostras coletadas	9
2.2 Obtenção de cultura pura	9
2.3 Taxonomia	9
2.3.1 Estudos Morfológicos.....	9
2.3.2 Extração de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento do isolado	10
2.4 Potencial de <i>A. panici-leucophaei</i> para o manejo de <i>D. insularis</i>	11
2.4.1 Obtenção de teliósporos	11
2.4.2 Obtenção de esporídios	11
2.4.3 Efeitos da inoculação de teliósporos e esporídios de <i>A. panici-leucophaei</i> em diferentes estádios fenológicos de <i>D. insularis</i>	12
2.4.4 Potencial de esporídios e teliósporos de <i>A. panici-leucophaei</i> no manejo de <i>D. insularis</i> em pós-emergência	13
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
3.1 Taxonomia	15
3.1.1 Identificação morfológica de <i>A. panici-leucophaei</i>	15
3.1.2 Análise filogenética	16
3.2 Avaliação preliminar do potencial de <i>A. panici-leucophaei</i> para o controle biológico de <i>D. insularis</i>	19
3.2.1 Efeito da inoculação de teliósporos e esporídios de <i>A. panici-leucophaei</i> em diferentes estádios fenológicos de <i>D. insularis</i>	19
3.2.2 Efeito de esporídios e teliósporos de <i>A. panici-leucophaei</i> no manejo de <i>D. insularis</i> em pós-emergência	23
4. CONCLUSÕES	28
5. REFERÊNCIAS	29
CAPÍTULO II	33

RESUMO

Digitaria insularis, conhecida popularmente como capim-amargoso, é uma planta daninha perene, considerada de difícil manejo e que desafia as medidas de controle em razão de seu elevado potencial de competição e infestação. A planta apresenta alta taxa de dispersão, prolificidade, alto percentual de germinação e biótipos resistentes a herbicidas. Um levantamento preliminar da micobiota associada a *D. insularis* nas regiões do Triângulo Mineiro e Zona da Mata de Minas Gerais, com ênfase nos municípios de Monte Carmelo e Viçosa, resultou em três isolados de fungos fitopatogênicos associados a tal hospedeiro. O presente trabalho teve por objetivo esclarecer a identidade de dois destes isolados, por métodos moleculares e morfológicos. A análise filogenética com base em ITS revelou que um dos isolados, causador de carvão nas panículas de *D. insularis*, pertence à espécie *Anthracoystis panici-leucophaei* e observações morfológicas contribuíram com essa identificação. O outro isolado causador de lesões foliares, pertence ao gênero *Microdochium* e através de inferências filogenéticas a partir de ITS, LSU e RPB2 e observações morfológicas, foi reconhecido como representante de uma espécie não relatada anteriormente, nomeada como *Microdochium maculosum*.

Palavras-chave: Capim-amargoso. Análise filogenética. Taxonomia. Fungos fitopatogênicos. *Anthracoystis panici-leucophaei*. *Microdochium maculosum*.

ABSTRACT

Digitaria insularis, popularly known as sourgrass, is a perennial weed, considered difficult to manage and that defies control measures due to its high potential for competition and infestation. The plant has a high rate of dispersal, prolificacy, high percentage of germination and herbicide-resistant biotypes. A preliminary survey of the mycobiota associated with *D. insularis* in the Triângulo Mineiro and Zona da Mata regions of Minas Gerais, with emphasis on the municipalities of Monte Carmelo and Viçosa, resulted in three isolates of phytopathogenic fungi associated with this host. The present study aimed to clarify the identity of two these isolates, through molecular and morphological methods. Phylogenetic analysis based on ITS, revealed that one of the isolates, causing smut in panicles of *D. insularis*, belongs to the species *Anthracoystis panici-leucophaei* and morphological observations contributed to this identification. The other isolate which causes leaf lesions, belongs to the genus *Microdochium*, and through phylogenetic inferences from ITS, LSU and RPB2 and morphological observations, it was recognized as a representative of a previously unreported species named *Microdochium maculosum*.

Key words: Sourgrass. Phylogenetic analysis. Taxonomy. Phytopathogenic fungi. *Anthracoystis panici-leucophaei*. *Microdochium maculosum*.

INTRODUÇÃO GERAL

As plantas daninhas estão entre os principais fatores biológicos limitantes à produção agrícola em todo o mundo. Competem diretamente com as culturas por nutrientes, água, luz e espaço. As plantas daninhas podem ser hospedeiras alternativas de pragas e doenças, além de afetar a qualidade do produto colhido devido a efeitos alelopáticos sobre as plantas cultivadas (BARRETO, 2009; DIAS et al., 2010). Dentre as espécies de plantas daninhas de grande importância econômica para a agricultura brasileira destaca-se o capim-amargoso (*Digitaria insularis*) (ZOBIOLE et al., 2016). Considerada de difícil manejo, notoriamente desafia o controle químico em razão de sua prolificidade, facilidade de dispersão, alto percentual de germinação de sementes e elevado potencial de infestação (DE CARVALHO et al., 2011); além de apresentar populações resistentes a herbicidas comercializados (TAKANO et al., 2020). A maioria das populações de *D. insularis* que infestam as culturas anuais na América do Sul são resistentes ao glyphosate (GR) (OVEJERO et al., 2017), e recentemente, confirmaram a resistência aos herbicidas ACCase em uma população de *D. insularis* no Brasil (TAKANO et al., 2020). Os danos causados em culturas economicamente importantes, como a soja, são significativos. Grazziero et al. (2012) mostraram que o capim-amargoso em competição reduziu em até 44% a produtividade da soja.

Diferentes métodos de manejo de plantas daninhas têm sido utilizados, como o mecânico, cultural, químico e mais recentemente o biológico. Dentre as medidas de controle, a utilização de herbicidas químicos ainda é predominante nas grandes culturas (CIMMINO et al., 2015). Contudo, tendo em vista o grande desafio do limitado número de herbicidas alternativos disponíveis para o controle de biótipos de plantas daninhas resistentes, concomitantemente ao oneroso e difícil processo de desenvolvimento de novas moléculas (RIAR et al., 2013; MATZRAFI et al., 2015), a necessidade da utilização de um manejo integrado com diferentes práticas de controle, como a seleção de novos agentes de controle, mais seletivos e menos agressivos ao meio ambiente e ao homem (RASSAEIFAR et al., 2013) fica cada vez mais evidente e necessária.

O uso de herbicidas a base de óleo de plantas e de fungos fitopatogênicos tem sido objeto de estudos visando o manejo de espécies de plantas daninhas (JAMES et al., 2002, JAVAID et al., 2017; DE OLIVEIRA E BRIGHENTI, 2018). Há duas abordagens principais para o uso de fitopatógenos como agentes de controle biológico de plantas daninhas: o método clássico ou inoculativo, que envolve a introdução de um patógeno ou mais, da planta-

alvo, do seu centro de origem até a nova área de distribuição da planta, onde esta se tornou uma invasora agressiva; e o método de micoherbicida ou inundativo, que envolve o uso de fungos fitopatogênicos endêmicos, associados à planta que está causando prejuízos. Uma gama de fungos causadores de doenças em plantas daninhas possui potencial para serem usados como bioherbicidas ou micoherbicidas (CHARUDATTAN, 1991; CARTWRIGHT & TEMPLETON, 1992; BABU et al., 2003 *apud* SAXENA & KUMAR, 2010). Os agentes de controle biológico, em condições normais de campo, não produzem impacto suficiente para suprimir a população do hospedeiro, então, um inóculo produzido em massa e formulado (bioherbicida) é fabricado e aplicado sobre a população da planta daninha (DE OLIVEIRA E BRIGHENTI, 2018).

Alguns micobioherbicidas foram desenvolvidos com o objetivo de controlar determinadas espécies de plantas daninhas, como por exemplo, o produto Di-Bak® Parkinsonia, para controle de *Parkinsonia aculeata*, à base dos fungos *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Neoscytalidium novaehollandiae* e *Macrophomina phaseolina*, registrado em 2018 e comercialmente disponível na Austrália (GALEA & GOULTER, 2013; MORIN, 2020). De forma similar, vários outros potenciais micoherbicidas, produtos biotecnológicos especializados que empregam o uso de propágulos de fungos ou metabólitos fúngicos como alternativas não químicas, estão sendo investigados, visando o manejo de grande variedade de espécies de plantas daninhas (SAXENA & KUMAR, 2010; GALON et al., 2016; MORIN, 2020).

Um levantamento preliminar da micobiota associada a *D. insularis* nas regiões do Triângulo Mineiro e Zona da Mata de Minas Gerais, com ênfase nos municípios de Monte Carmelo e Viçosa, revelou três fungos fitopatogênicos associados a este hospedeiro. Foram observadas plantas doentes apresentando lesões foliares no município de Viçosa e outras plantas, com uma seca acentuada de folhas e hastes, diminuição drástica no porte das plantas e, em muitas vezes, ausência de formação de panículas e sementes nas plantas infectadas, apresentando a formação típica de “chicote” coberta por uma massa de esporos escuros, típica de carvão no município de Monte Carmelo. Procedeu-se então com a coleta destas plantas, as quais foram encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia (LAMIF) da Universidade Federal de Uberlândia – (Campus Monte Carmelo) e para a Clínica de Doenças de Plantas do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, para preparo de lâminas e isolamento dos fungos em culturas puras. Os fungos foram identificados preliminarmente através de comparações morfológicas, dois deles sendo pertencentes ao

gênero *Microdochium* e o outro como *Anthracocystis*. Assim, o presente trabalho teve como objetivo descrever morfológicamente e através de estudos filogenéticos dois dos fungos encontrados que se destacaram como mais promissores e avaliar o potencial como agentes de controle biológico para o capim-amargoso.

REFERÊNCIAS

- BARRETO, R. W. Controle Biológico de Plantas Daninhas com Fitopatógenos. In: Wagner Bettioli; Marcelo Augusto Boechat Morandi. (Org.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**, 2009, p. 101-128.
- CARTWRIGHT, D. K.; TEMPLETON, G. E. Preliminary assessment of *Colletotrichum capsici* as a potential mycoherbicide for control of pitted morningglory. **Plant disease**, 1992. <https://doi.org/10.1094/PD-76-0995>
- CHARUDATTAN, R. The mycoherbicide approach with plant pathogens. In: **Microbial control of weeds**. Springer, Boston, MA, 1991. p. 24-57. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-9680-6_2
- CIMMINO, A. et al. Fungal phytotoxins with potential herbicidal activity: chemical and biological characterization. **Natural product reports**, v. 32, n. 12, p. 1629-1653, 2015. <https://doi.org/10.1039/C5NP00081E>
- DE CARVALHO, L. B. et al. Detection of sourgrass (*Digitaria insularis*) biotypes resistant to glyphosate in Brazil. **Weed Science**, v. 59, n. 2, p. 171-176, 2011. <https://doi.org/10.1614/WS-D-10-00113.1>
- DE OLIVEIRA, M. F.; BRIGHENTI, A. M. Controle de plantas daninhas: métodos físico, mecânico, cultural, biológico e alelopatia. **Embrapa Milho e Sorgo-Livro técnico (INFOTECA-E)**, 2018.
- DIAS, A. C. R. et al. Competitiveness of alexandergrass or Bengal dayflower with soybean. **Planta Daninha**, v. 28, p. 515-522, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582010000300008>
- GALEA, V.; GOULTER, K.. Field evaluation of a bioherbicide for control of parkinsonia (*Parkinsonia aculeata*) in Australia. 2013. In Proceedings of the 19th Australasian Plant Pathology Conference. Auckland, New Zealand: Australasian Plant Pathology Society (APPS).
- GALON, L. et al. Biological weed management-a short review. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 15, n. 1, p. 116-125, 2016. <https://doi.org/10.7824/rbh.v15i1.452>
- GAZZIERO, D. L. P. et al. Efeitos da convivência do capim-amargoso na produtividade da soja. In: **Embrapa Soja-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 28., 2012, Campo Grande. A ciência das plantas daninhas na era da biotecnologia: anais. Campo Grande: SBCPD, 2012. 6 p. Trab. 733., 2012.

