

JULIANA FONSECA ALVES

Anthracocystis panici-leucophaei E *Bipolaris yamadae* **COMO AGENTES DE
BIOCONTROLE PARA O CAPIM-AMARGOSO (*Digitaria insularis*)**

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

Coorientadora:

Dr.^a. Eliane Mayumi Inokuti

MONTE CARMELO/MG

2023

JULIANA FONSECA ALVES

Anthracocystis panici-leucophaei E *Bipolaris yamadae* **COMO AGENTES DE BIOCONTROLE PARA O CAPIM-AMARGOSO** (*Digitaria insularis*)

Dissertação aprovada pelo 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 31 de março de 2023.

Banca examinadora:

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

Prof^a Dr^a. Vanessa Andaló Mendes de Carvalho - Instituto de Ciências Agrárias (UFU)

Dr^a. Thaisa Ferreira da Nóbrega – Empresa Ouro Fino

MONTE CARMELO/MG

2023

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

A474 2023	<p>Alves, Juliana Fonseca, 1983- Anthracocystis panici-leucophaei e Bipolaris yamadae como agentes de biocontrole para capim-amargoso (Digitaria insularis) [recurso eletrônico] / Juliana Fonseca Alves. - 2023.</p> <p>Orientador: Bruno Sérgio Vieira. Coorientadora: Eliane Mayumi Inokuti. 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.2023.193 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Agronomia. I. Vieira, Bruno Sérgio, 1978-, (Orient.). II. Inokuti, Eliane Mayumi, 1983-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Agricultura e Informações Geoespaciais. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 631</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Agricultura e Informações Geoespaciais				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico				
Data:	31/03/2023	Hora de início:	08:00	Hora de encerramento:	12:30
Matrícula do Discente:	32122AIG008				
Nome do Discente:	Juliana Fonseca Alves				
Título do Trabalho:	<i>Anthracozytis panici-leucophaei</i> e <i>Bipolaris yamadai</i> como agentes de biocontrole para o capim-amargoso (<i>Digitaria insularis</i>)				
Área de concentração:	Informações geoespaciais e tecnologias aplicadas à produção agrícola				
Linha de pesquisa:	Sistemas integrados de produção vegetal				

Reuniu-se na sala virtual Link: <https://meet.google.com/nwz-rsgq-apy> a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Agricultura e Informações Geoespaciais, assim composta: Dra. Vanessa Andalo Mendes de Carvalho (UFU), Dra. Thaisa Ferreira da Nóbrega (Ourofino Agrociência), Dr. Bruno Sérgio Vieira (UFU) – orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. : Bruno Sérgio Vieira, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu a Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do 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 31/03/2023, às 13:59, 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 Vanessa Andalo Mendes de Carvalho, Professor(a) do Magistério Superior, em 31/03/2023, às 14:32, 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 Thaisa Ferreira da Nóbrega, Usuário Externo, em 03/04/2023, às 22:17, 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 4385407 e o código CRC 0527E194.

Dedico

*A Deus, aos meus pais, às minhas filhas, aos meus
irmãos e a todos que colaboraram com este trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus Pai Todo Poderoso pela minha vida, por essa oportunidade e pelo cuidado comigo a cada segundo dessa jornada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Bruno Sérgio Vieira, por aquela ligação que recebi dele falando da oportunidade do mestrado e que mudou minha vida. Pela orientação, dedicação, ensinamentos, paciência e amizade.

A Koppert do Brasil Holding Ltda, pelo apoio e incentivo à pesquisa no Brasil.

Às minhas filhas, Gabriela e Laura, que sofreram muito com minha ausência, mas que me enchiam de abraços quentinhos e beijos sempre que eu chegava da estrada suja e cansada. Isso me deu forças para continuar.

À minha mãe Gleide, por estar ao meu lado para o que der e vier, desde a concepção até hoje, e por cuidar das minhas filhas na minha ausência.

Ao meu pai Oscar, por sempre me incentivar em tudo que pretendo fazer e sempre me ajudar mesmo quando não tem condições.

Ao meu irmão Leydson, pelo apoio e incentivo de sempre e por toda ajuda que constantemente deu para mim, nossa mãe e minhas filhas.

Ao meu irmão Daniel, por estar sempre presente para nós como um ponto de apoio e ajuda.

Às minhas cunhadas Dayane e Ingrid e aos meus sobrinhos Ana Clara, Leonardo e Matheus, por estarem sempre presentes.

Ao grupo de pesquisa do LAMIF, em especial, ao Fernando, a Cláudia, a Thaisa, ao Bruno Wesley, a Jaira, a Ana Luíza, a Mayumi e ao Thúlio, por todas as contribuições e amizade.

Às minhas parceiras do Cras, fundamentais nesse caminho: Sônia, Andréia, Lauriane e Bruna.

À minha tia Orides e amigas Livia e Glória, pelo apoio e grande ajuda durante esse ano.

Aos colegas Ana Carolina de Oliveira, Alessandro Aguilar e Laura Moura que foram fundamentais para a conclusão das aulas e das disciplinas.

Ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Dr. Robert W. Barreto, que foram de grande importância na realização deste trabalho.

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

BIOGRAFIA

Juliana Fonseca Alves - nascida em 18 de setembro de 1983, na cidade de João Pessoa - PB, filha de Gleide Aparecida Fonseca Alves e Oscar Alves de Araújo. Foi diplomada em Agronomia, em março de 2008, pela Universidade Federal de Uberlândia. Durante a graduação, estagiou em uma horta comunitária auxiliando em sua condução e teve como título do Trabalho de Conclusão de Curso “Translocação de Co e Mo aplicados em diferentes épocas na cultura da soja”. Em maio de 2019, especializou-se em Biotecnologia e Bioprocessos na Universidade Estadual de Maringá – PR. Em julho de 2021, iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Informações Geoespaciais, na linha de pesquisa Sistemas Integrados de Produção Vegetal da Universidade Federal de Uberlândia – Campus Monte Carmelo – MG, onde desenvolveu o projeto de dissertação “*Anthracocystis panici-leucophaei* e *Bipolaris yamadae* como agentes de biocontrole para o campim-amargoso *Digitaria insularis*”.

SUMÁRIO

	RESUMO	i
	ABSTRACT	ii
	INTRODUÇÃO GERAL	1
	CAPÍTULO I - POTENCIAL DE <i>Anthracocystis panici-leucophaei</i> PARA O CONTROLE DE <i>Digitaria insularis</i>	4
1	INTRODUÇÃO	5
2	MATERIAL E MÉTODOS	7
2.1	Coletas das amostras.....	7
2.2	Obtenção de culturas puras	8
2.3	Agressividade de 16 isolados de <i>Anthracocystis panici-leucophaei</i> no controle de <i>Digitaria insularis</i>	9
2.3.1	Obtenção de esporídios.....	9
2.4	Execução do experimento em condições controladas	9
2.5	Gama de hospedeiros de <i>Anthracocystis panici-leucophaei</i>	11
2.6	Efeito de pulverizações sucessivas de suspensões de esporídios de <i>Anthracocystis panici-leucophaei</i> em plantas recém-emergidas de capim-amargoso.....	11
2.7	Inoculação de teliósporos obtidos em placa de Petri em plantas recém-emergidas de <i>Digitaria insularis</i>	12
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
3.1	Avaliação da agressividade de 16 isolados de <i>Anthracocystis panici-leucophaei</i> no controle de <i>Digitaria insularis</i>	14
3.2	Avaliação da gama de hospedeiros de <i>Anthracocystis panici-leucophaei</i>	18
3.3	Avaliação do efeito de 2 aplicações sucessivas dos isolados 46, 47 e BSV2 de <i>Anthracocystis panici-leucophaei</i> em plantas recém-emergidas de capim-amargoso.....	19
3.4	Patogenicidade de teliósporos obtidos <i>in vitro</i> em plantas recém-emergidas de <i>Digitaria insularis</i>	23
4	CONCLUSÕES	25
	REFERÊNCIAS	26
	CAPÍTULO II	32
	CAPÍTULO III	37

RESUMO

As plantas infestantes constituem um dos principais problemas na agricultura mundial, pois competem com as culturas por nutrientes, água, luz e espaço, podendo também ser hospedeiras de pragas e doenças e exercerem efeitos alelopáticos sobre as plantas cultivadas. Uma das espécies de infestantes mais nocivas na agricultura brasileira é o capim-amargoso (*Digitaria insularis*), devido ao surgimento de biótipos resistentes ao glifosato e aos herbicidas inibidores de ACCase. O controle biológico torna-se, então, uma ferramenta importante para o manejo integrado desta planta daninha. *Anthracocystis panici-leucophaei* tem se mostrado um fungo promissor para o manejo dessa invasora, pois promove a inibição do crescimento das plantas de capim-amargoso e diminui de forma significativa a produção de suas sementes. Assim, objetivou-se avaliar a agressividade de 16 isolados de *A. panici-leucophaei* como potenciais agentes de biocontrole para o capim-amargoso, avaliar a gama de hospedeiros desta espécie, bem como desenvolver, utilizando a inteligência artificial, um modelo para identificação da inibição do crescimento de plantas de *D. insularis* causada pela infecção sistêmica do fungo, e identificar por meio de análises morfológicas e filogenéticas um isolado fúngico (COAD 3424), encontrado causando manchas foliares e queima em folhas de *D. insularis*. As coletas das plantas com sintomas de carvão aconteceram nos estados de Minas Gerais e Goiás. Para avaliar a agressividade de diferentes isolados de *A. panici-leucophaei*, foram obtidas culturas puras dos isolados em laboratório para a inoculação em plantas recém-emergidas de capim-amargoso. O isolado 46 deste fungo foi o mais agressivo entre os isolados testados. Para avaliação da especificidade, foram testadas as seguintes espécies: *Saccharum officinarum*, *Oryza sativa*, *Triticum spp*, *Sorghum bicolor*, *Zea mays*, *Pennisetum glaucum*, *Eleusine indica*, *Urochloa híbrida*, *Urochloa brizantha*, *Urochloa ruziziensis*, *Panicum maximum* e *Cynodon spp*. *Anthracocystis panici-leucophaei* foi específico à *D. insularis*. Para o desenvolvimento de um modelo para identificar o efeito da infecção sistêmica causada por este fungo, foram utilizados os algoritmos de inteligência artificial *Random Forest*, *Support Vector Machine* e *Multilayer Perceptron*. Foi possível criar um modelo para prever a inibição de crescimento de plantas de capim-amargoso inoculadas com esporos de *A. panici-leucophaei* e o algoritmo que obteve maior acurácia foi o *Random Forest*. O isolado fúngico (COAD 3424) foi identificado como *Bipolaris yamadae*, sendo o primeiro relato desse fungo em *D. insularis* no mundo.

Palavras-chave: Bioherbicida. Planta daninha. Controle Biológico. Carvão. Fungo necrotrófico. Taxonomia.