JAMES, T. K. et al. Efficacy of a certified organic herbicide based on pine essence. **New Zealand Plant Protection**, v. 55, p. 207-212, 2002. <https://doi.org/10.30843/nzpp.2002.55.3891>

JAVAID, A. et al. Management of parthenium weed using metabolites of *Alternaria japonica*. **Planta Daninha**, v. 35, 2017. <https://doi.org/10.1590/s0100-83582017350100016>

MATZRAFI, M. et al. *Conyza* species: distribution and evolution of multiple target-site herbicide resistances. **Planta**, v. 242, n. 1, p. 259-267, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2306-4>

MORIN, L. Progress in biological control of weeds with plant pathogens. **Annual review of phytopathology**, v. 58, p. 201-223, 2020. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-010820-012823>

OVEJERO, R. F. L. et al. Frequency and dispersal of glyphosate-resistant sourgrass (*Digitaria insularis*) populations across Brazilian agricultural production areas. **Weed Science**, v. 65, n. 2, p. 285-294, 2017. <https://doi.org/10.1017/wsc.2016.31>

RASSAEIFAR, M. et al. Allelopathic effect of *Eucalyptus globulus*' essential oil on seed germination and seedling establishment of *Amaranthus blitoides* and *Cynodon dactylon*. **Trakia Journal of Sciences**, v. 11, n. 1, p. 73-81, 2013.

RIAR, D. S. et al. Physiological and molecular basis of acetolactate synthase-inhibiting herbicide resistance in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 2, p. 278-289, 2013. <https://doi.org/10.1021/jf304675j>

SAXENA, S.; KUMAR, M.. Evaluation of *Alternaria alternata* ITCC4896 for use as mycoherbicide to control *Parthenium hysterophorus*. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 43, n. 12, p. 1160-1164, 2010. <https://doi.org/10.1080/03235400802343825>

TAKANO, H. K. et al. Trp2027Cys mutation evolves in *Digitaria insularis* with cross-resistance to ACCase inhibitors. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 164, p. 1-6, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.12.011>

ZOBIOLE, L. H. S. et al. Controle de capim-amargoso perenizado em pleno florescimento. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 15, n. 2, p. 157-164, 2016. <https://doi.org/10.7824/rbh.v15i2.474>

CAPÍTULO I

AValiação DO POTENCIAL DE Anthracocystis panici-leucophaei PARA O MANEJO DE Digitaria insularis

1. INTRODUÇÃO

Um dos mais graves problemas agrícolas é a infestação de espécies de plantas daninhas em lavouras economicamente importantes, sendo um dos principais fatores limitadores para o desenvolvimento das culturas e responsáveis por perdas significativas na produção (CIMMINO et al., 2015). O Brasil possui grande diversidade de espécies do gênero *Digitaria*, presentes na maioria dos ambientes favoráveis à agricultura (MONDO et al., 2010). O capim-amargoso (*Digitaria insularis*) é uma das principais plantas daninhas de culturas anuais e perenes na América do Sul. Uma espécie de gramínea de ciclo perene com metabolismo fotossintético do tipo C4 (KISSMANN & GROTH, 1997) e que tem um potencial de infestação muito alto por ser capaz de se reproduzir por sementes e por rizomas, produzindo cerca de 40.000 sementes/planta/ano (GEMELLI et al., 2012; OVEJERO et al., 2017; TAKANO et al., 2020).

Um problema adicional se refere à resistência da maioria das populações de *D. insularis* que infestam as culturas anuais na América do Sul, ao herbicida glyphosate (OVEREJO et al., 2017). Fato que se deve a vasta área cultivada com variedades transgênicas tolerantes ao herbicida e às aplicações frequentes em uma mesma área durante anos consecutivos (TIMOSSO, 2009). Cerca de 90% da área total de soja na América do Sul é plantada com variedades transgênicas de soja (GR) e o glyphosate é aplicado pelo menos três vezes por ano (PETERSON et al., 2018). Diante disto, como alternativa de manejo de biótipos resistentes ao glyphosate, os herbicidas inibidores da acetil coenzima A carboxilase (ACCase) se tornaram amplamente usados, resultando, recentemente na confirmação da resistência aos herbicidas ACCase em uma população de *D. insularis* no Brasil (GEMELLI et al., 2012; TAKANO et al., 2020).

Várias estratégias de manejo de plantas daninhas têm sido utilizadas na agricultura. Além dos herbicidas, utilizam-se técnicas de controle mecânico, cultural, preventivo e biológico. Por décadas o controle químico tem sido a estratégia predominante na maioria das grandes culturas (CIMMINO et al., 2015), no entanto, com o crescente estabelecimento de populações resistentes se faz necessário a adoção de medidas alternativas pouco exploradas, destacando-se, o controle biológico. Diversos estudos evidenciam o potencial de fitopatógenos como agentes de biocontrole de plantas daninhas (CHARUDATTAN, 2001), principalmente o de fungos fitopatogênicos (KLAIC et al., 2015). Os micoherbicidas empregam o uso de fungos ou metabólitos fúngicos como alternativas não químicas,

reduzindo o uso de substâncias químicas no controle de plantas daninhas (SAXENA e KUMAR, 2010). Fungos causadores de carvões têm sido estudados como potenciais agentes de controle biológico para diversas espécies de plantas daninhas. Alguns têm apresentados resultados promissores, dentre eles: *Sporisorium ophiuri* para controle de *Rottboellia cochinchinensis* (SMITH et al., 1997) e *Sporisorium cruentum* para controle de *Sorghum halepense* (MILLHOLLON, 2000).

Durante um levantamento de fungos fitopagênicos associados a *Digitaria insularis* na região do Alto Paranaíba (Minas Gerais) foram observadas plantas doentes no município de Monte Carmelo, apresentando seca acentuada de folhas e hastes, diminuição drástica no porte das plantas e, em muitas vezes, ausência de formação de panículas e sementes nas plantas infectadas. Destaca-se a formação típica de “chicote” no meristema apical das plantas, com panículas cobertas por massa de esporos escuros, sintomas similares aos causados por *Sporisorium scitamineum* em cana-de-açúcar e por outros membros da família Ustilaginaceae – os principais causadores de carvões em plantas da família Poaceae (**Figura 1**).



Figura 1. Capim-amargoso (*Digitaria insularis*) infectado por *A. panici-leucophaei*.

O isolado apresentava similaridade morfológica com *Sporisorium panici-leucophaei*, já relatado anteriormente em *D. insularis* (VANKY, 2004), posteriormente renomeado para *Anthracocystis panici-leucophaei* (MCTAGGART, 2012). Com os relatos da literatura demonstrando o potencial de espécies desse gênero como agentes de controle biológico para outras espécies de plantas daninhas, se faz necessário o aprofundamento dos estudos do potencial desta espécie como possível agente de biocontrole do capim-amargoso.

Diante disto, o presente trabalho teve como objetivos descrever morfológicamente e através de estudos filogenéticos a espécie do fungo encontrado e avaliar o potencial como agente de biocontrole para o capim-amargoso.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras coletadas:

As amostras de plantas de *Digitaria insularis*, com sintoma típico de carvão, foram coletadas em áreas ruderais, no município de Monte Carmelo, em maio de 2021. As panículas contendo soros de teliósporos foram encaminhadas para análise, no Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da UFU (LAMIF) – Campus Monte Carmelo.

2.2. Obtenção de cultura pura:

Culturas puras de *Anthracoystis pacini-leucophaei* foram obtidas a partir de uma suspensão de teliósporos coletados de panículas de *D. insularis* infectadas, apresentando sintomas de carvão. Foram transferidos 100 µL da suspensão para placas de Petri contendo o meio de cultura YM sólido (3 g/L de extrato de levedura; 3 g/L de extrato de malte; 5 g/L de peptona de soja; 10 g/L de glicose; 15 g/L de ágar). Os isolados foram mantidos em placas de Petri contendo o meio de cultura YM por meio de repicagens sucessivas para uso nos experimentos. Já a conservação a longo prazo foi realizada por armazenamento em solução aquosa de glicerol a 10% conservadas em geladeira a 3 °C (GONÇALVES et al., 2016).

2.3. Taxonomia

2.3.1 Estudos Morfológicos

As lâminas foram preparadas por raspagem, com auxílio de um bisturi, dos teliósporos presentes nos "chicotes" e montadas em lactofucsina e lactoglicerol. Depois de prontas foram analisadas sob microscópio de luz (Olympus, BX53) adaptado com iluminação por contraste diferencial e equipado com sistema de captura digital (Olympus Q-Color 5™). A morfologia foi estudada e dados biométricos foram obtidos a partir da medição de pelo menos 30 estruturas.

Amostras de material seco contendo os soros com teliósporos foram montadas em *stubs* com fita adesiva dupla face e revestidas a ouro usando um pulverizador FDU 010 da

Balzer. Um microscópio eletrônico de varredura (MEV) Carl-Zeiss Modelo LEO VP 1430 foi usado para analisar e gerar imagens das amostras.

2.3.2 Extração de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento do isolado:

O DNA genômico foi extraído a partir de culturas puras de *Anthracoystis panicleucophaei* cultivada em meio de cultura YM, incubados a 25 °C sob regime de luz de 12 horas, durante sete dias. Aproximadamente 50-80 mg de colônia leveduriforme foi raspada da superfície do meio e transferidos para microtubos tipo eppendorf (1,5 mL) esterilizados, contendo esferas de zircônio. O microtubo foi colocado em L-Beader-3 (Locus Biotecnologia) a uma velocidade de 4000 rpm, 2 ciclos de 30 segundos cada. A extração foi realizada utilizando o Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega Corporation, WI, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A região do Espaçador Interno Transcrito (ITS) foi amplificada utilizando os primers ITS4 e ITS5 (WHITE et al., 1990). A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada utilizando volume total de 12,5 µL em reações, consistindo de uma mistura de 2 µL (20 ng) de DNA, 6.25 µL de Dream Taq Master Mix (Fermentas Company), 0.25 µL de DMSO, 1.25 µL de BSA, 2.25 µL de H₂O, e 0.25 µL de cada primer.

A reação de PCR para a região ITS ocorreu em 95 °C por 5 min, seguida por 35 ciclos de 94 °C por 1 min (desnaturação), 52 °C por 1 min (anelamento), 72 °C por 2 min (alongamento) e 72 °C por 10 min (extensão final).

O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 2% corados com GelRed™ (Biotium Inc., Hayward, CA, E.U.A.) e visualizadas sob luz UV para verificar o tamanho e pureza de amplificação. Os produtos de PCR foram purificados e sequenciados pela Macrogen Inc., Coreia do Sul (<http://www.macrogen.com>).

De posse dos resultados do sequenciamento, o software SeqAssem ver. 07/2008 (HEPPERLE, 2004) foi utilizado para avaliar os eletroferogramas, corrigir possíveis nucleotídeos em posições ambíguas e gerar as sequências consensos (contigs).

As sequências das regiões ITS do isolado, foram comparadas com sequências disponíveis no GenBank utilizando a ferramenta BLAST.

As sequências geradas, juntamente com outras obtidas através da base de dados GenBank do National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), foram alinhadas utilizando o algoritmo MUSCLE presente no software MEGA X ver. 10.2.2 (KUMAR et al., 2018).

Foi realizada a reconstrução filogenética com base no gene ITS através do método de Inferência Bayesiana (Bayesian inference – BI).

Previamente às análises filogenéticas, foi determinado o melhor modelo de substituição para o gene/locus com a ferramenta jModelTest2 ver. 2.1.6 (DARRIBA et al., 2012).