ABSTRACT

Weeds are one of the main problems in world agriculture because they compete with crops for nutrients, water, light and space, and can also host pests and diseases and exert allelopathic effects on cultivated plants. One of the most harmful weed species in Brazilian agriculture is bitter grass (*Digitaria insularis*) due to the emergence of biotypes resistant to glyphosate and ACCase-inhibiting herbicides. Biological control then becomes an important tool for the integrated management of this weed. *Anthracocystis panici-leucophaei* has shown to be a promising fungus for the management of this weed, as it inhibits the growth of bittergrass plants and significantly reduces its seed production. Thus, the objective of this work was to evaluate the aggressiveness of 16 isolates of *A. panici-leucophaei* as potential biocontrol agents for bittergrass, to evaluate the host range of this species, as well as to develop, using artificial intelligence, a model for identifying the inhibition of growth in *D. insularis* plants caused by systemic infection of the fungus, and to identify, through morphological and phylogenetic analysis, a fungal isolate (COAD 3424), found causing leaf spots and blight in *D. insularis* leaves. Plants with smut symptoms were collected in the states of Minas Gerais and Goiás. To evaluate the aggressiveness of different isolates of *A. panici-leucophaei*, pure cultures of the isolates were obtained in the laboratory for inoculation in newly emerged bittergrass plants. Isolate 46 of this fungus was the most aggressive among the tested isolates. To evaluate the specificity, the following species were tested: *Saccharum officinarum*, *Oryza sativa*, *Triticum spp*, *Sorghum bicolor*, *Zea mays*, *Pennisetum glaucum*, *Eleusine indica*, *Urochloa hybrida*, *Urochloa brizantha*, *Urochloa ruziziensis*, *Panicum maximum* and *Cynodon spp*. *Anthracocystis panici-leucophaei* was specific to *D. insularis*. For the development of a model to identify the effect of the systemic infection caused by this fungus, the artificial intelligence algorithms Random Forest, Support Vector Machine and Multilayer Perceptron were used. It was possible to create a model to predict the growth inhibition of bittergrass plants inoculated with spores of *A. panici-leucophaei* and the algorithm that obtained the highest accuracy was Random Forest. The fungal isolate (COAD 3424) was identified as *Bipolaris yamadae*, being the first report of this fungus in *D. insularis* in the world.

Keywords: Bioherbicide. Weed plant. Biological control. Smut. Necrotrophic fungus. Taxonomy.

INTRODUÇÃO GERAL

As plantas daninhas interferem negativamente no desenvolvimento das culturas, reduzindo sua produtividade e qualidade, pois competem por água, luz, CO₂ e nutrientes, podendo também exercerem efeitos alelopáticos sobre as plantas cultivadas (LORENZI, 2006), e, por vezes, são hospedeiras de pragas e patógenos (DALAZEN et al., 2016). Por isso, mundialmente elas representam um dos principais fatores que limitam a produtividade agrícola.

O manejo de espécies de plantas daninhas consiste na adoção de práticas que diminuam a infestação no campo e não necessariamente sua eliminação completa. A erradicação de plantas daninhas no campo dificilmente é alcançada nas grandes culturas. O patamar de controle de plantas daninhas alcançado em uma lavoura varia de acordo com a espécie daninha, com a cultura e com os métodos empregados, fazendo-se necessário a junção de dois ou mais métodos de manejo para se alcançar o nível satisfatório, constituindo, assim, um controle integrado (LORENZI, 2006).

Digitaria insularis (capim-amargoso) é uma das espécies mais nocivas economicamente para a agricultura brasileira (ZOBIOLE et al., 2016). É uma planta perene, herbácea, entouceirada, ereta, de 50-100 cm de altura, com as folhas um pouco ásperas, de 15-25 cm de comprimento e sua reprodução é por sementes e por rizomas curtos (LORENZI, 2006). Possui como centro de origem a América tropical e subtropical, podendo ser encontrada com frequência em diversos locais como pastagens, cafezais, pomares e em áreas ruderais, como beira de estradas e terrenos baldios (MACHADO et al., 2008; PYON et al., 1977).

Capim-amargoso é uma gramínea com metabolismo fotossintético do tipo C4 (KISSMANN e GROTH, 1997) e tem seu desenvolvimento inicial lento até 45 dias após a emergência (DAE-dias após a emergência). Dos 45 aos 105 DAE, o seu crescimento torna-se mais rápido, tendo um incremento relevante de matéria seca, emitindo sua inflorescência entre os 63 e 70 DAE (MACHADO et al., 2006). As sementes são os principais meios de dispersão para novas áreas, sendo uma espécie extremamente prolífica, pois é capaz de produzir até 40.000 sementes/planta/ano (TAKANO et al., 2020). Essas sementes são envolvidas por pelos, o que torna fácil sua dispersão por animais, insetos e pelo vento (GEMELLI et al., 2012), podendo germinar nas áreas sob uma faixa de temperatura de 15-35°C e grande faixa de intensidade luminosa, disseminando sua infestação (MENDONÇA et al., 2014).

A maior parte das plantas de *D. insularis* que infestam as culturas anuais na América do Sul são resistentes ao herbicida glifosato (OVEJERO et al., 2017). Isso se deve ao fato de que mais de 90% da área total de soja na América do Sul são cultivadas com variedades transgênicas de soja resistentes ao glifosato, sendo ele aplicado pelo menos três vezes por ano (PETERSON et al., 2018).

Na tentativa de controlar plantas de *D. insularis* resistentes ao glifosato nas lavouras de soja na América do Sul, estão sendo utilizados os herbicidas inibidores de ACCase (GEMELLI et al., 2012). O uso intenso dessa classe de herbicidas aumentou exponencialmente a pressão de seleção, tendo como resultado a confirmação da resistência aos herbicidas inibidores de ACCase em uma população de capim-amargoso no Brasil (TAKANO et al., 2020).

Diante do desafio da baixa quantidade de herbicidas químicos disponíveis para controlar esses biótipos resistentes, juntamente com o demorado e oneroso processo de desenvolver moléculas novas (MATZRAFI et al., 2015; RIAR et al., 2013), faz-se necessário a utilização de um manejo de forma integrada com diferentes métodos de controle, como selecionar novos agentes de controle que sejam mais seletivos e menos prejudiciais ao meio ambiente e ao homem (RASSAEIFAR et al., 2013).

Produtos biológicos comerciais têm se mostrado viáveis economicamente, seguros e não-patogênicos em organismos não-alvos. Quando são utilizados como uma ferramenta em programas de manejo integrado de plantas daninhas os micoherbicidas, podem diminuir significativamente o uso de herbicidas químicos convencionais (ANEJA et al., 2013).

Objetivando-se controlar espécies de plantas daninhas, alguns micoherbicidas já foram desenvolvidos e comercializados na América do Norte, como por exemplo, Collego® (recentemente LockDown™), à base de *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*, usado para o controle de *Aeschynomene virginica*; Devine®, à base de *Phytophthora palmivora* para usado para o controle de *Morrenia odorata*; Biomal®, utilizado para controle de *Malva pusila* (*Malva rotundifolia* L.) à base de *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* (FIGUEIREDO, 1995). Para controlar *Parkinsonia aculeata*, foi desenvolvido o produto Di-Bark® Parkinsonia, que é uma formulação à base dos fungos *Lasioidiplodia pseudotheobromae*, *Neoscytalidium novaehollandiae* e *Macrophomina phaseolina*, sendo registrado em 2018 e comercializado na Austrália (GALEA e GOULTER, 2013; MORIN, 2020). Inúmeros micoherbicidas com potencial comercial estão em estudo com o objetivo de controlar várias

espécies de plantas daninhas (TREICHEL e FORTE, 2016; MORIN, 2020). O Brasil não possui, até o presente momento, micoherbicidas ou bioherbicidas registrados e comercializados.

Um método de manejo possível e ainda explorado para *D. insularis* é o controle biológico, que consiste em suprimir ou estabilizar populações de capim-amargoso em níveis subeconômicos, utilizando-se dos seus inimigos naturais. Os fungos fitopatogênicos são inimigos naturais com grande potencial.

Anthracocystis panici-leucophae é um fungo promissor para o controle biológico de *D. insularis*, pois promove uma infecção sistêmica na planta de capim-amargoso e provoca inibição no seu crescimento e diminuição relevante na produção de sementes, causando sintomas típicos de carvão (SOUZA, 2022).

Os carvões são doenças caracterizadas pelo desenvolvimento de massas pulverulentas escuras na parte aérea das plantas. Essa estrutura, nomeada de chicote, é envolvida por uma película prateada e abriga uma massa escura constituída por estruturas reprodutivas (teliósporos) do fungo. Esse fato faz com que os carvões sejam fáceis de se identificar. São parasitas obrigatórios, convivendo por muito tempo com os hospedeiros antes de mostrar os sintomas. Esse patógeno afeta as plantas hospedeiras pela retirada de nutrientes e por desarranjos que causam no desenvolvimento dos meristemas e das sementes (KIMATI et al. 1997).

Como resultados obtidos durante estudos preliminares tenham indicado que *A. panici-leucophaei* é um potencial agente de biocontrole para o capim amargoso, a gama de hospedeiros dentro das populações de gramíneas e de espécies cultivadas precisa ser testada para uma maior segurança de um potencial produto micoherbicida (SOUZA, 2022).

A utilização da inteligência artificial na modelagem de dados é uma ferramenta importante na agricultura de precisão, pois pode ser utilizada para orientar as pesquisas e ajudar na tomada de decisões dos profissionais que estão atuando na área (CORRÊA, 2011). Os algoritmos podem ser utilizados para a criação desses modelos.

Diante do que foi exposto, o presente trabalho teve como objetivos avaliar a agressividade de isolados fúngicos de *A. panici-leucophae* coletados de plantas com sintomas típicos de carvão nos estados de Minas Gerais e Goiás; avaliar a sua gama de hospedeiros por meio de um teste de especificidade; e desenvolver modelos de validação da inibição de crescimento da planta de capim-amargoso infectada pelo fungo, utilizando algoritmos de inteligência artificial como *Random Forest*, *Support Vector Machine* e *Multilayer Perceptron*.

Um outro isolado fúngico (COAD 3424), potencial agente de biocontrole de *D. insularis*, foi coletado de plantas no estado de Minas Gerais e que tinham sintomas de manchas e queima foliar. Ele foi identificado preliminarmente como pertencente ao gênero *Bipolaris*, com isso outro objetivo do presente trabalho foi identificar por meio de análises morfológicas e filogenéticas o isolado COAD 3424.

CAPÍTULO I

POTENCIAL DE *Anthracocystis panici-leucophaei* PARA O CONTROLE DE *Digitaria insularis*

1. INTRODUÇÃO

A produtividade e o rendimento das culturas agrícolas sofrem influência de fatores abióticos (YAMASHITA et al., 2009) e também bióticos (SILVA et al., 2017), sobre formas diretas ou indiretas (PITELLI, 1987). Dentre os fatores bióticos, as plantas daninhas são de maior importância, por causa da elevada competição por água, luz e nutrientes (NERY, 2017).