Análises de inferência Bayesiana (IB) empregando um método de Markov Chain Monte Carlo foram realizadas com todas as sequências. Antes de iniciar a IB, os melhores modelos de substituição de nucleotídeos foram determinados com MrMODELTEST 2.3 (POSADA & BUCKLEY, 2004). Uma vez calculados os escores de verossimilhança, os modelos foram selecionados de acordo com o Critério de Informação de Akaike (AIC). O modelo de evolução GTR + I + G foi usado para ITS. A árvore ITS foi gerada no portal CIPRES usando MrBayes no XSEDE 3.2.6 (MILLER et al., 2011), visualizadas no programa FigTree v1.3.1 (RAMBAUT, 2009) e editadas em CorelDRAW Graphics Suite 2017.

2.4. Potencial de *A. panici-leucophaei* para o manejo de *D. insularis*.

Avaliação preliminar do potencial do *A. panici-leucophaei* foi efetuada baseada nas observações feitas no campo sobre a severidade da doença causada pelo fungo, na identidade e grupo a que pertence e na performance (crescimento e esporulação) durante o cultivo *in vitro*.

2.4.1 Obtenção de teliósporos

Panículas de *D. insularis* infectadas com carvão foram coletadas e secas com jornal em prensa botânica. Os soros foram esmagados e os teliósporos passados por uma tela de 60 malhas para remover os detritos das plantas. A germinação dos teliósporos foi determinada para observação das condições mais favoráveis *in vitro*, colocando gotas de suspensão de teliósporos em água destilada em lâminas, no escuro, por 4 e 12 horas e em placas de Petri contendo o meio de cultura YM, incubando a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. A avaliação da germinação foi realizada em microscópio óptico e contabilizada.

2.4.2 Obtenção de esporídios

Teliósporos diplóides foram coletados de chicotes e transferidos para microtubos contendo água destilada adicionada do antibiótico sulfato de estreptomicina (5 mg /L), incubados por 30 minutos em temperatura ambiente. Três diluições em série foram realizadas e 100 µL de cada suspensão foram semeados em meio YM sólido e incubados durante a noite

a 28 °C, no escuro. Após 24 horas foram realizados isolamentos monospóricos, transferindo teliósporos germinados individuais para o meio líquido YM (3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte, 5 g/L de peptona de soja, 10 g de glicose) e incubados em agitador orbital a 28 °C à 150 rpm, durante 05 dias, para obter as células leveduriformes (esporídios haplóides resultantes do crescimento clonal após a meiose). Células semelhantes a levedura foram diluídas, plaqueadas em meio YM sólido e isoladas para testes de compatibilidade. A reação de compatibilidade foi evidenciada pelo aparecimento de micélio branco na placa. Os isolados foram arbitrariamente designados como mais ou menos (esporídios de tipos sexuais opostos) (BANUETT & HERSKOWITZ, 1989; SANTIAGO et al., 2012).

Os isolados compatíveis foram transferidos separadamente para o meio líquido YM e incubados em agitador orbital a 28 °C, a 150 rpm por 5 dias, no escuro para multiplicação das células haploides levedura-like. A suspensão de células obtida foi diluída no momento das inoculações e ajustada para uma concentração de 1×10^6 esporídios/mL, com auxílio de uma câmara de Neubauer. Os isolados compatíveis, BSV1 e BSV2, foram misturados uma hora antes das inoculações.

2.4.3 Efeitos da inoculação de teliósporos e esporídios de *A. panici-leucophaei* em diferentes estádios fenológicos de *D. insularis*.

Sementes de *D. insularis* foram semeadas superficialmente em vasos de 0,5 L contendo solo + areia + esterco na proporção de 1: 1: 1. Foram dispostas 12 sementes em cada vaso. Após a germinação foi realizado um desbaste, mantendo-se cinco plantas por vaso. A produção de teliósporos e esporídios de *A. panici-leucophaei* ocorreu conforme item 2.4.1 e 2.4.2. Os tratamentos consistiram em:

a) TS1 - Teliósporos no solo (Pré-emergência): 10 mL da suspensão contendo $3,23 \times 10^6$ teliósporos mL^{-1} + 0,01% de Tween ® 20 foram pulverizados na superfície do solo logo após a semeadura com o auxílio de um minipressurizador. O controle consistiu de vasos pulverizados apenas com água esterilizada + 0,01% de Tween ® 20.

b) TRE1 - Teliósporos em plantas com 1 par de folhas (10 DAS (dias após a semeadura)): a inoculação foi realizada com 10 mL da suspensão de teliósporos ($3,23 \times 10^6$ teliósporos mL^{-1} com Tween 0,01% ® 20) sobre plantas de capim-amargoso recém-emergidas, com o auxílio de um minipressurizador. Como controle, plantas no mesmo estágio foram inoculadas apenas com água esterilizada + 0,01% de Tween ® 20.

c) TA1 - Teliósporos em plantas de 3-4 folhas (25 DAS): foram inoculados 10 mL de uma suspensão contendo ($3,69 \times 10^6$ teliósporos mL^{-1}) + 0,01% de Tween ® 20; plantas inoculadas apenas com água esterilizada + 0,01% de Tween ® 20 foram utilizadas como controle.

d) ES3 - Esporídios no solo (Pré-emergência): 10 mL de uma suspensão contendo $3,17 \times 10^6$ esporídios mL^{-1} + 0,01% de Tween ® 20 foram pulverizados na superfície do solo logo após a semeadura com o auxílio de um minipressurizador. O controle consistiu de vasos pulverizados apenas com água esterilizada + 0,01% de Tween ® 20.

e) ERE3 - Esporídios em plantas com 1 par de folhas (10 DAS): a inoculação foi realizada aplicando 10 mL de uma suspensão de esporídios ($3,94 \times 10^6$ esporídios mL^{-1} com Tween 0,01% ® 20) sobre plantas de capim-amargoso recém-emergidas do solo, com o auxílio de um minipressurizador. Como controle, plantas na mesma idade foram inoculadas apenas com água esterilizada + 0,01% de Tween ® 20.

f) EA3 - Esporídios em plantas de 3-4 folhas (25 DAS): foram inoculadas 10 mL de uma suspensão contendo ($3,94 \times 10^6$ esporídios mL^{-1}) + 0,01% de Tween ® 20; plantas inoculadas apenas com água esterilizada + 0,01% de Tween ® 20 foram utilizadas como controle.

As plantas foram mantidas em condições de casa de vegetação a aproximadamente 21,2 °C (max. 30,3°C) e (min. 12,1°C) e fotoperíodo de 12 horas, durante todo o período do experimento. Foram colocados plásticos umedecidos internamente sobre os vasos (câmara úmida) logo após as inoculações (por 48 horas) e a superfície do solo foi levemente irrigada diariamente. Com o intuito de confirmar a patogenicidade do fungo, foram coletadas partes de folhas e de caules inoculadas com teliósporos e esporídios de todos os tratamentos e realizados isolamentos indiretos do patógeno.

As plantas foram avaliadas aos 37 dias após a semeadura com relação à altura, comprimento da raiz, diâmetro do caule, biomassa seca de raízes e da parte aérea, clorofila e número de folhas por planta. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com 5 parcelas e 20 repetições para cada tratamento, sendo cada planta considerada como repetição. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANAVA, $p < 0,05$) e as médias, comparadas pelo teste de Tukey.

2.4.4 Potencial de esporídios e teliósporos de *A. panici-leucophaei* no manejo de *D. insularis* em pós-emergência.

Sementes de *D. insularis*, foram semeadas superficialmente em vasos de 5,0 L contendo solo + esterco + areia na proporção de 4: 2: 1. Foram colocadas 30 sementes em cada vaso. Os tratamentos consistiram em:

a) TRE - Teliósporos aplicados com minipressurizador em plantas com 2-3 folhas (19 DAS): foram inoculadas 20 mL da suspensão de teliósporos contendo $2,31 \times 10^6$ teliósporos/mL (Tween 0,01% ® 20); plantas inoculadas apenas com água esterilizada + 0,01% de Tween ® 20 foram utilizadas como controle. A inoculação foi realizada até o molhamento completo das plantas.

b) BSV1 + BSV2 - Esporídios da mistura dos isolados BSV1 e BSV2: uma hora antes da inoculação, houve a mistura de 5 mL da suspensão do isolado BSV1, com 5 mL da suspensão do isolado BSV2, e foram inoculadas 20 mL da suspensão dos dois isolados, contendo $2,64 \times 10^6$ esporídios/mL (Tween 0,01% ® 20); com o auxílio de um minipressurizador, em plantas recém-emergidas. O controle consistiu de vasos pulverizados apenas com água esterilizada + 0,01% de Tween ® 20.

c) BSV1 - Esporídios do isolado BSV1: foram inoculadas 20 mL de uma suspensão do isolado BSV1, contendo $2,39 \times 10^6$ esporídios/mL (Tween 0,01% ® 20) com o auxílio de um minipressurizador, em plantas recém-emergidas. O controle consistiu de vasos pulverizados apenas com água esterilizada + 0,01% de Tween ® 20.

d) BSV2 - Esporídios do isolado BSV2: foram inoculadas 20 mL de uma suspensão do isolado BSV2, contendo $2,51 \times 10^6$ esporídios/mL (Tween 0,01% ® 20) com o auxílio de um minipressurizador em plantas recém-emergidas. O controle consistiu de vasos pulverizados apenas com água esterilizada + 0,01% de Tween ® 20.

As plantas foram mantidas em condições de casa de vegetação a aproximadamente 24,6 °C (max. 33,4 °C) e (min. 15,9 °C) e fotoperíodo de 12 horas, durante todo o período do experimento. Foram colocados plásticos umedecidos internamente sobre os vasos (câmara úmida) logo após as inoculações por 48 horas e a superfície do solo foi levemente irrigada. As plantas foram avaliadas aos 48 dias após a semeadura, quanto a: altura das plantas, usando a folha bandeira como referência (cm), comprimento de raiz (cm), diâmetro do caule (cm), peso da massa seca de raiz (g), peso da massa seca da parte aérea (g) e número de folhas por planta.

Aos 102 DAS foram avaliados, além das variáveis anteriormente mencionadas: Número de perfilhos, Número de inflorescências e Número de perfilhos com carvão. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com 5 parcelas e 25 repetições para cada tratamento, sendo considerada uma planta como repetição. Os dados

foram submetidos à análise de variância (ANAVA, $p < 0,05$), e as médias, comparadas pelo teste de Tukey.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Taxonomia

3.1.1 Identificação morfológica de *A. panici-leucophaei*

Anthracoystis panici-leucophaei (Bref.) McTaggart & R.G. Shivas, in McTaggart, Shivas, Geering, Vánky & Scharaschkin, *Persoonia* 29:124 (2012). (**Figura 2**)

Sinônimos: *Lundquistia panici-leucophaei* (Bref.) Vánky, *Fungal Diversity* 17:167 (2004), *Sorosporium bonariense* (Speg.) Zundel, *Contr. Dept. Bot. Pennsylvania St. Coll.* 176: 54 (1953),

Sphaceloma bonariense (Speg.) Cif. [as 'bonariensis'], *Annls mycol.* 29(1/2): 56 (1931),

Sphacelotheca bonariensis (Speg.) Cif., *Annls mycol.* 29(1/2): 56 (1931),

Sphacelotheca panici-leucophaei (Bref.) G.P. Clinton, *N. Amer. Fl.* (New York) 7(1): 28 (1906),

Sporisorium bonariense (Speg.) Vánky,

Sporisorium panici-leucophaei (Bref.) M. Piepenbr., *Mycol. Res.* 103(4): 465 (1999),

Ustilago bonariensis Speg., *Anal. Mus. nac. B. Aires*, Ser. 3 19(12): 287 (1909),

Ustilago panici-leucophaei Bref., *Unters. Gesamtgeb. Mykol.* (Liepzig) 12: 114 (1895).

Soros compreendem as folhas superiores dos brotos estéreis, o caule floral e inflorescências mais ou menos desenvolvidas ou parte delas; longo, cilíndrico, frequentemente torcido, afinando em direção ao ápice, 0,2-0,8 × 4-15 cm, geralmente parcialmente envolto por bainhas de folhas saudáveis. Soros são cobertos por um perídio branco a ligeiramente acinzentado que durante a maturidade se rompem a partir do ápice. No soro, os tecidos parenquimatosos entre os vasos são substituídos por uma massa de teliósporos marrom escuro, semiaglutinados ou granular pulverulento, revelados pela ruptura do perídio. Teliósporos globosos, subglobosos, elipsoidais a ligeiramente irregulares, subpoliédricos, 6,0 × 8,0 μm, marrom amarelados; parede uniformemente espessa e densamente verruculosos.

Espécime examinado: Brasil: Minas Gerais; Monte Carmelo, em *Digitaria insularis*, 16 de abril de 2021, B. S. Vieira, isolados BSV1 e BSV2.

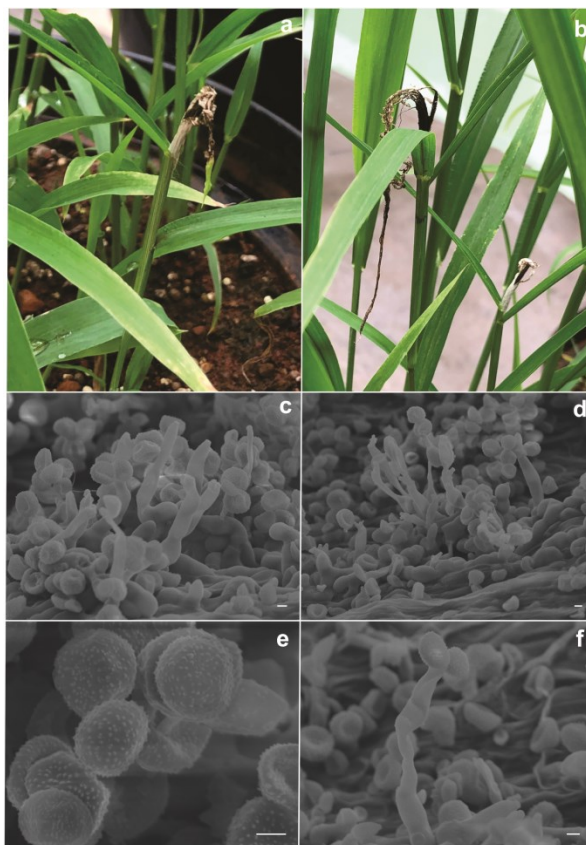


Figura 2. Observações macroscópicas e microscópicas de *A. panici-leucophaei*. a e b – Panículas infectadas (Soros); c e d – Teliósporos produzidos em hifas especializadas; e – Teliósporos verruculosos de *A. panici-leucophaei* observados em microscópio eletrônico de varredura (MEV); f – Detalhe de dois teliósporos sendo produzidos. Barra de escala = 2 μ m

3.1.2 Análise filogenética

Sequências da região ITS dos isolados BSV1 e BSV2 submetidas ao BLAST resultaram em alta similaridade (100% e 99.72%, respectivamente) com a sequência CP060299 do isolado SPL10 de *Anthracocystis leucophaei*.

A árvore filogenética obtida a partir de Inferência Bayesiana mostrou que os isolados BSV1 e BSV2 estão agrupados com alto suporte (0.96) com outros isolados de *A. panici-leucophaei*, que por sua vez formaram um clado bem suportado (1.0) dentro do gênero *Anthracocystis*. (**Figura 3**)

Nota: As características morfológicas dos isolados BSV1 e BSV2 foram muito próximas às descritas para *Anthracocystis panici-leucophaei*, por Vánky (2004), Cunnington et al. (2005) e Piatek (2006). Vánky (2004) e Cunnington et al. (2005) relataram esporos de *A. panici-leucophaei* com 6,0-9,5 μ m de comprimento e 5,5-8,0 μ m de largura, Piatek (2006)

relatou esporos medindo 6,0-8,5 µm de comprimento e 5,0-8,0 µm de largura, enquanto, os esporos medidos neste trabalho apresentaram diâmetro variável entre 6,0 – 8,0 µm.

Anthracoystis panici-leucophaei foi relatado em *Digitaria ammophila*, *D. breviglumis* e *D. brownii* na Austrália, em *D. insularis* em Cuba e no Brasil, *Echinochloa polystachya* na Argentina, *Oplismenopsis najada* no Paraguai, *Paspalum saccharoides* na Colômbia, *Triachne californica* em Cuba e nos Estados Unidos, *Triachne insularis* em Cuba, República Dominicana e Estados Unidos, e *Trichachne insularis* no Brasil e na Colômbia (FARR & ROSSMAN, 2022).

O material tipo de *Anthracoystis panici-leucophaei* (= *Ustilago panici-leucophaei*) foi descrita em *Digitaria insularis* (= *Panicum leucophaeum*), no Rio de Janeiro, Brasil, por Brefeld em 1895.

O gênero *Anthracoystis* passou por inúmeras mudanças no decorrer dos anos, muitas espécies antes pertencentes a outros gêneros foram incluídas no grupo, resultado de uma taxonomia imprecisa ou em construção para os fungos causadores de carvões. Muitas revisões têm sido realizadas na tentativa de esclarecer o posicionamento filogenético desses fungos (STOLL et al. 2003; CUNNINGTON et al., 2005; MCTAGGART et al., 2012; PIATEK et al., 2015). Curiosamente, McTaggart et al. (2012) ao promover a recombinação de *Sporisorium panici-leucophaei* para *Anthracoystis panici-leucophaei* não se preocuparam em inserir na sua análise filogenética isolados da localidade tipo. Apesar disto, nossos isolados coletados no Brasil agruparam-se com os demais, corroborando com os resultados de que *S. panici-leucophaei* é realmente *A. panici-leucophaei*. Os isolados BSV1 e BSV2 não foram coletados no Rio de Janeiro, localidade exata do tipo. Um isolado obtido posteriormente neste Estado poderia ser designado como neótipo e ser inserido em novos estudos filogenéticos para validar o posicionamento filogenético desta espécie, uma vez que, o material tipo, depositado no herbário Hamburguense (HBG) não mais existe.

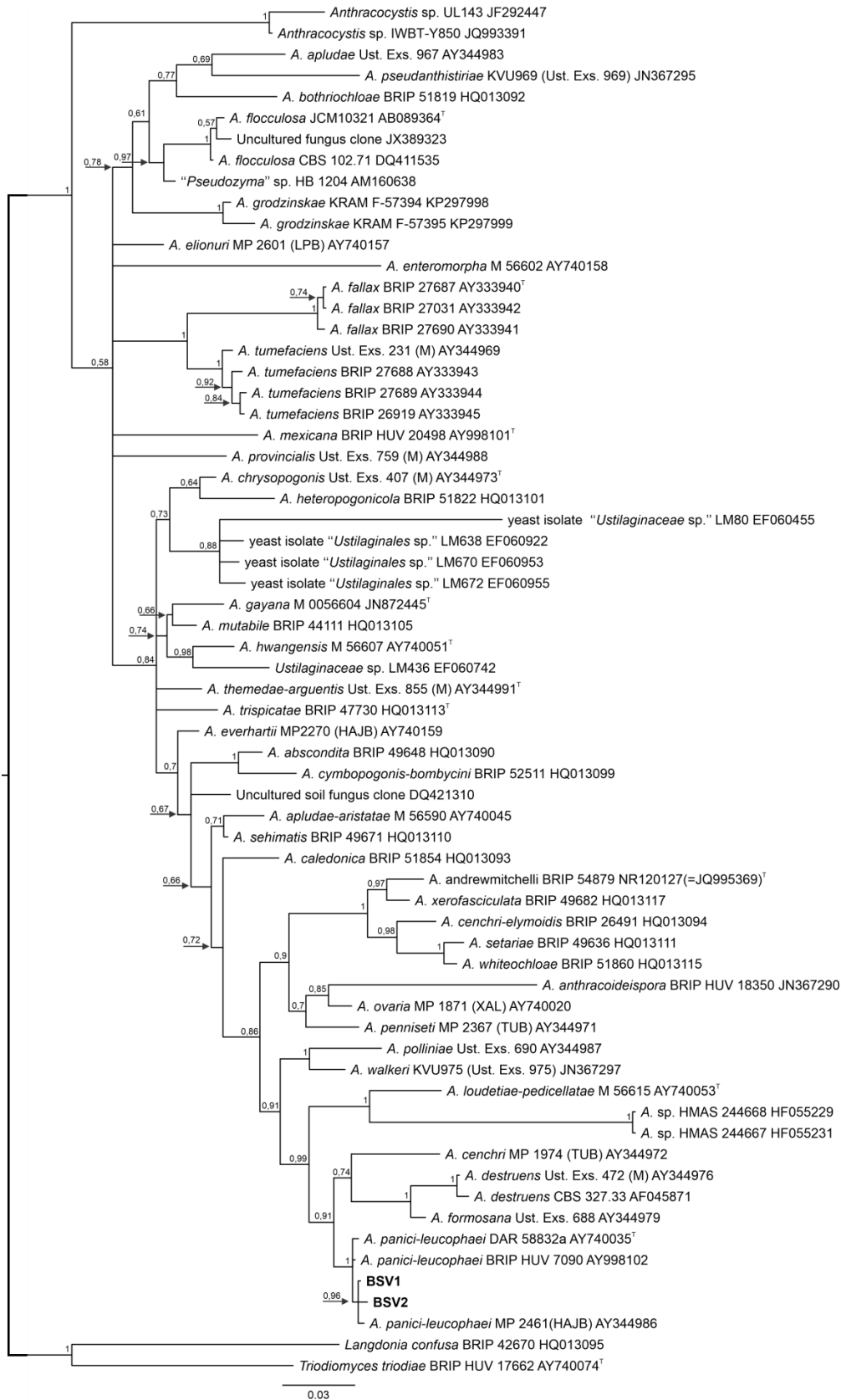


Figura 3. Árvore filogenética construída a partir de Inferência Bayesiana com sequências ITS de espécies de *Anthracocystis*. A árvore foi enraizada com *Langdonia confusa* e *Triodiomyces triodiae*.

3.2. Avaliação preliminar do potencial de *A. panici-leucophaei* para o controle biológico de *D. insularis*.

3.2.1 Efeito da inoculação de teliósporos e esporídios de *A. panici-leucophaei* em diferentes estádios fenológicos de *D. insularis*

No bioensaio delineado em condições de casa de vegetação, constatou-se que a inoculação de teliósporos e esporídios, em pré-emergência, em plantas recém-emergidas e em parte aérea (plantas com 3-4 folhas) retardou o desenvolvimento das plantas. A altura das plantas de capim-amargoso foi reduzida em todos os tratamentos em relação à testemunha (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Efeito da aplicação de teliósporos e esporídios de *A. panici-leucophaei* em diferentes estádios fenológicos de *D. insularis*.