Nos últimos anos, o controle químico tem sido o método mais utilizado no manejo de plantas daninhas nos cultivos agrícolas (SIQUEIRA, 2013). A utilização de forma intensiva de herbicidas com mesmo modo de ação contribui de forma contínua com a contaminação ambiental e seleção de populações de plantas daninhas resistentes (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2003).

Digitaria insularis (capim-amargoso) é uma das espécies de plantas daninhas de grande relevância econômica na agricultura brasileira (ZOBIOLE et al., 2016), pois seu manejo com herbicidas químicos é complexo devido a sua elevada produção de sementes, facilidade em sua dispersão, juntamente com elevada taxa de germinação, o que culmina em um alto potencial de infestação (CARVALHO et al., 2011), e possui ainda populações resistentes aos principais herbicidas químicos comercializados (TAKANO et al., 2020).

É uma gramínea perene, herbácea, rizomatosa, entouceirada, de colmos estriados com cerca de 50 a 100 cm de altura, inflorescências na forma de panículas, sementes pequenas e pilosas (GRAZZIERO et al., 2015), apresentando um metabolismo do tipo C4 com um crescimento acelerado e elevada capacidade competitiva (LOPES et al., 2021)

Na América do Sul, o capim-amargoso tem sido notado como uma das principais plantas daninhas de culturas anuais e perenes, em especial na cultura da soja no Brasil, podendo reduzir em até 44% a sua produtividade (OVEJERO et al., 2017; GAZZIERO et al., 2020; KISSMANN et al., 1997).

Grande parte das populações de *D. insularis* presentes nas culturas na América do Sul são resistentes ao herbicida glifosato (OVEJERO et al., 2017), e mais recentemente foi confirmada uma população resistente aos herbicidas inibidores de ACCase no Brasil (TAKANO et al., 2020).

Desse modo, necessita-se de novos métodos para manejo desta planta daninha. Uma das alternativas ainda não exploradas para o capim-amargoso é o controle biológico, que consiste

na supressão ou estabilização das populações de plantas daninhas em níveis subeconômicos, através da utilização de inimigos naturais.

Alguns estudos mostram o potencial de fitopatógenos como agentes de controle biológico de plantas daninhas (CHARUDATTAN, 2001), em especial, fungos fitopatogênicos (KLAIC et al., 2015). Os microherbicidas utilizam fungos ou metabólitos fúngicos como uma opção de controle biológico de plantas daninhas (SAXENA e KUMAR, 2010).

Alguns fungos que causam sintoma de carvão vêm sendo estudados como promissores agentes de biocontrole para algumas plantas daninhas, como exemplo, *Sporisorium cruentum* no controle de *Sorghum halepense* (MILLHOLLON, 2000).

Um fungo com potencial para o biocontrole do capim-amargoso é *Anthracocystis panici-leucophaei*. Plantas infectadas por *A. panici-leucophaei* apresentam uma seca acentuada da parte aérea, redução no porte das plantas de capim-amargoso e formação de panículas cobertas com soros de teliósporos, que é a formação típica de “chicote”, que são sintomas típicos de carvão (SOUZA, 2022). Os fungos que causam carvão promovem uma infecção sistêmica e as plantas apresentam redução no crescimento e na produção de sementes.

Os carvões existem em todas as regiões do mundo onde se pratica agricultura com uma distribuição generalizada. Cereais como trigo, milho, cevada e aveia são frequentemente afetados por doenças do tipo carvão, assim como as culturas de cana-de-açúcar, cebola e cravo ornamental também são afetadas (KIMATI et al. 1997). Sendo assim, torna-se importante testar a especificidade de *A. panici-leucophaei* à *D. insularis*.

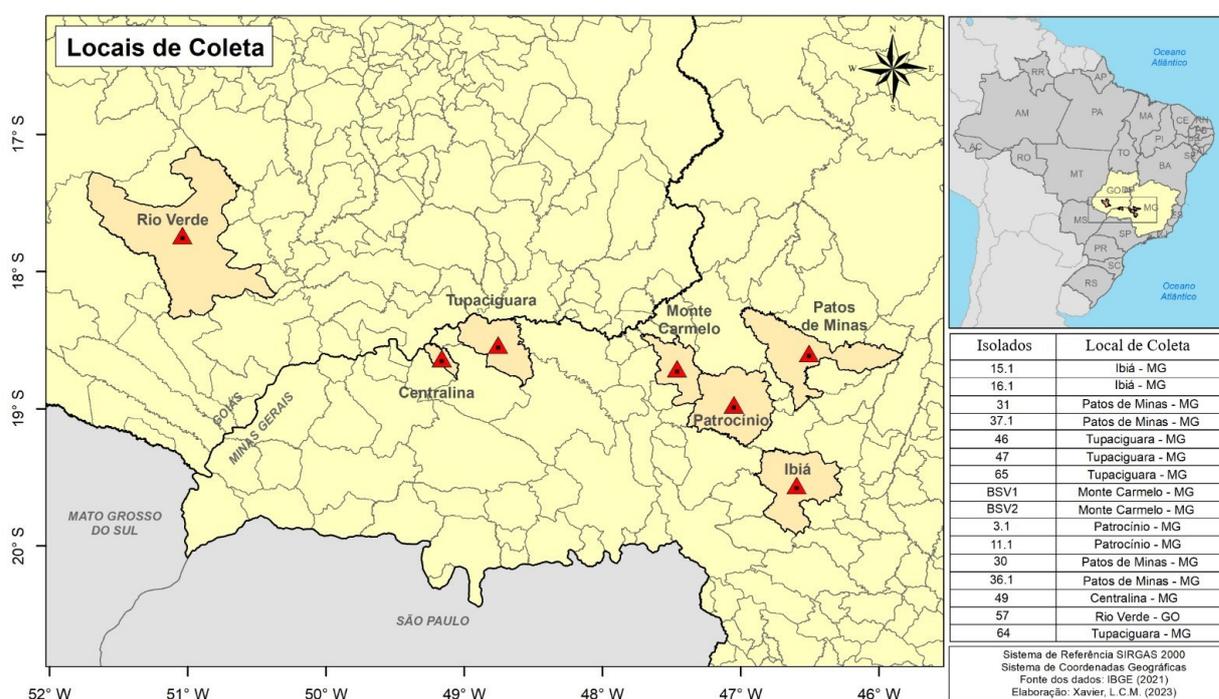
Visando aumentar o conhecimento sobre o patossistema *A. panici-leucophaei* x *D. insularis* e corroborar o potencial desse fungo como agente de biocontrole, o presente trabalho teve como objetivos: avaliar a agressividade de 16 isolados de *A. panici-leucophaei* sobre o capim-amargoso; avaliar o efeito de 2 aplicações sucessivas de *A. panici-leucophaei* sobre plantas de capim-amargoso; avaliar se teliósporos obtidos *in vitro* são infectivos e avaliar a gama de hospedeiros desse fungo.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coletas das amostras

As 14 amostras de plantas de *D. insularis*, com sintomas típicos de carvão, foram coletadas em áreas ruderais, nos estados de Minas Gerais e Goiás, em dezembro de 2021 e janeiro de 2022, como mostra o mapa na Figura 1.

FIGURA 1 – Mapa com os locais de coletas dos isolados de *Anthracoystis pacini-leucophaei*



Fonte: Xavier (2023).

Panículas de capim amargoso com soros de teliósporos foram encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da UFU (LAMIF) – Campus Monte Carmelo.

Dois isolados de *A. pacini-leucophaei* (BSV1 e BSV2) foram identificados anteriormente por biologia molecular e caracteres morfológicos (SOUZA, 2022) e já constavam na coleção do LAMIF, armazenados em tubos com solução de glicerol (10%) em ultrafreezer (-80 °C). Os outros 14 isolados possuem características morfológicas e de sintomas muito semelhantes aos isolados BSV1 e BSV2 (Tabela 1).

TABELA 1 - Códigos dos isolados, localidades das coletas, estado onde foram coletados e a data da coleta

Isolado	Local	Estado	Data
3.1	MG-223, Romaria	MG	dez/21
11.1	Patrocínio	MG	dez/21
15.1	Ibiá	MG	dez/21
16.1	Ibiá	MG	dez/21
30	Carmo do Paranaíba	MG	dez/21
31	BR-354 - Patos de Minas	MG	dez/21
	São João da Serra Negra,		
36.1	Patrocínio	MG	dez/21
37.1	Patrocínio	MG	dez/21
46	Tupaciguara	MG	jan/22
47	Tupaciguara	MG	jan/22
49	Centralina	MG	jan/22
57	Rio Verde	GO	jan/22
64	Rio Verde	GO	jan/22
65	Rio Verde	GO	jan/22
BSV 1	Monte Carmelo	MG	mai/21
BSV 2	Monte Carmelo	MG	jun/21

Fonte: A autora (2023).

2.2 Obtenção de culturas puras

Culturas puras de *A. pacini-leucophaei* foram obtidas a partir do semeio dos teliósporos coletados de panículas de *D. insularis* infectadas em placas de Petri contendo o meio de cultura CVA (caldo de vegetais ágar) (PEREIRA et al., 2003).

As placas de Petri foram monitoradas a cada 2h, e os teliósporos germinados foram transferidos individualmente para novas placas de Petri contendo CVA para obtenção de culturas puras. As placas ficaram incubadas em câmara climatizada tipo B.O.D. a 25°C com

fotoperíodo de 12 horas, a fim de se observar a formação de colônias leveduriformes contendo esporídios do fungo.

Os isolados foram mantidos em tubos de ensaio com meio de cultura BCA (batata cenoura ágar) (20 g/L de batata; 20 g/L de cenoura; 20g/L de ágar) inclinados para conservação a médio prazo em geladeira a 5 °C, e na ocasião da execução dos experimentos, foram repicados dos tubos para placas de Petri contendo o meio de cultura CVA.

A conservação a longo prazo foi realizada por armazenamento em solução aquosa de glicerol a 10% em ultrafreezer a -80 °C (GONÇALVES et al., 2016).

2.3 Agressividade de 16 isolados de *Anthracoystis panici-leucophaei* a plantas recém-emergidas de *D. insularis*

2.3.1 Obtenção de esporídios

Fragmentos de 2 cm de diâmetro de colônias contendo cada isolado de *A. panici-leucophaei* crescido em CVA, separadamente, foram transferidos para Erlenmeyers com 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 a 150 rpm, durante 5 dias, no escuro, para multiplicação das células haploides levedura-like (esporídios) (BANUETT e HERSKOWITZ, 1989; SANTIAGO et al., 2012).

As suspensões de esporídios foram diluídas em água destilada no momento das inoculações e ajustadas para uma concentração de $1,0 \times 10^6$ esporídios/mL, com auxílio de uma câmara de Neubauer.

2.4 Execução do experimento em condições controladas

Sementes de *D. insularis* foram semeadas na superfície do solo de vasos de 0,5 L contendo solo + areia + esterco, autoclavados, na proporção de 1: 1: 1. Foram dispostas 20 sementes em cada vaso, cobrindo com plástico filme para a não dispersão das sementes, o qual foi retirado somente após a germinação (10 dias após a semeadura). Após a germinação, foi realizado um desbaste, mantendo-se 10 plântulas por vaso. Foram pulverizados nas plântulas de capim-amargoso com um par de folhas (10 DAS -dias após a semeadura) com o auxílio de um minipressurizador, 20 mL da suspensão contendo $1,0 \times 10^6$ esporídios mL⁻¹ + 0,01% de

Tween ® 20, de cada isolado de *A. panici-leucophaei*, separadamente, totalizando 16 isolados (Tabela 1).

O controle consistiu em vasos com plântulas recém-emergidas com duas folhas pulverizadas apenas com água esterilizada + 0,01% de Tween ® 20.

As plantas foram mantidas em condições de casa de vegetação durante 90 dias. Foram colocados plásticos umedecidos sobre os vasos (câmara úmida) logo após as inoculações (por 48 horas) e a superfície do solo foi irrigada diariamente.

As plantas foram avaliadas aos 90 dias após a semeadura com relação a sua altura, ao comprimento da raiz, ao diâmetro do caule, ao número de folhas, ao número de perfilhos, ao número de inflorescência, ao número de panículas com teliosporos e à biomassa seca de raízes e da parte aérea. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com 16 tratamentos (isolados) e mais um tratamento como testemunha, com cinco repetições para cada tratamento, sendo cada vaso considerado como uma repetição.

Foram coletados os teliosporos de todas as panículas de todos os tratamentos e armazenados secos e puros em tubos de Ependorff em ultrafreezer -80°C. Esses teliosporos permanecem viáveis após 5 meses de armazenagem, sendo mais um método de armazenamento do fungo.

Primeiramente, os valores obtidos a partir das variáveis analisadas foram testados quanto as pressuposições, em que a normalidade de resíduos foi verificada pelo teste Shapiro-Wilk ($p < 0,05$) e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett ($p < 0,05$). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, posteriormente, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). A comparação das médias dos tratamentos em relação ao controle foi realizada pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).

O programa estatístico utilizado foi o R versão 4.0.2, em que a ANOVA e o teste de homogeneidade das variâncias de Bartlett foram executados com os scripts desenvolvidos para o pacote de dados ExpDes.pt versão 1.2 (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2010), ao passo que o teste de normalidade de resíduos de Shapiro-Wilk foi executado utilizando scripts desenvolvidos para o pacote de dados Nortest versão 1.0-4 (GROSS; LIGGES, 2015). Por sua vez, para o teste de Dunnett, foi executado utilizando scripts desenvolvidos para o pacote multcomp versão 1.4-20 (HOTHORN et al., 2022).

2.5 Gama de hospedeiros de *A. panici-leucophaei*

O isolado BSV 2 foi inoculado em espécies de gramíneas (Tabela 2). Essas plantas de diferentes espécies recém-emergidas (duas folhas) foram inoculadas com suspensão de esporídios na concentração de $1,0 \times 10^6$ esporídios/mL. As plântulas de três vasos de cada espécie foram pulverizadas com a suspensão de esporídios e plântulas de três vasos de cada espécie foram pulverizadas com água esterilizada + 0,01% de Tween® 20 para servirem como testemunhas. Sacos plásticos úmidos foram colocados sobre os vasos após as inoculações como câmaras úmidas por 48 horas. Após isso, foram retiradas as câmaras úmidas e os vasos permaneceram em casa de vegetação durante todo o experimento. As plantas foram avaliadas aos 90 DAS.

TABELA 2 – Espécies inoculadas com esporídios de *Anthracoystis panici-leucophaei*

Espécies
<i>Saccharum officinarum</i> - Cana
<i>Oryza sativa</i> - Arroz
<i>Triticum spp</i> - Trigo
<i>Sorghum bicolor</i> - Sorgo
<i>Zea mays</i> - Milho
<i>Pennisetum glaucum</i> - Milheto
<i>Eleusine indica</i>
<i>Urochloa híbrida</i> cv. Sabiá.
<i>Urochloa brizantha</i> cv. MG-4
<i>Urochloa brizantha</i> cv. MG-5 Vitória
<i>Urochloa brizantha</i> cv. Marandu
<i>Urochloa ruziziensis</i> cv Ruziziensis
<i>Urochloa brizantha</i>
<i>Urochloa</i> cv. Cayana
<i>Urochloa brizantha</i> cv. BRS Piatã
<i>Panicum maximum</i> cv. BRS ZURI
<i>Panicum maximum</i> cv. Massai

(continua)

Panicum maximum cv. Tanzânia

Panicum maximum cv. Mombaça

Panicum maximum cv. híbrida BRS Quênia

Cynodon spp. cv. Tifton 85

Fonte: A autora (2023).

2.6 Efeito de pulverizações sucessivas de suspensões de esporídios de *A. panici-leucophaei* em plantas recém-emergidas de capim-amargoso

Sementes de capim-amargoso foram distribuídas superficialmente em 21 vasos de 0,5 L contendo solo + areia + esterco, autoclavados, na proporção de 1: 1: 1. Foram dispostas 20 sementes em cada vaso, cobrindo com plástico filme para a não dispersão das sementes e retirado somente após a germinação. Após a germinação, foi realizado um desbaste, mantendo-se 10 plântulas por vaso.

Foram pulverizados nas plântulas de capim-amargoso com um par de folhas (10 dias após a semeadura - DAS) com o auxílio de um mini pressurizador, 20 mL da suspensão contendo $1,0 \times 10^6$ esporídios/mL + 0,01% de Tween[®] 20, de cada um dos isolados 46, 47 e BSV2 de *A. panici-leucophaei*, separadamente, em seis vasos para cada isolado. Após 17 dias, essa operação foi repetida apenas com três vasos para cada isolado (segunda pulverização).

As plantas foram mantidas em condições de casa de vegetação durante todo o período do experimento. Foram colocados plásticos umedecidos sobre os vasos (câmara úmida) logo após as inoculações (por 48 horas) e a superfície do solo foi irrigada diariamente.

As plantas foram avaliadas aos 70 dias após a semeadura com relação à altura, ao comprimento da raiz, ao diâmetro do caule, ao número de folhas, ao número de perfilhos, ao número de inflorescência, ao número de panículas com teliósporos e à biomassa seca de raízes e da parte aérea.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial $3 \times 2 + 1$, com três isolados (46, 47 e BSV2) e duas aplicações (1 aplicação; 2 aplicações).

Os dados obtidos foram analisados quanto às pressuposições, em que a normalidade de resíduos foi verificada pelo teste Shapiro-Wilk ($p < 0,05$), ao passo que a homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett ($p < 0,05$) para as características de AP, CR, NF, NP, MPA e

MR, e pelo teste de Levene para mediana ($p < 0,05$) para DC, carvão e inflorescência, visto que estes não atenderam à homocedasticidade por Bartlett. Os dados de DC, carvão e inflorescência foram transformados em $\sqrt{x}+0,5$. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, posteriormente, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). A comparação das médias dos tratamentos em relação a testemunha foi realizada pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).

O programa estatístico utilizado foi o R versão 4.0.2, em que a ANOVA foi executado com script desenvolvido para o pacote de dados ExpDes.pt versão 1.2 (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2010). A homocedasticidade pelo teste de Bartlett foi executada utilizando script desenvolvido para o pacote de dados Nortest versão 1.0-4 (GROSS; LIGGES, 2015) e o Levene para mediana com script do pacote car versão 3.1-1 (FOX et al., 2022). A normalidade de resíduos de Shapiro-Wilk foi executada utilizando script desenvolvido para o pacote de dados agricolae versão 1.3-5 (MENDIBURU, 2021). Por sua vez, para o teste de Dunnett, foi executado utilizando scripts desenvolvidos para o pacote multcomp versão 1.4-20 (HOTHORN et al., 2022).

2.7 Inoculação de teliósporos de *A. panici-leucophaei* obtidos *in vitro* em plantas recém-emergidas de *D. insularis*

A concentração de teliósporos obtidos *in vitro* foi calibrada para $4,5 \times 10^6$ teliósporos/mL com auxílio de uma câmara de Neubauer. Seis vasos contendo plântulas de capim-amargoso foram obtidos como descrito anteriormente. As plântulas de três vasos foram pulverizadas com a suspensão contendo $4,5 \times 10^6$ teliósporos/mL + 0,01% de Tween® 20 e as plântulas dos outros três vasos foram pulverizadas com água esterilizada + 0,01% de Tween® 20 (testemunha).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação da agressividade de 16 isolados de *A. panici-leucophaei* sobre *D. insularis*

Pôde-se constatar que a pulverização de esporídios do isolado 46 foi o tratamento que resultou na mais significativa redução da altura das plantas de capim-amargoso, ou seja, 45% de redução em relação à testemunha (Tabela 3).

Em relação à altura das plantas, os isolados BSV 2, 37-1 e 31 também diferiram estatisticamente da testemunha, resultando em redução da altura de plantas em 42%, 24% e 23%, respectivamente.

Todos os isolados apresentaram plantas com sintomas de carvão (chicote) nas inflorescências.

TABELA 3 – Avaliação da agressividade de isolados de *Anthracoystis panici-leucophaei* sobre *Digitaria insularis*

Tratamento	AP	CR	DC	NF	NP
	cm		mm p	folhas planta ⁻¹	perfilhos planta ⁻¹
11-1	41,11 b*	30,77 c	1,75 b	4.94 a	0.52 a
30	45,29 b	23,35 b	1,76 b	7.00 a	1.08 a
16-1	55,24 c	30,45 c	2,08 b	10.22 b	1.94 b
3-1	45,13 b	30,95 c	2,32 b	8.30 a	1.52 b
36-1	37,86 b	27,94 c	1,90 b	8.52 a	1.92 b
BSV1	59,61 c	24,41 b	2,21 b	¹ 12.66 b	2.28 b
15-1	40,62 b	24,96 b	2,01 b	10.60 b	¹ 2.52 b
31	34,09 a	25,75 b	¹ 1,15 a	7.26 a	0.56 a
49	41,01 b	22,25 b	¹ 1,14 a	9.62 b	1.34 a
65	45,57 b	33,03 c	2,18 b	8.46 a	1.90 b
64	39,11 b	29,66 c	1,68 a	7.56 a	1.46 b
47	40,55 b	29,81 c	1,56 a	8.62 a	1.30 a
46	24,72 a	¹ 11,36 a	¹ 1,21 a	5.12 a	1.72 b
BSV2	26,01 a	29,04c	1,56 a	6.50 a	1.14 a
37-1	34,36 a	22,10 b	¹ 1,42 a	7.52 a	0.54 a

57	44,29 b	23,43 b	1,84 b	7.34 a	0.84 a (continua)
Testemunha ¹	44,58 b	29,02 c	2,26 b	6.78 a	1.14 a
CV (%)	26,11	18,21	21,47	25,76	45,60
Normalidade ²	0,99 ^{ns}	0,98 ^{ns}	0,99 ^{ns}	0,99 ^{ns}	0,97 ^{ns}
Homogeneidade ³	19,55 ^{ns}	20,83 ^{ns}	0,82 ^{ns}	23,92 ^{ns}	16,50 ^{ns}

Fonte: A autora (2023).