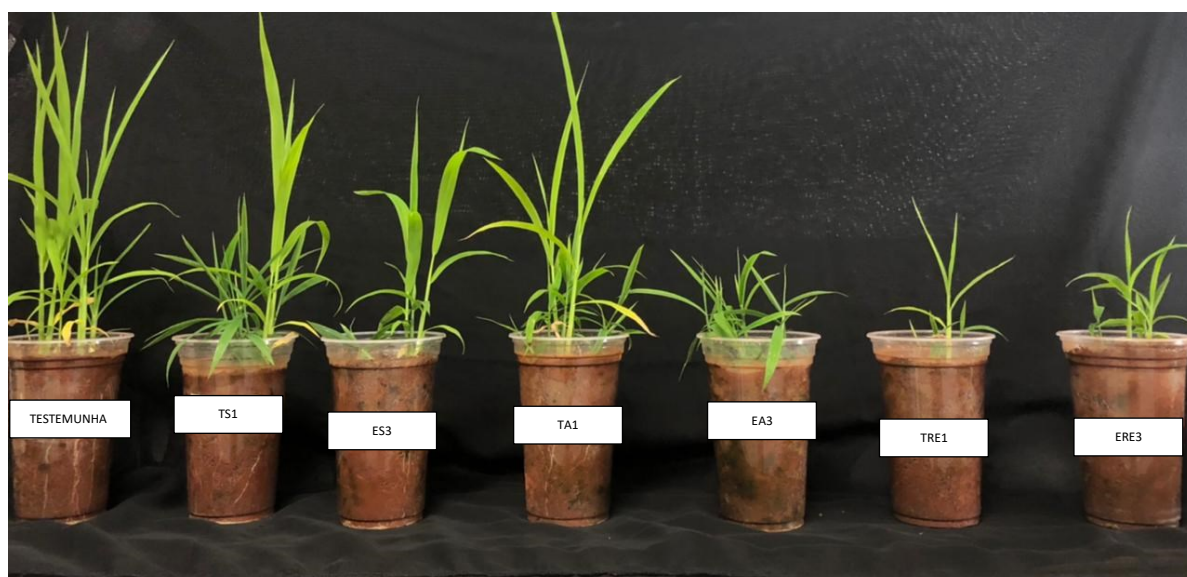
TRATAMENTOS	AP	CR	DC	PMSR	PMSPA	Clo A	NF
TEST	19,48 a	24,92 a	1,98 a	0,0786 a	0,1436 a	24,16 a	4,50 bc
PRÉ-EMERGÊNCIA							
TS1	7,70 b	17,07 b	1,93 a	0,0131 b	0,0754 b	6,38 c	5,35 a
ES3	9,14 b	17,64 b	1,08 b	0,0159 b	0,0621 bc	11,01 b	4,80 ab
RECÉM-EMERGIDAS (10 DAS) – 2 folhas							
TRE1	7,55 b	15,37 b	1,28 b	0,0167 b	0,0380 cd	11,17 b	3,95 c
ERE3	6,82 b	14,72 b	1,07 b	0,0150 b	0,0278 d	10,47 b	4,20 bc
PÓS-EMERGÊNCIA (25 DAS) – 3-4 folhas							
TA1	7,38 b	19,12 b	1,28 b	0,0107 b	0,0521 bcd	10,40 b	4,80 ab
EA3	7,67 b	18,21 b	1,42 b	0,0103 b	0,0516 bcd	12,41 b	4,70 b
CV%	37,28	25,66	26,54	93,31	41,88	33,81	13,93

AP: altura de plantas (cm); CR: comprimento de raiz (cm); DC: diâmetro do caule (cm); PMSR (g): peso da massa seca de raiz; PMSPA (g): peso da massa seca de parte aérea; Clo A: clorofila A; NF: número de folhas. TEST: testemunha; TS1: teliósporos no solo; ES3: esporídios no solo; TRE1: teliósporos em plantas recém-emergidas; ERE3: esporídios em plantas recém-emergidas; TA1: teliósporos em parte aérea; EA3: esporídios em parte aérea. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O tratamento com esporídios em plantas recém-emergidas apresentou a menor altura de plantas (64,9%), embora não tenha se diferenciado dos demais. Millhollon (2000) avaliou o efeito da inoculação de teliósporos de *Sporisorium cruentum* injetados em mudas de *Sorghum halepense*, de 14 a 21 (DAS), em contraste com a pulverização de teliósporos em

plantas de 45 a 90 cm de altura, no estágio inicial de florescimento, juntamente com a interferência da planta daninha no rendimento de híbridos de *Saccharum* sp.. As mudas de *Sorghum halepense* injetadas com teliósporos *S. cruentum*, apresentaram 98% de incidência no primeiro ano de safra e produção de cana de 57.000 kg ha⁻¹, enquanto a produção das áreas que não foram inoculadas foi de 37.000 kg ha⁻¹. A média de plantas infectadas que foram pulverizadas com teliósporos foi de 54% com um rendimento de safra de aproximadamente 52.000 kg ha⁻¹, não diferindo do rendimento das áreas que não foram pulverizadas com teliósporos.

Constatou-se, em análise visual preliminar, que houve inibição no desenvolvimento da parte aérea de plantas de *D. insularis* nos tratamentos TRE1, ERE3 e EA3 (**Figura 4**), demonstrando que as duas estruturas fúngicas foram capazes de infectar as plantas em estádios de desenvolvimento fenológico distintos.



Testemunha, TS1: teliósporos no solo, ES3: esporídios no solo, TA1: teliósporos em plantas com 3-4 folhas, EA3: esporídios em plantas com 3-4 folhas, TRE1: teliósporos em plantas recém-emergidas e ERE3: esporídios em plantas recém-emergidas.

Figura 4. Plantas de *D. insularis* 37 dias após sementeira, inoculadas com teliósporos e esporídios em diferentes estádios fenológicos.

Informações sobre o ciclo de vida do patógeno e o estágio mais propício de infecção nas plantas são escassas na literatura científica, no entanto, se assemelha ao do *Sporisorium scitamineum*, que apresenta três diferentes fases morfológicas, sendo elas, esporídios semelhantes à levedura haploides, hifas dicarióticas e teliósporos diploides (BENEVENUTO et al., 2016). Sob condições ambientais ótimas os teliósporos germinam, passam por meiose e

produzem esporídios haploides que crescem em meio de cultura como células do tipo levedura. Segundo Alexandre e Srinivasan (1966), a infecção no hospedeiro ocorre quando há combinação de dois esporídios haplóides de tipos opostos, que formam hifas dicarióticas infecciosas. O potencial de infecção de teliósporos e esporídios de fungos causadores de carvões promissores para uso no controle biológico têm sido estudados para diversas plantas daninhas no mundo todo, como por exemplo: teliósporos de *Sporisorium ophiuri* para controle de *Rottboellia cochinchinensis* (SMITH et al., 1997); teliósporos de *Sphacelotheca holci* para controle de *Sorghum halepense* (MASSIO & LINDOW, 1986); teliósporos e esporídios de *Sporisorium cruentum* para controle de *Sorghum halepense* (MILLHOLLON, 2000; GASSÓ et al., 2017).

O comprimento de raiz foi afetado de forma muito similar em todos os tratamentos em que houve a inoculação do patógeno, em todos os estádios fenológicos (**Tabela 1**). O comprimento de raiz no tratamento ERE3 foi 40,9% menor em relação à testemunha, evidenciando que os esporídios foram infectivos à parte aérea das plantas de capim amargoso e conseqüentemente causaram inibição no desenvolvimento da raiz. Massion e Lindow (1986) mostraram que um dos efeitos da infecção de *Sphacelotheca holci* na morfologia da planta daninha, *Sorghum halepense*, foi a redução de parte aérea e do comprimento do rizoma, em 28,8% e 44,5%, respectivamente.

Para a o diâmetro do caule, com exceção do tratamento com inoculação de teliósporos no solo, todos os outros tratamentos demonstraram diâmetros inferiores, revelando que o fungo foi capaz de infectar as plantas de capim-amargoso nos três estádios fenológicos testados, resultando em plantas menos vigorosas.

Johnson & Baudoin (1997) realizaram experimentos em casa de vegetação para avaliar o potencial do fungo *Ustilago syntherismae*, como agente de controle biológico para a *Digitaria ciliaris* (capim-colchão). Avaliaram a incidência de plantas infectadas, semeadas a 1 cm de profundidade, inoculadas com teliósporos de *U. syntherismae*, sendo semeadas entre 0 a 22 dias antes da aplicação (DAA). O maior percentual de plantas infectadas, ocorreu quando a inoculação foi realizada no mesmo dia do semeio, em três concentrações de inóculo ($3,6 \times 10^7$, $7,0 \times 10^6$ e $1,8 \times 10^6$ teliósporos mL⁻¹), aproximadamente, 86%, 81,5% e 57% de incidência, respectivamente. Quando o semeio de *D. ciliaris* foi realizado entre, 7 a 22 DAA, houve redução no número de plantas infectadas. Isto revela que o estágio fenológico das plantas pode interferir na capacidade de infecção do fungo na planta alvo.

De forma similar, o peso da massa seca de raiz apresentou redução em todos os tratamentos em relação à testemunha. Os tratamentos realizados em pós-emergência (25 DAS) EA3 e TA1 apresentaram redução de 86,9% e 86,4%, respectivamente, em relação à testemunha, representando os menores pesos de massa seca de raiz. Embora os outros tratamentos não tenham diferido significativamente entre si, os tratamentos em plantas recém-emergidas apresentaram porcentagens menores de inibição, ERE3 e TRE1, 80,9% e 78,7%, respectivamente, com maiores pesos de massa seca de raiz.

O peso da massa seca da parte aérea (PMSPA) apresentou a maior variabilidade entre os tratamentos (**Tabela 1**). A inoculação de esporídios e teliósporos em plantas recém-emergidas (ERE3 e TRE1) apresentaram redução de 80,6% e 73,5%, respectivamente, em relação à testemunha, não diferindo significativamente dos tratamentos EA3 e TA1, inoculados em pós-emergência (25 DAS), que apresentaram redução de 64,1% e 63,7%, respectivamente. O tratamento que menos reduziu o peso da massa seca da parte aérea foi o TS1 (47,5%). Foi evidenciado, mesmo que de forma preliminar, uma expressiva redução na parte aérea de plantas de capim-amargoso após a inoculação de, por exemplo, esporídios de *A. panici-leucophaei* em plantas recém-emergidas, inclusive com porcentagens de inibição da parte aérea das plantas superiores à aplicação de herbicidas químicos. Diante do trabalho de Coradin et al. (2019), avaliando a massa seca de parte aérea de plantas de capim-amargoso submetidas à aplicação de herbicidas em pré-emergência, verificou-se que o herbicida diclosulam, na dose de 25,2 g/ha, reduziu em 58,3% o peso da massa seca da parte aérea das plantas em relação a testemunha, em plantas avaliadas aos 28 DAE (dias após emergência).

Foram observadas alterações significativas no índice de clorofila A em plantas de capim-amargoso tratadas com esporídios e teliósporos nos três estádios fenológicos testados. O menor índice de clorofila A foi observada no tratamento de pré-emergência TS1, apresentando redução de 73,6% em relação à testemunha. Os demais tratamentos (ES3, TRE1, ERE3, TA1 e EA3) não diferiram significativamente entre si, quanto a esta variável, no entanto, o índice de clorofila A reduziu em 54,4%, 53,8%, 56,7%, 56,9% e 48,6% em relação à testemunha, respectivamente.

O número de folhas por planta foi superior em plantas onde houve a inoculação de teliósporos no solo (5,35 folhas/planta), não diferindo de ES3 e TA1 e sendo maior que a testemunha (**Tabela 1**). O tratamento que apresentou menor número de folhas foi o TRE1 (3,95 folhas/planta).

3.2.2 Efeito de esporídios e teliósporos de *A. panici-leucophaei* no manejo de *D. insularis* em pós-emergência.

Avaliação aos 48 dias após a semeadura:

Observando os resultados significativos e promissores dos tratamentos realizados no estágio fenológico de plantas recém-emergidas (**Tabela 1**), prosseguiu-se o segundo experimento para averiguar o potencial e os efeitos da infecção de esporídios e teliósporos neste estágio. De maneira geral, o tratamento com teliósporos em plantas recém-emergidas, não apresentou resultados promissores para o controle de *D. insularis* (**Tabela 2**). No período de três dias após a inoculação, onde o fungo germina e infecta a planta, a temperatura nas condições desse experimento variou entre 31,7°C e 20,7°C, o que pode ter interferido na taxa de germinação dos teliósporos. Boguena et al. (2007) para avaliar o potencial de biocontrole de *Ustilago bullata*, examinaram o efeito da temperatura durante o processo de infecção de teliósporos em plantas de *Bromus tectorum*, mostrando que o patógeno apresentou alta incidência em plantas inoculadas entre 20°C e 30°C, além disto, mostraram que as taxas de proliferação esporidial aumentaram linearmente na temperatura de 25°C, podendo inferir que o processo de germinação dos teliósporos é beneficiado nesta faixa de temperatura.

Tabela 2 – Efeito de esporídios e teliósporos de *A. panici-leucophaei* no manejo de *D. insularis* inoculados em plantas recém-emergidas (2-3 folhas) e avaliadas aos 48 DAS.

Tratamentos	AP	CR	DC	PMSR	PMSPA	NF
TEST	13,14 ab	27,65 a	2,10 a	0,0334 a	0,0872 a	3,92 a
TRE	10,86 bc	27,96 a	1,84 a	0,0261 ab	0,0509 bc	3,88 a
BSV1	14,52 a	32,69 a	1,95 a	0,0298 a	0,0657 ab	3,92 a
BSV2	11,96 abc	18,04 b	1,86 a	0,0156 bc	0,0498 bc	3,44 a
BSV1 + BSV2	9,68 c	19,13 b	1,73 a	0,0108 c	0,0308 c	3,72 a
CV%	32,74	28,14	25,98	66,24	66,20	17,72

AP: altura de plantas (cm); CR: comprimento de raiz (cm); DC: diâmetro do caule (cm); PMSR (g): peso da massa seca de raiz; PMSPA (g): peso da massa seca de parte aérea; NF: número de folhas. TEST: testemunha; TRE: teliósporos em plantas recém-emergidas; BSV1: esporídios do isolado BSV1 em plantas recém-emergidas; BSV2: esporídios do isolado BSV2 em plantas recém-emergidas; e BSV1+BSV2: esporídios da mistura dos dois isolados em plantas recém-emergidas. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Constatou-se que a pulverização de esporídios com a mistura dos dois isolados BSV1 e BSV2 foi o tratamento que mostrou a maior redução de altura das plantas de capim-amargoso, 26,3%. A inoculação de teliósporos (TRE) também reduziu em 17,3% a altura das plantas. A pulverização do isolado BSV1 apresentou a maior altura de plantas (14,52 cm), sendo o que menos interferiu no desenvolvimento das plantas inicialmente. O isolado BSV2

reduziu em 8,9% a altura de plantas. É possível inferir que os dois tipos de esporos inibem o crescimento das plantas de capim-amargoso no estágio fenológico de plantas recém-emergidas.

Os esporídios produzidos em meio artificial líquido foram infecciosos às plantas de *D. insularis*, característica muito relevante para avaliar o potencial deste fungo como agente de controle biológico, pois, pode viabilizar o cultivo *in vitro* a baixo custo para futura produção de um bioherbicida comercial (SMITH et al., 1997).

De forma similar, o fungo reduziu o comprimento das raízes de *D. insularis*, com inibições de 34,7% e 30,8%, em relação à testemunha, nos tratamentos BSV2 e BSV1+BSV2, respectivamente. Os tratamentos BSV1 e TRE apresentaram comprimento de raiz superiores ao da testemunha, 32,69 cm, 27,96 cm e 27,65 cm, respectivamente. Massion & Lindow (1986), avaliaram o efeito da infecção por *Sphacelotheca holci* na morfologia e competitividade de *Sorghum halepense*, reduzindo o peso da biomassa de parte aérea, da raiz e do comprimento do rizoma, 28,8%, 49,0% e 44,5%, respectivamente, em relação a plantas que não foram inoculadas. Os resultados indicaram que as plantas não infectadas eram mais vigorosas. Em competição com a cultura do milho e com a inoculação do fungo, os resultados foram ainda melhores, 68,3%, 76,5% e 81,9%, respectivamente, apresentando um excelente limitador de desenvolvimento de *Sorghum halepense*. Os resultados obtidos no presente trabalho trazem a perspectiva de se avaliar futuramente o potencial de manejo de capim-amargoso com esporídios de *A. panici-leucophaei* em pós-emergência em micro parcelas com culturas tais como o milho ou soja, a fim de avaliar se existe um efeito sinérgico de plantas inoculadas com o fungo mais o efeito da competição com a cultura visando uma diminuição do crescimento das plantas de capim-amargoso.

Millhollon (2000), avaliou o potencial de teliósporos e esporídios de *Sporisorium cruentum* para o biocontrole de *Sorghum halepense*, demonstrando infecção superior a 90% das plantas, no período de três anos em experimento em vasos e com uma variabilidade maior no experimento de campo, no período de 1997 e 1998, 40 e 88% respectivamente para teliósporos e 62 e 71%, respectivamente, para esporídios.

Os diâmetros dos caules, juntamente com o número de folhas/planta não diferiram significativamente para nenhum dos tratamentos. Os esporídios de *A. panici-leucophaei*, dos tratamentos BSV1+BSV2 e BVS2, reduziram o peso da massa seca de raízes das plantas de capim-amargoso, com inibições de 67,6% e 46,7%, respectivamente. Os tratamentos BSV1 e TRE não diferiram significativamente da testemunha, embora tenham apresentado redução de

10,7% e 21,8% no peso da massa seca das raízes, respectivamente. De forma similar, para o peso da massa seca de parte aérea das plantas de capim-amargoso, foi observada diminuição significativa para os tratamentos BSV1+BSV2 e BSV2, com inibições de 64,7% e 42,9%, respectivamente. O tratamento com teliósporos (TRE) reduziu o peso da massa seca de parte aérea em 41,6%. A testemunha e o tratamento BSV1 não diferiram significativamente, no entanto, o segundo reduziu 24,6% o peso da massa seca de parte aérea das plantas de *D. insularis*, em relação à testemunha.

Gassó et al. (2017), avaliaram o efeito da inoculação de suspensão de teliósporos e esporídios do fungo *Sporisorium cruentum*, em rizomas de *Sorghum halepense*, e constataram redução da matéria seca da parte aérea das plantas em 69,2% e 67,3%, respectivamente.

Avaliação aos 102 dias após a semeadura:

As plantas foram avaliadas aos 102 DAS, quando em todos os tratamentos já havia plantas com panículas desenvolvidas. Constatou-se que a pulverização de esporídios do isolado BSV2 foi o tratamento que mais apresentou redução para altura das plantas de capim-amargoso, 40,3% de redução em relação a testemunha e o único que manifestou o sintoma de carvão nas inflorescências (**Tabela 3**). Os demais tratamentos (TRE, BSV1 e BSV1+BSV2) não diferiram estatisticamente da testemunha, porém, também apresentaram redução na altura de plantas, 8,8%, 7,9% e 2,6%, respectivamente.

Tabela 3 – Efeito de esporídios e teliósporos de *A. panici-leucophaei* no manejo de *D. insularis* inoculados em plantas recém-emergidas (2-3 folhas) e avaliadas aos 102 DAS.

Tratamentos	AP	CR	DC	NP	NI	NPC	PMSR	PMSPA	NF
TEST	1,14 a	0,428 a	2,85 a	3,00 ab	0,56 a	0,00 b	1,090 a	5,553 a	12,4 a
TRE	1,04 a	0,336 b	2,43 b	2,36 b	0,12 b	0,00 b	0,633 b	3,088 b	10,2 ab
BSV1	1,05 a	0,334 b	2,45 ab	2,72 ab	0,36 ab	0,00 b	0,747 b	3,485 b	10,9 a
BSV2	0,68 b	0,327 b	2,40 b	3,56 a	0,20 ab	2,16 a	0,373 c	2,703 b	8,6 b
BSV1 + BSV2	1,11 a	0,428 a	2,56 ab	2,76 ab	0,36 ab	0,00 b	0,714 b	3,164 b	11,8 a
CV%	19,86	25,54	20,24	38,11	152,09	201,28	38,13	51,47	26,61

AP: altura de plantas (m); CR: comprimento de raiz (m); DC: diâmetro do caule (cm); NP: número de perfilhos; NI: número de inflorescências; NPC: número de perfilhos com carvão; PMSR (g): peso da massa seca de raiz; PMSPA (g): peso da massa seca de parte aérea; NF: número de folhas. TEST: testemunha; TRE: teliósporos em plantas recém-emergidas; BSV1: esporídios do isolado BSV1 em plantas recém-emergidas; BSV2: esporídios do isolado BSV2 em plantas recém-emergidas; e BSV1+BSV2: esporídios da mistura dos dois isolados em plantas recém-emergidas. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Gassó et al. (2017) observaram redução na altura das plantas de *Sorghum halepense* infectadas por *Sporisorium cruentum*, em relação à testemunha, o que resultou,

posteriormente, em um menor peso de matéria seca de parte aérea. Podemos inferir que o isolado BSV2 possui alto potencial de inibição e que o efeito da inoculação de esporídios de *A. panici-leucophaei* não foi superado pelas plantas até o início da formação das panículas, interferindo negativamente no crescimento das plantas de capim-amargoso. Fischer e Holton (1957) enfatizaram a importância da inoculação ser realizada nos estádios fenológicos iniciais das plantas daninhas, pois, comumente é o período que se encontram suscetíveis a infecção dos fungos causadores de carvões. Nos experimentos de Johnson & Baudoin (1997), foi identificada alta incidência de carvão, causado pelo fungo *Ustilago syntherismae*, em plantas de capim-colchão (*Digitaria ciliares*) somente quando o período entre o semeio e a inoculação não excedeu quatro dias e a profundidade de plantio não foi superior a 1,0 cm.

De forma similar, teliosporos e esporídios de *A. panici-leucophaei* reduziram o comprimento das raízes de *D. insularis*, com inibições de 21,5%, 21,9% e 23,6%, em relação a testemunha, nos tratamentos TRE, BSV1 e BSV2, respectivamente. Apenas o tratamento BSV1+BSV2 não apresentou redução no comprimento de raiz, sendo significativamente igual ao da testemunha (**Tabela 3**).

As plantas dos tratamentos com o isolado BSV2 e TRE apresentaram as maiores reduções para diâmetro de caule, 15,8% e 14,7%, respectivamente. Os tratamentos BSV1 e BSV1+BSV2, reduziram em 14,0% e 10,2% o diâmetro de caule, não diferindo significativamente da testemunha.

O número de perfilhos do tratamento BSV2, foi superior a todos os demais, incluindo a testemunha (**Tabela 3**). Para os tratamentos TRE, BSV1 e BSV1+BSV2, o número de perfilhos foi inferior, 21,3%, 9,3% e 8,0% em relação a testemunha. A produção de múltiplos perfilhos, 32 dias após a inoculação, podem caracterizar uma anormalidade causada pela infecção de *A. panici-leucophaei* nas plantas de capim-amargoso, que posteriormente originaram pequenas panículas com soro. Gassó et al. (2017), mostraram que plantas de *Sorghum halepense* na fase reprodutiva, com 18 a 25 dias após a inoculação de *Sporisorium cruentum*, produziram múltiplas gemas (entre 3 a 7 gemas) originárias de um nó comum, que deram origem a pequenas panículas infectadas ou estéreis, anormalidade típica da infecção por *S. cruentum*.