*Médias seguidas por letras distintas na coluna se diferem pelo teste de agrupamento de Scott-Knott ($p < 0,05$).

¹Tratamento se difere da testemunha pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$). ²Valor W do teste de Normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$). ³Valor do Qui-quadrado do teste de homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett ($p < 0,05$). ⁴Probabilidade do teste de homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene para mediana ($p < 0,05$). ^{ns}Não significativo. AP – Altura de planta; CR-Comprimento de raiz; DC- diâmetro de caule; NF-número de folhas; NP- número de perfilhos.

O isolado 46 de *A. panici-leucophaei* reduziu o comprimento das raízes de *D. insularis* em 61% em relação à testemunha (Tabela 3).

As plantas dos tratamentos com o isolado 46, 37-1, 31 e 49 apresentaram as maiores reduções para diâmetro de caule: 47%, 38%, 51% e 50% respectivamente. Já em relação ao número de folhas, a redução foi maior nos tratamentos 11-1 e 46, sendo de 27,13% e 24,49% respectivamente, em relação à testemunha.

O número de perfilhos do tratamento 15-1 foi superior a todos os demais, incluindo a testemunha (Tabela 3). Fungos que causam sintomas de carvão podem induzir, além da presença do chicote, plantas com outros sintomas como subdesenvolvimento, perfilhamento excessivo e de forma mais rara a morte da planta (KIMATI et al. 1997).

Gassó et al. (2017) demonstraram que plantas de *Sorghum halepense* na fase reprodutiva, com 18 a 25 dias após a inoculação de *Sporisorium cruentum*, desenvolveram múltiplas gemas (entre 3 a 7 gemas) com origem em um nó comum, que originaram pequenas panículas infectadas ou estéreis; sintoma típico da infecção por *S. cruentum*.

Todos os tratamentos apresentaram número de perfilhos com inflorescência desenvolvida inferiores a testemunha, exceto os tratamentos BSV1 e 3-1 (Tabela 4).

Os tratamentos 46 e 31 reduziram em 86% e 71%, respectivamente, o número de perfilhos com inflorescência, mostrando o grande potencial desses isolados na redução de produção de sementes das plantas inoculadas (Tabela 4).

TABELA 4 – Avaliação da massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), panículas com carvão e panículas com inflorescência de *Digitaria insularis* inoculadas com os isolados de *Anthracoystis panici-leucophaei*

Tratamento	MSPA	MSR	Carvão	Inflorescência
	g planta ⁻¹		Carvão planta ⁻¹	Inflorescência planta ⁻¹
11-1	¹ 0,4701 a*	0,1310 a	0,24 c	0,34 a
30	¹ 0,7772 a	0,1386 a	0,06 d	0,94 b
16-1	0,9890 b	0,2058 a	¹ 0,66 b	0,76 b
3-1	1,1316 b	0,3302 b	¹ 0,34 c	0,94 b
36-1	0,7848 a	0,2545 b	¹ 0,90 d	0,40 a
BSV1	2,0834 c	0,3914 b	0,04 d	0,92 b
15-1	1,0352 b	0,2434 a	¹ 0,70 b	0,54 b
31	¹ 0,3944 a	0,1137 a	0,18 c	0,26 a
49	1,0904 b	0,1999 a	¹ 1,46 a	0,48 a
65	0,8700 b	0,2650 b	¹ 0,30 c	0,42 a
64	1,5536 c	0,5042 b	¹ 1,36 a	0,82 b
47	¹ 0,3905 a	0,1602 a	¹ 0,74 b	0,34 a
46	¹ 0,3053 a	0,1640 a	¹ 0,26 c	¹ 0,10 a
BSV2	¹ 0,4476 a	0,1228 a	¹ 0,42 b	0,24 a
37-1	¹ 0,5966 a	0,2000 a	¹ 0,50 b	0,28 a
57	1,3462 b	0,2854 b	¹ 1,22 a	0,90 b
Testemunha ¹	1,6156 c	0,2666 b	0,00 d	0,68 b
CV (%)	24,20	26,23	22,07	25,57
Normalidade ²	0,97 ^{ns}	0,98 ^{ns}	0,98 ^{ns}	9,97 ^{ns}
Homogeneidade	³ 21,58 ^{ns}	³ 20,32 ^{ns}	⁴ 0,74 ^{ns}	⁴ 0,70 ^{ns}

Fonte: A autora (2023).

*Médias seguidas por letras distintas na coluna se diferem pelo teste de agrupamento de Scott-Knott ($p < 0,05$).

¹Tratamento se difere da testemunha pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$). ²Valor W do teste de Normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$). ³Valor do Qui-quadrado do teste de homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett ($p < 0,05$). ⁴Probabilidade do teste de homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene para mediana. ^{ns}Não significativo. MSPA= matéria seca de parte aérea, MSR=matéria seca de raiz.

Notou-se que todos os tratamentos apresentaram panículas com sintomas de carvão (chicote), mas os tratamentos que se destacaram foram 57, 47, 64, 49, 15-1,16-1 e 36-1, manifestando panículas com soros contendo teliósporos de *A. panici-leucophaei* em maior quantidade (Tabela 4). Esse fato corrobora o potencial desse fungo em diminuir a quantidade de sementes em plantas de capim-amargoso.

A redução da produção de sementes é uma característica excelente no controle de plantas daninhas, sendo que essas sementes conseguem germinar em extensa faixa de temperatura e intensidade luminosa, aumentando expressivamente a disseminação da espécie (MENDONÇA et al., 2014). O capim-amargoso é muito prolífico, pois em condições normais produz até 40.000 sementes/planta/ano (TAKANO et al., 2020)

Os tratamentos com os isolados 46, 47, 31, BVS2, 11, 37-1 e 30 reduziram em 81,1%, 75,83%, 75,59%, 72,3%, 70,9%, 63,07% e 51,89% o peso da massa seca de parte aérea das plantas de capim-amargoso, respectivamente, em relação à testemunha.

Os tratamentos com os isolados 31, BSV2, 11-1, 30 e 46 apresentaram redução de 57,35%, 53,94% e 50,86%, 48,01% e 38,48% no peso da massa seca das raízes de plantas de capim-amargoso, respectivamente, em relação à testemunha.

Gassó et al. (2017) notaram que aconteceu uma redução de 43,6% do peso da massa seca dos rizomas de *Sorghum halepense* e de 67,3% no peso da massa seca da parte aérea de plantas inoculadas com esporídios de *Sporisorium cruentum* no final do ciclo da cultura.

O isolado 46 demonstrou a maior redução no peso da massa seca de parte aérea em relação à testemunha e o tratamento com o isolado 31 a maior redução do peso de matéria seca da raiz.

Os estudos que levam ao desenvolvimento de micoherbicidas comumente incluem, como uma das etapas, a seleção de isolados fúngicos com elevada agressividade (AULD, 1997), sendo que o isolado selecionado deve levar à alta severidade da doença na maioria, se não, em todas as plantas daninhas-alvo. Assim, a busca por isolados com maior nível de agressividade torna-se primordial.

Métodos de controle que afetam negativamente o desenvolvimento inicial das plantas daninhas ajudam na diminuição de futuras aplicações de herbicidas em pós-emergência, pois promovem condições mais benéficas para culturas de interesse, como soja e milho, para realizarem o fechamento do dossel, reduzindo, assim, perdas na produtividade por competição

com as plantas daninhas que estão menos desenvolvidas. A descoberta de agentes de controle em potencial e o desenvolvimento de bioherbicidas são de interesse social, cultural, ambiental (GOMES et al., 2013) e, primordialmente, agrônômico, por causa do aumento da possibilidade de se obter uma ferramenta eficaz no controle de plantas resistentes a herbicidas químicos, o que diminuiu impacto ambiental causado por eles (GALON et al., 2016).

Um elevado nível de virulência é uma característica fundamental de um agente de controle biológico eficaz (ZHANG E WATSON, 1997; CHARUDATTAN, 2010). O isolado 46 de *A. panici-leucophaei* foi o mais agressivo dentre os isolados testados.

3.2 Avaliação da gama de hospedeiros de *A. panici-leucophaei*

O isolado BSV2 de *A. panici-leucophaei* não foi capaz de infectar nenhuma das espécies inoculadas com seus esporídios. Desse modo, *A. panici-leucophaei* tem se mostrado um fungo fitopatogênico específico à *D. insularis*, sendo essa uma característica relevante em um agente de biocontrole, pois demonstra sua capacidade de controlar apenas a espécie alvo e não afetar as culturas.

Fungos causadores de carvão são patógenos que normalmente apresentam especificidade junto ao hospedeiro, sendo parasitas evoluídos e obrigatórios (KIMATI et al. 1997).

Para corroborar o potencial de *A. panici-leucophaei* como agente de biocontrole de *D. insularis*, é imprescindível avaliar sua especificidade. Johnson e Baudoin (1997) relataram que antes que um organismo patogênico seja utilizado como agente de biocontrole, sua gama de hospedeiros deve ser investigada para determinar o risco de infecção para plantas que não são alvo.

Milhollon (2000), em seus estudos sobre a gama de hospedeiros de *Sporisorium cruentum*, inoculou com teliósporos vários genótipos de *Sorghum bicolor* para verificar se eram susceptíveis a esse fungo que controla *Sorghum halepense*. Dezesete genótipos de sorgo testados não foram susceptíveis e dois genótipos foram susceptíveis. Já para variedades de sorgo utilizadas como forragem, 16 não foram susceptíveis, dois foram intermediárias e cinco susceptíveis. Com isso, conclui-se que esses genótipos têm um nível relativamente alto de resistência a esse fungo.

Nechet et al. (2006) avaliaram a gama de hospedeiros de *Bipolaris euphorbiae*, que é um agente de biocontrole de *Euphorbia heterophylla*. No teste foram inoculadas com conídios de *B. euphorbiae* 32 espécies de plantas e nenhuma demonstrou sintomas da doença.