Todos os tratamentos apresentaram número de perfilhos com inflorescência desenvolvida inferiores a testemunha. O tratamento com teliosporos reduziu em 78,6% o número de perfilhos com inflorescência, seguido dos tratamentos BSV2, BSV1 e BSV1+BSV2, com redução de 64,3% e 35,7%, respectivamente. Observou-se que apenas as

plantas do tratamento BSV2 apresentaram panículas infectadas, com aproximadamente 68% das plantas avaliadas neste tratamento manifestando panículas com Soros contendo teliósporos de *A. panici-leucophaei*, o que caracteriza este isolado como potencial agente de controle biológico contra capim-amargoso. A redução da produção de sementes é um fator muito importante no manejo de plantas daninhas, uma vez que, essas sementes podem germinar em ampla faixa de temperatura e intensidade luminosa, contribuindo para a disseminação da espécie (MENDONÇA et al., 2014). Millhollon (2000), enfatizou no seu trabalho, a importância da inoculação de esporídios de *Sporisorium cruentum*, se for desenvolvido como micoherbicida, para o controle de *Sorghum halepense*. Assim, como esporídios de *A. panici-leucophaei*, no controle de *D. insularis*. No entanto, é necessário que novos estudos sejam realizados para corroborar esse potencial, como avaliações da especificidade do fungo. Johnson & Baudoin (1997), ressaltaram que antes que um patógeno seja usado como agente de controle biológico, a gama de hospedeiros deve ser investigada para determinar o risco para plantas não-alvo.

O tratamento com o isolado BSV2 reduziu em 65,8% o peso da massa seca de raízes das plantas de capim-amargoso, em relação a testemunha. Os tratamentos TRE, BSV1 e BSV1+BSV2 apresentaram redução de 41,9%, 31,5% e 34,5% no peso da massa seca das raízes, respectivamente. De forma similar, para o peso da massa seca de parte aérea das plantas de capim-amargoso, foi observada diminuição significativa para todos os tratamentos (BSV2, TRE, BSV1+BSV2 e BSV1), com inibições de 51,3%, 44,4%, 43,0% e 37,2%, respectivamente. Gassó et al. (2017), mostraram que houve uma redução de 50% do peso da massa seca dos rizomas de *S. halepense* e de 69,2% no peso da massa seca da parte aérea de plantas inoculadas com teliósporos de *S. cruentum*, enquanto para esporídios a redução foi de 43,6% para peso da massa seca dos rizomas e de 67,3% para peso da massa seca da parte aérea, ao final do ciclo da cultura. O tratamento BSV2 demonstrou as maiores reduções no peso da massa seca de raízes e de parte aérea, assim como o menor número de folhas/planta, com redução de 30,6% em relação a testemunha, seguido dos tratamentos TRE, BSV1 e BSV1+BSV2, com 17,7%, 12,1% e 4,8%, respectivamente.

Métodos de manejo que dificultam o desenvolvimento inicial das plantas daninhas contribuem para a postergação de futuras aplicações de herbicidas em pós-emergência, assim como, promovem condições mais favoráveis para culturas economicamente importantes, como soja e milho, realizarem o fechamento do dossel, podendo reduzir perdas na produtividade por matocompetição. A descoberta de potenciais agentes de controle e o

desenvolvimento de herbicidas à base de produtos naturais são de interesse social, cultural, ambiental (GOMES et al., 2013) e principalmente agrônômico, devido ao aumento da probabilidade de se obter uma alternativa eficaz no controle de plantas resistentes a herbicidas convencionais e reduzir o impacto ambiental causados pelos mesmos (GALON et al., 2016).

4. CONCLUSÕES

O fungo foi identificado por análises morfológicas e estudos filogenéticos como pertencente à espécie *Anthracoystis panici-leucophaei*.

Os teliósporos e esporídios de *A. panici-leucophaei* são infectivos a *D. insularis* e inibem o crescimento da planta daninha alvo.

O estágio fenológico de *D. insularis* influencia na sensibilidade ao fungo. Plantas recém-emergidas, com 1 par de folhas, são mais sensíveis à *Anthracoystis panici-leucophaei*.

O isolado BSV2 possui potencial como agente de controle biológico contra capim-amargoso (*D. insularis*):

- A produção de esporídios do fungo é facilmente obtida em meio de cultura líquido.
- O fungo reduz parâmetros fisiológicos de crescimento das plantas de capim-amargoso até os 102 dias após a semeadura.
- O fungo coloniza sistemicamente as plantas de capim-amargoso e induz a formação de grande parte das panículas com Soros contendo teliósporos de *A. panici-leucophaei*, reduzindo consideravelmente a produção de sementes das plantas previamente tratadas.

5. REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, K.; SRINIVASAN, K. Sexuality in *Ustilago scitaminea* Syd. **Current Science**, v. 35, n. 23, p. 603-604, 1966 *apud* BENEVENUTO, Juliana et al. Molecular variability and genetic relationship among Brazilian strains of the sugarcane smut fungus. **Microbiology Letters**, v. 363, n. 24, p. fnw277, 2016. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw277>
- BANUETT, F.; HERSKOWITZ, I. Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 15, p. 5878-5882, 1989. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.15.5878>
- BENEVENUTO, J. et al. Molecular variability and genetic relationship among Brazilian strains of the sugarcane smut fungus. **Microbiology Letters**, v. 363, n. 24, p. fnw277, 2016. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw277>
- BOGUENA, T.; MEYER, S. E.; NELSON, D. L. Low temperature during infection limits *Ustilago bullata* (Ustilaginaceae, Ustilaginales) disease incidence on *Bromus tectorum* (Poaceae, Cyperales). **Biocontrol science and technology**, v. 17, n. 1, p. 33-52, 2007. <https://doi.org/10.1080/09583150600828577>
- CHARUDATTAN, R.. Biological control of weeds by means of plant pathogens: significance for integrated weed management in modern agro-ecology. **BioControl**, v. 46, n. 2, p. 229-260, 2001. <https://doi.org/10.1023/A:1011477531101>
- CIMMINO, A. et al. Fungal phytotoxins with potential herbicidal activity: chemical and biological characterization. **Natural product reports**, v. 32, n. 12, p. 1629-1653, 2015. <https://doi.org/10.1039/C5NP00081E>
- CORADIN, J. et al. Herbicidas aplicados em pré-emergência para o Controle de milho voluntário e capim-amargoso. **Revista Científica Rural**, v. 21, n. 3, p. 51-64, 2019. <https://doi.org/10.30945/rcr-v21i3.2785>
- CUNNINGTON, J. H.; VÁNKY, K.; SHIVAS, R. G. *Lundquistia* is a synonym of *Sporisorium* (Ustilaginomycetes). **Mycologia Balcanica**, v. 2, p. 95-100, 2005.
- DARRIBA, D. et al. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature methods**, v. 9, n. 8, p. 772-772, 2012. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- FARR, D.F., ROSSMAN, A.Y. Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Retrieved January 4, 2022. Disponível em: <<https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>>
- FISCHER, G. W. et al. Biology and control of the smut fungi. **Biology and control of the smut fungi.**, 1957 *apud* JOHNSON, D. A.; BAUDOIN, A. B.. Mode of infection and factors

affecting disease incidence of loose smut of crabgrass. **Biological Control**, v. 10, n. 2, p. 92-97, 1997. <https://doi.org/10.1006/bcon.1997.0555>

GALON, L. et al. Biological weed management-a short review. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 15, n. 1, p. 116-125, 2016. <https://doi.org/10.7824/rbh.v15i1.452>

GASSÓ, M. M. A.; LOVISOLO, M.; PERELLÓ, A.. Effects of loose kernel smut caused by *Sporisorium cruentum* on rhizomes of *Sorghum halepense*. **Journal of Plant Protection Research**, 2017. <https://doi.org/10.1515/jppr-2017-0009>

GEMELLI, A. et al. Aspectos da biologia de *Digitaria insularis* resistente ao glyphosate e implicações para o seu controle. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 11, n. 2, p. 231-240, 2012. <https://doi.org/10.7824/rbh.v11i2.186>

GOMES, F.M. et al.. Efeito Alelopático da Fitomassa de *Lipinus angustifolius* (L.) sobre a germinação e o desenvolvimento inicial de *Zea mays* (L.) e *Bidens pilosa* (L.). *Revista Brasileira de Agroecologia*, v.8, n.1, p.48-56, 2013.

GONÇALVES, R. C.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Armazenamento de microrganismos em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (ed.). *Métodos em Fitopatologia*. Viçosa: Editora UFV, 2016.

HEPPERLE, D.. SeqAssem©. Win32–Version. A sequence analysis tool contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences, 2004. Disponível em: <<http://www.sequentix.de>>.

JOHNSON, D. A.; BAUDOIN, A. B.. Mode of infection and factors affecting disease incidence of loose smut of crabgrass. **Biological Control**, v. 10, n. 2, p. 92-97, 1997. <https://doi.org/10.1006/bcon.1997.0555>

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. *Plantas infestantes e nocivas*. 2.ed. São Paulo: BASF. Tomo I. 825 p., 1997.

KLAIC, R. et al. An overview regarding bioherbicide and their production methods by fermentation. **Fungal Biomolecules**. 1ed.: John Wiley & Sons, Ltda, p. 183-199, 2015. <https://doi.org/10.1002/9781118958308.ch14>

KUMAR, S. et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular biology and evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547, 2018. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

MASSION, C. L.; LINDOW, S. E. Effects of *Sphacelotheca holci* infection on morphology and competitiveness of johnsongrass (*Sorghum halepense*). **Weed Science**, v. 34, n. 6, p. 883-888, 1986. <https://doi.org/10.1017/S0043174500068041>

MCTAGGART, A. R. et al. Soral synapomorphies are significant for the systematics of the Ustilago-Sporisorium-Macalpinomyces complex (Ustilaginaceae). **Persoonia-Molecular**

Phylogeny and Evolution of Fungi, v. 29, n. 1, p. 63-77, 2012. <https://doi.org/10.3767/003158512X660562>

MENDONÇA, G. S. et al. Ecophysiology of seed germination in *Digitaria insularis* ((L.) Fedde). **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, n. 4, p. 823-832, 2014. <https://doi.org/10.1590/S1806-66902014000400021>

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T.. The CIPRES science gateway: a community resource for phylogenetic analyses. In: **Proceedings of the 2011 TeraGrid Conference: extreme digital discovery**. p. 1-8, 2011. <https://doi.org/10.1145/2016741.2016785>

MILLHOLLON, R.. Loose kernel smut for biocontrol of *Sorghum halepense* in *Saccharum* sp. hybrids. **Weed Science**, v. 48, n. 5, p. 645-652, 2000. [https://doi.org/10.1614/0043-1745\(2000\)048\[0645:LKSFBO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1614/0043-1745(2000)048[0645:LKSFBO]2.0.CO;2)

MONDO, V. H. V. et al. Efeitos da luz e temperatura na germinação de sementes de quatro espécies de plantas daninhas do gênero *Digitaria*. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, p. 131-137, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222010000100015>

OVEJERO, R. F. L. et al. Frequency and dispersal of glyphosate-resistant sourgrass (*Digitaria insularis*) populations across Brazilian agricultural production areas. **Weed Science**, v. 65, n. 2, p. 285-294, 2017. <https://doi.org/10.1017/wsc.2016.31>

PETERSON, M. A. et al. The challenge of herbicide resistance around the world: a current summary. **Pest management science**, v. 74, n. 10, p. 2246-2259, 2018. <https://doi.org/10.1002/ps.4821>

PIĄTEK, M.. *Sporisorium kenyanum*, a new smut fungus with long twisted sori on *Setaria pallide-fusca* in Kenya. **Polish Botanical Journal**, v. 51, n. 2, p. 159-164, 2006.