3.3 Avaliação do efeito de 2 aplicações sucessivas dos isolados 46, 47 e BSV2 de *A. panici-leucophaei* em plantas recém-emergidas de capim-amargoso

Duas aplicações de esporídios de *A. panici-leucophaei*, com intervalo entre as pulverizações de 17 dias, reduziram, em média, independentemente do isolado, 48,71% o porte das plantas de capim-amargoso em relação à testemunha, ao passo que uma pulverização reduziu 32,96% em relação à testemunha, demonstrando que duas pulverizações independente do isolado potencializam o efeito do fungo (Tabela 5).

TABELA 5 – Efeito de duas pulverizações sucessivas de suspensões de esporídios de *Anthracoystis panici-leucophaei* sobre *Digitaria insularis*

Isolado	AP (cm planta ⁻¹)			CR (cm planta ⁻¹)		
	Aplicações		Média Geral	Aplicações		Média Geral
	1	2		1	2	
47	53,28	41,43 ¹	47,36 b*	30,37	26,93	28,65 b
BSV2	34,84 ¹	28,62 ¹	31,73 a	¹ 22,48	21,43 ¹	28,02 b
46	55,53	39,98 ¹	46,71 b	29,93	26,10	21,96 a
Média geral	47,89 B	36,64 A		27,59 A	24,82 A	
Testemunha ¹	71,43			31,82		
CV (%)	5,28			5,24		
Normalidade ²	0,95 ^{ns}			0,96 ^{ns}		
Homogeneidade ³	2,44 ^{ns}			4,10 ^{ns}		

Fonte: A autora (2023).

*Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna ou maiúsculas nas linhas se diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ¹Tratamento se difere da testemunha pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$). ²Valor W do teste de Normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$). ³Valor do Qui-quadrado do teste de homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett ($p < 0,05$). ^{ns}Não significativo. AP – Altura de planta e CR-Comprimento de raiz.

A pulverização com esporídios do isolado BSV2 resultou num melhor desempenho, reduzindo a altura das plantas de capim amargoso em 51,23% com uma aplicação e 59,93% com duas aplicações. Já os isolados 46 e 47 reduziram o porte das plantas de capim-amargoso em 22,26% e 25,41%, respectivamente, com uma aplicação e 44,03% e 42% respectivamente, com duas aplicações.

Para comprimento de raiz, duas aplicações de esporídios de *A. panici-leucophaei* reduziram, em média, independentemente do isolado, 12,67% com uma aplicação e 22% com duas aplicações em relação à testemunha. O isolado BSV2 se destacou, causando uma redução no comprimento das raízes de 29,35% com uma aplicação e 32,66% com duas aplicações em relação à testemunha (Tabela 6).

TABELA 6 - Efeito de duas pulverizações sucessivas de suspensões de esporídios de *Anthracoystis panici-leucophaei* sobre o diâmetro de caule (DC) de *Digitaria insularis*

Isolado	DC (mm planta ⁻¹)		Média geral
	Aplicações		
	1	2	
47	2,57	1,99	2,28 ab*
BSV2	1,74	1,11 ¹	1,43 a
46	2,75	2,51	2,63 b
Média geral	2,35 A	1,87 A	
Testemunha ¹	3,62		
CV (%)	87,00		
Normalidade ²	0,91 ^{ns}		
Homogeneidade ³	0,46 ^{ns}		

Fonte: A autora (2023).

*Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna ou maiúsculas nas linhas se diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ¹Tratamento se difere da testemunha pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$). ²Valor W do teste de Normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$). ³Probabilidade do teste de homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene para mediana ($p < 0,05$). ^{ns}Não significativo. DC- diâmetro de caule.

Para o diâmetro de caule, duas aplicações de esporídios de *A. panici-leucophaei* reduziram, em média, independentemente do isolado, em 48,34% o diâmetro do caule de plantas de capim-amargoso em relação à testemunha, ao passo que com uma aplicação reduziu

35,08% em relação à testemunha, demonstrando mais uma vez que duas aplicações, independentemente do isolado, potencializam o efeito inibitório do fungo sobre as plantas de capim-amargoso. Novamente, o isolado BSV2 se destacou quanto à inibição do diâmetro de caule das plantas, reduzindo esse parâmetro em 51,93% com uma aplicação e 69,34% com duas aplicações, em relação à testemunha (Tabela 7).

O número de folhas e de perfilhos não diferiram de forma significativa da testemunha, tanto para uma quanto para duas pulverizações (Tabela 7).

TABELA 7 - Efeito de duas pulverizações sucessivas de suspensões de esporídios dos isolados 47, BSV2 e 46 de *Anthracoystis panici-leucophaei* sobre número de folhas (NF) e número de perfilhos (NP) de *Digitaria insularis*

Isolado	NF (folhas planta ⁻¹)			NP (perfilhos planta ⁻¹)		
	Aplicações		Média	Aplicações		Média
	1	2	Geral	1	2	Geral
47	6,23	5,47	5,85 a*	0,63	0,47	0,55 a
BSV2	4,93	4,80	4,87 a	0,40	0,27	0,33 a
46	5,63	4,43	5,03 a	0,67	0,10	0,38 a
Média geral	5,60 A	4,90 A		0,57 A	0,28 A	
Testemunha ¹	4,87			0,57		
CV (%)	43,04			50,94		
Normalidade ²	0,95 ^{ns}			0,94 ^{ns}		
Homogeneidade ³	2,27 ^{ns}			3,31 ^{ns}		

Fonte: A autora (2023).

*Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna ou maiúsculas nas linhas se diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ¹Tratamento se difere da testemunha pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$). ²Valor W do teste de Normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$). ³Valor do Qui-quadrado do teste de homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett ($p < 0,05$). ^{ns}Não significativo. NF-número de folhas; NP- número de perfilhos.

Dois pulverizações com esporídios de *A. panici-leucophaei* reduziram, em média, independentemente do isolado, 78,07% da matéria seca da parte aérea das plantas de capim-amargoso em relação à testemunha, ao passo que com uma aplicação, reduziu 62,03% em relação à testemunha, constatando-se que duas aplicações do fungo, independentemente do isolado testado, aumentam o potencial infectivo sobre as plantas de capim-amargoso (Tabela

8). O isolado BSV2 resultou num efeito mais significativo, reduzindo a matéria seca da parte aérea das plantas de capim amargoso em 73,26% com uma aplicação e 83,42% com duas aplicações. Os isolados 46 e 47 reduziram a matéria seca de parte aérea das plantas de capim amargoso em 56,69% e 55,61%, respectivamente, com uma aplicação e 77,54% e 73,26% respectivamente, com duas aplicações (Tabela 8).

Duas aplicações de esporídios de *A. panici-leucophaei* reduziram, em média, independentemente do isolado, 64% de matéria seca de raiz de plantas de capim-amargoso em relação à testemunha, ao passo que com uma aplicação, reduziram-se 20% em relação à testemunha. O isolado BSV2 reduziu a matéria seca de raiz das plantas de capim-amargoso em 48% com uma aplicação e 76% com duas aplicações, em relação a testemunha (Tabela 8).

TABELA 8 - Efeito de duas pulverizações sucessivas de suspensões de esporídios de *Anthracoystis panici-leucophaei* sobre matéria seca de parte aérea (MPA) e matéria seca de raiz (MR) de *Digitaria insularis*

Isolado	MPA (g planta ⁻¹)			MR (g planta ⁻¹)		
	Aplicações		Média	Aplicações		Média
	1	2	Geral	1	2	Geral
47	0,83 ¹	0,50 ¹	0,67 a*	0,20	0,12	0,16 a
BSV2	0,50 ¹	0,31 ¹	0,40 a	0,13	0,06 ¹	0,09 a
46	0,81 ¹	0,42 ¹	0,62 a	0,25	0,09	0,17 a
Média geral	0,71 B	0,41 A		0,20 B	0,09 A	
Testemunha ¹	1,87			0,25		
CV (%)	53,21			80,12		
Normalidade ²	0,96 ^{ns}			0,95 ^{ns}		
Homogeneidade ³	2,67 ^{ns}			4,04 ^{ns}		

Fonte: A autora (2023).

*Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna ou maiúsculas nas linhas se diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ¹Tratamento se difere da testemunha pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$). ²Valor W do teste de Normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$). ³Valor do Qui-quadrado do teste de homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett ($p < 0,05$). ^{ns}Não significativo. MPA – matéria seca da parte aérea e MR – matéria seca da raiz.

O número de inflorescência do isolado BSV2 foi zero, diferindo de forma significativa da testemunha. Foi o tratamento em que houve formação de panículas com sintomas de carvão (Tabela 9).

Milhollon (2000) verificou que duas aplicações de teliósporos de *Sporisorium cruentum*, com um intervalo de 7 dias, aumentaram significativamente a infecção por carvão em plantas de *Sorghum halepense*.

TABELA 9 - Efeito de duas pulverizações sucessivas de suspensões de esporídios de *Anthracoystis panici-leucophaei* sobre número de inflorescência (NI) e número de inflorescência com carvão (NC) de *Digitaria insularis*

Isolado	NI (inflorescências planta ⁻¹)			NC (carvão planta ⁻¹)		
	Aplicações		Média Geral	Aplicações		Média Geral
	1	2		1	2	
47	0,17	0,17	0,17 b*	0,00	0,00	0,00 b
BSV2	0,00 ¹	0,00 ¹	0,00 a	0,03	0,13	0,08 a
46	0,13	0,10	0,12 ab	0,00	0,00	0,00 b
Média geral	0,10 A	0,09 A		0,01 A	0,04 A	
Testemunha ¹	0,43			0,00		
CV (%)	257,67			311,15		
Normalidade ²	0,93 ^{ns}			0,70 ⁴		
Homogeneidade ³	0,46 ^{ns}			0,15 ^{ns}		

Fonte: A autora (2023).

*Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna ou maiúsculas nas linhas se diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ¹Tratamento se difere da testemunha pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$). ²Valor W do teste de Normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$). ³Probabilidade do teste de homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene para mediana ($p < 0,05$). ⁴Significativo a 5% de probabilidade. ^{ns}Não significativo. NI – número de inflorescências e NC – número de panículas com carvão.

3.4 Patogenicidade de teliósporos obtidos *in vitro* em plantas recém-emergidas de *D. insularis*

Em placas de Petri com BDA (batata-dextrose-ágar), cultivadas com o isolado 47, notou-se a presença de uma massa escura, que através de observação microscópica, pode-se constatar a presença de teliósporos, sendo incomum de acontecer. Isso pode ter ocorrido porque

o fungo completou seu ciclo sexual *in vitro*, onde houve cruzamento com esporídio de outro isolado ou um auto-cruzamento. Procedeu-se então a inoculação desses teliósporos produzidos *in vitro* em plantas recém-emergidas de capim-amargoso, afim de verificar se seriam infectivos.

Os teliósporos obtidos *in vitro* foram infectivos, sendo capazes de colonizar sistemicamente as plantas de capim-amargoso inoculadas e induzir a formação de panículas com soros contendo teliósporos (Figura 2).

Aparentemente, é o primeiro relato em que a formação de teliósporos de *A. panici-leucophaei in vitro* é descrita e se torna uma informação importante para produção massal de teliósporos (estrutura fúngica mais resistente às intempéries) do fungo em meios de cultura, surgindo uma perspectiva promissora a ser investigada quanto à produção em escala desse tipo de propágulo.

FIGURA 2 - Plantas inoculadas com teliósporos de *A. panici-leucophaei* produzidos *in vitro*



Fonte: Alves (2023).

Andrade et al. (2004) observaram em seus estudos sobre o carvão da batata (*Thecaphora solani*) que uma massa micelial esponjosa obtida em meio de cultura produziu teliósporos iguais àqueles observados no interior das galhas das plantas de batatas naturalmente infectadas, e conseguiram comprovar a patogenicidade desses propágulos ao inocular em plantas de batatas e como resultado obter uma planta de batata com uma galha semelhante às naturais, contendo em seu interior hifas típicas de *T. solani*.

4 - CONCLUSÕES

O isolado 46 foi o mais agressivo quanto à inibição do crescimento de plantas de capim-amargoso e possui maior potencial como agente de controle biológico de capim-amargoso (*D. insularis*).

O fungo *A. panici-leucophaei* foi específico à *D. insularis* em relação às espécies testadas.

Teliósporos de *A. panici-leucophaei* produzidos *in vitro* foram infectivos à *D. insularis*, induzindo as plantas inoculadas a manifestarem sintomas típicos de carvão, o que pode ser importante para produção massal desse fungo futuramente.

Duas pulverizações sucessivas de suspensões com esporídios de *A. panici-leucophaei*, com intervalo de 17 dias entre as aplicações, resultaram em um controle mais eficiente de *D. insularis* quando comparado com uma aplicação.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, O.; MUÑOZ, G.; GALDAMES, R.; DURÁN, P. HONORATO, R. Characterization, In Vitro Culture, and Molecular Analysis of *Thecaphora solani*, the Causal Agent of Potato Smut. **Etiology**, v. 94, n. 8, p. 875-882, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.8.875>

ANEJA, K.R. et al. Potential bioherbicides: Indian Perspectives. In: SALAR, R.K. et al (eds) **Biotechnology: Prospects e Applications**. Springer: New Delhi, p. 197-215, 2013. DOI: https://doi.org/10.1007/978-81-322-1683-4_15

BANUETT, F.; HERSKOWITZ, I. Different a 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. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.86.15.5878>

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. DOI: <https://doi.org/10.1614/WS-D-10-00113.1>

CHARUDATTAN, R. A Reflection on My Research in Weed Biological Control: Using What We Have Learned for Future Applications. **Weed Technology**, v. 24, p. 208–217, 2010. DOI: 10.1614/WT-D-09-00012.1

CHRISTOFFOLETI, P J; LÓPEZ-OVEJERO, R. Main Aspects on Weed Herbicide Resistance to Glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 21, n. 3, p. 507-515, set. 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-83582003000300020>

CORRÊA, T. R. et al. Aplicações e limitações da modelagem em agricultura – revisão. **Rev. Agric.**, v. 86, n. 1, p. 1– 13, 2011. DOI: <https://doi.org/10.37856/bja.v86i1.75>

DALAZEN, G. et al. Hairy fleabane as a source of major insect pests of soybean. **Planta Daninha**, v. 34, p. 403-409, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0100-83582016340300001>

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. Package ‘ExpDes.pt’. 2010. Disponível em: <<http://127.0.0.1:19474/library/ExpDes.pt/html/ExpDes.pt-package.html>> Acesso em: 23 fev. 2023.

FIGUEIREDO, G. Herbicidas microbiológicos empregados no controle de plantas daninhas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 3, p. 111-32, 1995.

FOX, J.; WEISBERG, S. Package ‘car_3.1-2.tar.gz’. 2019. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/car/index.html>> Acesso em: 23 fev. 2023.

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), 2013.

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: **Atas do Congresso Brasileiro da Ciências 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.

GALON, L. et al. Biological weed management-a short review. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 15, n. 1, p. 116-125, 2016. DOI: <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. DOI: <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, p. 231-240, 2012. DOI: <https://doi.org/10.7824/rbh.v11i2.186>

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.

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.

GRAZZIERO, Dionísio Luiz Pisa *et al.* **Manual de identificação de plantas daninhas da cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2015. Disponível em: <https://core.ac.uk/download/pdf/33888212.pdf>> Acesso em: jan.2023.

GROSS, J.; LIGGES, U. **Package ‘nortest_1.0-4.tar.gz’**. 2015. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/nortest/index.html>> Acesso em: 23 fev. 2023.

HOTHORN, T. **Package ‘multcomp_1.4-19.tar.gz’**. 2022. Disponível em: <<https://cran.microsoft.com/snapshot/2022-09/web/packages/multcomp/index.html>> Acesso em: 23 fev. 2023.

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. DOI: <https://doi.org/10.1006/bcon.1997.0555>

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

KIMATI, L.H. et al (ed.). **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995-1997, 1997. 2v., il.

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

LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas**: plantio direto e convencional. 6 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2006.

MACHADO, A.F.L. et al. Análise de crescimento de *Digitaria insularis*. **Planta Daninha**, v. 24, p. 641-647. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-83582006000400004>

MACHADO, A.F.L. et al. (2008) Caracterização anatômica de folha, colmo e rizoma de *Digitaria insularis*. **Planta Daninha**, v. 26, n. 1, p.1-8, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-83582008000100001>

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

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

MENDIBURU, F. Package ‘agricolae_1.3-5.tar.gz’. 2021. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/agricolae/index.html>> Acesso em: 23 fev. 2023.

MILLHOLLON, R. Loose kernel smut for biocontrol of *Sorghum halepense* in *Saccharum* sp. hybrids. **Weed Science**, v. 48, n. 5, p. 645-652, 2000. DOI: [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)

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

NECHET, K.L.; BARRETO, R.W.; MIZUBUTI. *Bipolaris euphorbiae* as a Biological Control Agent for Wild Poinsettia (*Euphorbia heterophylla*): Host-Specificity and Variability in Pathogen and Host Populations. **Biocontrol**, v. 51, p. 259–275, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10526-005-1519-z>

NERY, L. F. **Suscetibilidade de espécies de plantas daninhas do gênero Ipomoea ao herbicida saflufenacil**. 2017. 34 f. Monografia (Especialização) - Curso de Agronomia, IFSULDEMINAS, Machado, 2017. Disponível em: <<https://saulcarvalho.com.br/wp-content/uploads/2017/12/TCC-Leonardo-Nery-Final.pdf>> Acesso em: jan.2023.

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. DOI: <https://doi.org/10.1017/wsc.2016.31>

PEREIRA, J.M. et al. *Corynespora cassiicola* f. sp. *lantanae*: a potential biocontrol agent from Brazil for *Lantana camara*. **Biological Control**, v. 26, p. 21-31, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1049-9644\(02\)00112-3](https://doi.org/10.1016/S1049-9644(02)00112-3)

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

PITELLI, Robinson Antonio. **COMPETIÇÃO E CONTROLE DAS PLANTAS DANINHAS EM ÁREAS AGRÍCOLAS. Série Técnica IPEF**, Piracicaba, v. 4, n. 12, p. 1-24, set. 1987. Disponível em: <<https://www.ipef.br/publicacoes/stecnica/nr12/cap01.pdf>> Acesso em: jan.2023.

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. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf304675j>.

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. DOI: <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. DOI: <https://doi.org/10.1080/03235400802343825>

SIQUEIRA, R. H. S. **Métodos de controle de plantas invasoras em cafeeiros e seus efeitos nos atributos físicos do solo**. 2013. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/bitstream/1/1090/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O_M%C3%A9todos%20de%20controle%20de%20plantas%20invasoras%20em%20cafeeiros%20e%20seus%20efeitos%20nos%20atributos%20f%C3%ADsicos%20do%20solo.pdf> Acesso em: jan.2023.

SOUZA, A.P. **Fungos fitopatogênicos associados a capim amargoso (*Digitaria insularis*) em localidades da Zona da Mata e do Triângulo Mineiro**, 2022. DOI: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.135>

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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.12.011>

TREICHEL, H.; FORTE, C.T. Biological weed management—A short review1. **Revista**

Brasileira de Herbicidas, v.15, n. 1, p.116-125, 2016. DOI:
<https://doi.org/10.7824/rbh.v15i1.452>

ZHANZG, W.M.; WATSON, A.K. Characterization of growth and conidia production of *Exserohilum monoceras* on different substrates. **Biocontrol Science and Technology**, v. 7, p. 75–86, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1080/09583159731063>

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. DOI: <https://doi.org/10.7824/rbh.v15i2.474>.

YAMASHITA, O M *et al.* FATORES AMBIENTAIS SOBRE A GERMINAÇÃO DE *Emilia sonchifolia*. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 27, n. 4, p. 673-681, jan. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-83582009000400005>

CAPÍTULO II

Uso da inteligência artificial na criação de modelos preditivos de inibição de crescimento da *Digitaria insularis* (capim-amargoso) causada pelo fungo *Anthracocystis paniculeucophaei*

J F. Alves, Programa de Pós-graduação em Agricultura e Informações Geoespaciais - PPGAIG, Universidade Federal de Uberlândia – Monte Carmelo, Brasil

Uso da inteligência artificial na criação de modelos preditivos de inibição de crescimento da Digitaria insularis (capim-amargoso) causada pelo fungo Anthracocystis panici-leucophaei

J F. Alves, Programa de Pós-graduação em Agricultura e Informações Geoespaciais - PPGAIG, Universidade Federal de Uberlândia – Monte Carmelo, Brasil

Resumo—As plantas daninhas estão entre os principais problemas da agricultura mundial, pois competem com as culturas por nutrientes, água, luz e espaço. Uma das espécies de grande importância na agricultura brasileira é o capim-amargoso (*Digitaria insularis*), pois possui populações de plantas resistentes aos herbicidas glifosato e inibidores de ACCase. O controle biológico apresenta-se como uma importante ferramenta para um manejo integrado do capim-amargoso. *Anthracocystis panici-leucophaei* é um fungo promissor para esse controle pois promove uma inibição significativa no crescimento da *D. insularis* tratadas com esporos do fungo e diminui significativamente a produção de sementes. O uso da modelagem de dados é um método que pode auxiliar na inibição através de um modelo capaz de prever a inibição de crescimento das plantas de capim-amargoso inoculadas com esporídios de *A. panici-leucophaei*. Assim, objetivou-se com a realização do trabalho, desenvolver modelos de predição para os parâmetros de crescimento de plantas de *D. insularis* inoculadas com o fungo *A. panici-leucophaei* utilizando os algoritmos de inteligência artificial *Multilayer Perceptron* (RNA), *Random Forest* (RF) e *Support Vector Machine* (SMO). O experimento foi conduzido em casa de vegetação no campus da Universidade Federal de Uberlândia, Monte Carmelo, Minas Gerais. Os tratamentos foram constituídos de vasos contendo plântulas de capim-amargoso recém-emergidas e inoculadas com o fungo e vasos contendo plântulas de capim-amargoso sem inoculação como testemunha. As variáveis avaliadas foram altura de planta, comprimento de raiz, diâmetro de caule, peso seco da parte aérea e peso seco da raiz, aos 80 dias após a inoculação com o fungo. Notou-se que foi possível criar um modelo de predição para os parâmetros avaliados e o RF foi o algoritmo que obteve maior acurácia.