PIĄTEK, M.; LUTZ, M.; YOROU, N. S. A molecular phylogenetic framework for *Anthracocystis* (Ustilaginales), including five new combinations (inter alia for the asexual *Pseudozyma flocculosa*), and description of *Anthracocystis grodzinskae* sp. nov. **Mycological Progress**, v. 14, n. 10, p. 1-15, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11557-015-1114-3>

POSADA, D.; BUCKLEY, T. R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. **Systematic biology**, v. 53, n. 5, p. 793-808, 2004. <https://doi.org/10.1080/10635150490522304>

RAMBAUT, A. FigTree 1.2.2, 2009. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

SANTIAGO, R. et al. Changes in cinnamyl alcohol dehydrogenase activities from sugarcane cultivars inoculated with *Sporisorium scitamineum* sporidia. **Physiologia Plantarum**, v. 145, n. 2, p. 245-259, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01577.x>

SAXENA, S.; KUMAR, M. Evaluation of *Alternaria alternata* ITCC4896 for use as mycoherbicide to control *Parthenium hysterophorus*. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 43, n. 12, p. 1160-1164, 2010. <https://doi.org/10.1080/03235400802343825>

SMITH, M. C.; REEDER, R. H.; THOMAS, M. B. A model to determine the potential for biological control of *Rottboellia cochinchinensis* with the head smut *Sporisorium ophiuri*. **Journal of Applied Ecology**, p. 388-398, 1997. <https://doi.org/10.2307/2404884>

SPECIES FUNGORUM. Disponível em:
<<http://www.speciesfungorum.org/Names/SynSpecies.asp?RecordID=801662>>

STOLL, M. et al. Molecular phylogeny of *Ustilago* and *Sporisorium* species (Basidiomycota, Ustilaginales) based on internal transcribed spacer (ITS) sequences. **Canadian Journal of Botany**, v. 81, n. 9, p. 976-984, 2003. <https://doi.org/10.1139/b03-094>

TAKANO, H. K. et al. Trp2027Cys mutation evolves in *Digitaria insularis* with cross-resistance to ACCase inhibitors. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 164, p. 1-6, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.12.011>

TIMOSSI, P. C. Manejo de rebrotes de *Digitaria insularis* no plantio direto de milho. **Planta Daninha**, v. 27, p. 175-179, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582009000100022>

VÁNKY, K. New smut fungi (Ustilaginomycetes) from Mexico, and the genus *Lundquistia*. **Fungal Diversity**, v. 17, p. 159-190, 2004.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>

CAPÍTULO II

Microdochium maculosum A. P. de Souza, B.W. Ferreira, R.W. Barreto & B. S. Vieira, *sp.*

nov.



Microdochium maculosum A. P. de Souza, B.W. Ferreira, R.W. Barreto & B. S. Vieira, *sp. nov.*

Etymology. Referring to leaf spots caused by the fungus.

Classification — Microdochiaceae, Xylariales, Sordariomycetes.

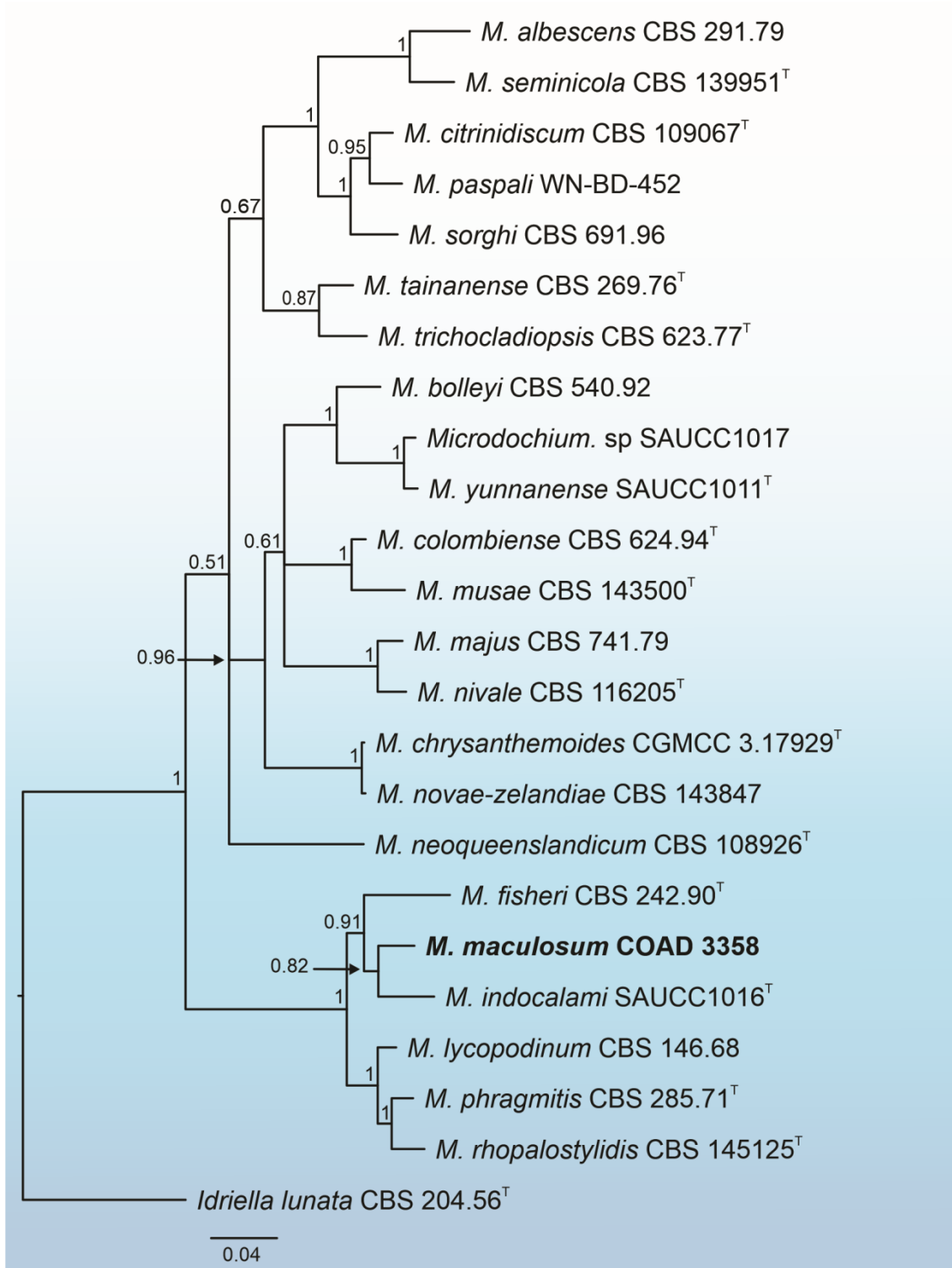
Lesion on living leaves, starting as small necrotic dots, becoming irregular, 5–50 mm diam, light brown, with dark brown margins, surrounded by a yellow halo, coalescing and leading to extensive leaf blight. *Colonies* amphigenous. Mycelium superficial and immersed; hyphae hyaline to pale brown, branched, septate, 1–4 µm diam. *Conidiophores* long and slender, sometimes reduced to conidiogenous cells borne directly from the hyphae. *Conidiogenous cells* terminal or intercalary, holoblastic, mono- or polyblastic, cylindrical, denticulate, raduliform, occasionally sympodial, 7–39 × 1–3 µm, hyaline, smooth. *Conidia* fusiform to allantoid, straight or curved, 6–15 × 2–4 µm, 1–3-septate, hyaline, occasionally curved at the tip, base tapering to a protuberant hilum, 1–2 × 1–2 µm. Sexual morph not observed. Chlamydospores not observed.

Cultural characteristics — Fast-growing –55 mm in oatmeal-agar (OA) and 50 mm in malt extract-agar (MEA), after 7 d at 25 °C. Colony flat, edge entire, aerial mycelium dense and felty; in OA, center olivaceous tending to grey olivaceous and white periphery; in MEA, center flesh, rosy buff margins, reverse rosy buff. Sporulation abundant in OA.

Typus. BRAZIL, Minas Gerais, Viçosa, Floricultura, campus of the Universidade Federal de Viçosa, on living leaves of *Digitaria insularis*, 21th May 2020, R. W. Barreto (holotype VIC 47532, culture ex-type COAD 3358, ITS, LSU and *RPB2* sequences GenBank OK966953, OK966954 and OL310501, MycoBank MB841887).

Notes – Based on a megablast search of NCBI's GenBank nucleotide database, the LSU and *RPB2* sequences of *Microdochium maculosum* showed a similarity of 98.65% and

90.54% respectively, with the sequences of *Microdochium rhopalostylidis* (CBS 145125, GenBank MK442532 and MK442667); whereas its ITS sequence was 98.61% similar to that of *Microdochium* sp. (JP103, GenBank AB255278). The phylogenetic reconstruction using ITS, LSU and RPB2 of different accepted *Microdochium* species, including the type *M. phragmitis*, showed that the new species was located in an highly-supported clade together with *M. indocalami*, *M. fisheri*, *M. lycopodium*, *M. phragmitis*, and *M. rhopalostylidis*, being closely related with the former two species. However, *M. maculosum* has clear morphological differences distinguishing it from *M. fisheri* and *M. indocalami*. *Microdochium fisheri* has fusiform, obovoid, subpyriform to clavate ($7.0\text{--}12.0 \times 3.0\text{--}4.0 \mu\text{m}$, 0–1-septate) conidia (Hernández-Restrepo et al. 2016), *M. indocalami* has conidia which are cylindrical, clavate to obovoid ($3.5\text{--}5.5 \mu\text{m}$ diam), without a protuberant hilum (Huang et al. 2020). On the other hand the new species *M. maculosum* has fusiform to allantoid conidia ($6.0\text{--}15.0 \times 2.0\text{--}4.0 \mu\text{m}$, 1–3-septa) which bear protuberant hila; *Microdochium fisheri* have been reported only from *Oryza sativa* from India and the UK, and *M. indocalami* have been reported only from *Indocalamus longiauritus* from China (Farr & Rossman 2021). No species of *Microdochium* have ever been reported on members of *Digitaria* prior to the present record.



Bayesian Tree inferred from the combined datasets of ITS, LSU and *RPB2* sequences from species belonging to the genus *Microdochium*, including the specimen of *Microdochium maculosum* obtained in this study (indicated in **bold**). Bayesian probabilities are given at each node. The tree is rooted to *Idriella lunata* CBS 204.56.

Adriany P. de Souza, Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia, Universidade Federal de
Uberlândia;

Monte Carmelo, 38500-000, MG, Brazil; e-mail: adrianypena@ufu.br

Bruno W. Ferreira, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa,
36570-900, MG, Brazil; e-mail: bruno.wesley@ufv.br

Robert W. Barreto, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa,
Viçosa, 36570-900, MG, Brazil; e-mail: rbarreto@ufv.br

Bruno S. Vieira, Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia, Universidade Federal de
Uberlândia;

Monte Carmelo, 38500-000, MG, Brazil; e-mail: brunovieira@ufu.br

Colour illustrations: *Microdochium macullosum* causing leaf spots in *Digitaria insularis*.
Conidiophores, with raduliform conidiogenous cells. Fusiform to allantoid conidia. Colonies
in OA and MEA media. Scale bars = 10 µm.

References:

Farr DF, Rossman, AY. 2021. Fungal databases, systematic mycology and microbiology
laboratory, ARS, USDA. Retrieved September 20, 2021, from <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>

Hernández-Restrepo M, Groenewald JZ, Crous PW, et al. 2016. Taxonomic and phylogenetic
re-evaluation of *Microdochium*, *Monographella* and *Idriella*. *Persoonia: Molecular
Phylogeny and Evolution of Fungi* 36: 57. <https://doi.org/10.3767/003158516X688676>

Huang S, et al. 2020. Two new species of *Microdochium* from *Indocalamus longiauritus* in
south-western China. *MycKeys* 72: 93. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.72.55445>