Palavras-chave — Controle biológico. Planta daninha. Bioherbicida. Algoritmos.

INTRODUÇÃO

As plantas daninhas são um dos principais fatores biológicos que limitam a produtividade agrícola mundialmente [1]. Existem diferentes métodos de manejo das plantas daninhas como os controles mecânico, cultural e químico, porém de forma predominante está o controle químico com herbicidas [2].

Digitaria insularis é uma planta nativa da América tropical e subtropical, abundantemente encontrada em pastagens, cafezais, pomares e em áreas ruderais, como beira de estradas e terrenos baldios [3]. É uma das espécies de plantas daninhas mais nocivas para a agricultura brasileira [4], pois apresenta populações resistentes a herbicidas como o glifosato e inibidores de ACCase [5].

Necessitam-se então novos métodos de manejo desta espécie de planta daninha. O controle biológico utilizando fungos fitopatogênicos é uma alternativa promissora.

Um fungo com possível potencial para biocontrole de capim-amargoso é o *Anthracocystis panici-leucophaei* que promove nas plantas de capim-amargoso uma inibição do desenvolvimento das plantas e redução acentuada na formação de panículas e sementes, sendo que no meristema apical das plantas doentes apresenta uma formação típica de “chicote” envolvidas por uma massa escura, que são sintomas típicos de carvão [6].

Diante disso, torna-se interessante desenvolver um modelo para avaliar se plantas de capim-amargoso inoculadas com *A. panici leucophaei* demonstram inibição em seu desenvolvimento.

A utilização da modelagem de dados é uma ferramenta importante na agricultura de precisão, pois

pode ser útil para orientar as pesquisas e ajudar na tomada de decisões dos profissionais que estão atuando na área [7]. Com a intenção de estimar ou prever variáveis de interesse, algoritmos de aprendizagem de máquina, como *Multilayer Perceptron* (RNA), *Random Forest* (RF) e *Support Vector Machine* (SMOreg), podem ser largamente utilizados em diversas pesquisas no setor agrícola. As Redes Neurais Artificiais (RNAs) são comumente utilizadas em pesquisas, em decorrência de sua capacidade de generalizar, pois é uma técnica capaz de modelar sistemas não lineares e complexos [8].

O *Random Forest* é um método usado na investigação de problemas agrícolas, e é considerado mais preciso que modelos de regressões [9]. O *Support Vector Machine*, por sua vez, é um modelo não paramétrico utilizado para classificação e regressão de elevado desempenho [10].

Sendo assim, objetivou-se, com a realização do trabalho, desenvolver modelos de predição da inibição do crescimento de plantas de capim-amargoso promovida pela infecção causada pelo fungo *A. panici-leucophaei* a partir de parâmetros de crescimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de dados

Amostras de plantas de *Digitaria insularis*, com sintoma de carvão foram coletadas em áreas ruderais, no estado de Minas Gerais, em janeiro de 2022. As panículas contendo teliósporos do fungo foram encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia (LAMIF) da Universidade Federal de Uberlândia – UFU – Campus Monte Carmelo. Culturas puras do fungo foram obtidas em meio de cultura BDA (Batata dextrose ágar) a partir da germinação de teliósporos e, posterior formação abundante de esporídios. Discos de 2 cm de diâmetro da cultura pura obtida foram transferidos para erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL do meio de cultura líquido (YM). Esses erlenmeyers foram transferidos para um shaker (agitador orbital) a 150 rpm, por 5 dias no escuro a 25°C para produção de esporídios do fungo.

Uma suspensão de 20 mL por vaso com a concentração de $1,0 \times 10^6$ esporídios/mL foi ajustada com o auxílio de uma câmara de Neubauer e procedeu-se a inoculação do fungo em plântulas de capim-amargoso recém emergidas (15 dias após emergência das plântulas), com o auxílio de um pulverizador manual. Essa inoculação foi feita em cinco vasos de 200 mL contendo solo/esterco previamente esterelizado, na proporção de 2:1, contendo 10 plantas por vaso.

Cinco vasos com plântulas de capim-amargoso foram pulverizados somente com água + 0,1% de twem para serem utilizadas como testemunha.

Os isolados de *A. panici-leucophaei* utilizados foram 46, 11.1, 47, BSV2, 36.1, 31 e 37.1. Os vasos contendo as plantas de capim-amargoso permaneceram em casa de vegetação no campus da UFU Monte Carmelo, Minas Gerais, até a data das avaliações, ou seja, aos 75 dias após a inoculação com esporídios de *A. panici-leucophaei*.

As avaliações de desenvolvimento das plantas foram realizadas em outubro de 2022 da seguinte forma:

- Altura de planta: medida em centímetros, do colo até o final da folha maior com auxílio de uma régua;
- Comprimento de raiz: medida, em centímetros, do colo até o final da raiz maior com auxílio de uma régua;
- Diâmetro de caule: medido, em milímetros, com o auxílio de um paquímetro, a 1 milímetro do colo da planta;
- Peso seco da parte aérea e peso seco da raiz: secagem em estufa com circulação de ar a 50 °C por 42 horas e após a secagem foram pesados em balança analítica.

Organização de dados

Os valores obtidos através das avaliações anteriores foram tabulados em uma planilha de Excel.

Modelagem

A modelagem possui três etapas: treinamento do modelo; teste do modelo para definição do algoritmo a utilizar; e validação.

Na etapa de treinamento, os arquivos foram convertidos para o formato de entrada do weka (.arff) separados em um conjunto de dados para treinamento com 100 amostras, contendo 50 amostras (testemunha) em que não houve inibição do crescimento e 50 amostras (isolado 46) em que houve inibição de crescimento das plantas. Além deles dispunha-se de um outro conjunto de dados para validação, com 300 amostras (isolados 11.1, 47, BSV2, 36.1, 31 e 37.1), sendo que todas pertencem a tratamentos que deveriam ter inibição.

No software foram treinados três algoritmos, sendo eles: Redes Neurais Artificiais (RNA -MLP), Máquina de Vetores de Suporte (SVM-SMOreg) e Florestas Aleatórias (Random Forest). Os parâmetros e hiperparâmetros dos modelos foram definidos de acordo com o *default* (padrão) do Weka 3.8.

Para realização de teste de cada modelo foi utilizado o método de validação cruzada K-folds (ou método de n-dobras), com número de partes igual a 10, ou seja 10-folds. Sendo assim, foram obtidas três métricas de avaliação dos modelos, índice kappa (k), RMSE (%) e Exatidão Global.

A validação do modelo foi realizada utilizando o modelo gerado pelo algoritmo *Random Forest* (RF) com as 300 amostras do Arquivo 2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela I apresenta os resultados obtidos de cada métrica de avaliação para cada um dos algoritmos.

TABELA I. MÉTRICAS DE AVALIAÇÃO DOS MODELOS

Algoritmo	RNA	SVM	RF
Índice Kappa (k)	0.82	0.80	0.84
RMSE (%)	0.27	0.32	0.25
Exatidão Global (%)	91.00	90.00	92.00

RMSE – Erro médio quadrático

Observou-se que o algoritmo que apresentou maior índice kappa e, consequentemente, maior exatidão global foi o modelo *Random Forest* (RF), sendo o mais assertivo, ou seja, o que obteve menor erro.

A tabela II apresenta a Matriz de Confusão e o erro cometido ao estimar se houve, ou não, inibição de crescimento das plantas de capim-amargoso de acordo com as variáveis estimadoras utilizadas de altura de plantas, comprimento de raiz, diâmetro do caule, peso seco de parte aérea e peso seco de raiz.

TABELA II – MATRIZ DE CONFUSÃO

Matriz de Confusão		
Classes	Não inibição	Inibição
Não inibição	0	124
Inibição	0	176
Total	0	300
Acurácia Global (%)		58.67

Nota-se que houve uma acurácia global de 58,67% para classificação dos dados, ou seja, essa foi a porcentagem de acerto que o algoritmo obteve ao identificar se houve ou não inibição no desenvolvimento das plantas de capim-amargoso.

A matriz de confusão demonstra que 124 plantas foram classificadas como “não inibição”, sendo que, elas deveriam ter sido classificadas como “inibição”, já que pertencem a tratamentos com isolados do fungo

que inibem seu desenvolvimento. Isso pode ter ocorrido porque em algumas plantas a inibição do desenvolvimento pode não ter sido significativa.

Analisando a tabela III, que mostra o erro cometido em cada tratamento, nota-se que os tratamentos (isolados) 36.1 e BSV2 apresentaram erros superiores a 50%.

TABELA III – ERRO DOS TRATAMENTOS (ISOLADOS)

Isolado	Erro (%)
11.1	40
47	34
BSV2	52
36.1	54
31	20
37.1	48

Possivelmente, no tratamento com os isolado BSV2, o modelo não foi capaz de classificar corretamente a quantidade de plantas nas quais houve inibição do crescimento, pois em uma pesquisa anterior, a autora do presente artigo obteve um resultado de 42% de redução do porte da planta de capim-amargoso para esse isolado.

Nos tratamentos com os isolados 31 e 47, obteve-se os menores erros na classificação de inibição e não inibição. Logo, pôde-se constatar a inibição de crescimento da planta de capim-amargoso causada pelo fungo *A. panici-leucophaei*.

CONCLUSÃO

Foi possível criar um modelo para determinar a inibição de desenvolvimento de *D. insularis* previamente inoculadas com isolados de *A. panici-leucophaei*, a partir dos parâmetros de crescimento, podendo esse modelo ser utilizado para validar o efeito desse fungo no manejo dessa espécie daninha.

Os três algoritmos apresentaram resultados similares, porém o algoritmo *Random Forest* (RF) foi o que obteve maior acurácia em relação aos algoritmos *Multilayer Perceptrom* (RNA) e *Support Vector Machine* (SMOreg), o que pode estar associado ao processamento e estrutura do algoritmo *Random Forest*.

REFERÊNCIAS

- [1] A. C. R. Dias; Carvalho, S.J.P.; Marcolini, L.W.; Melo, M.S.C.; Christoffoleti, P.J. (2010) Competitiveness of alexandergrass or Bengal dayflower with soybean. *Planta Daninha*. 28: 515-22. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-83582010000300008>
- [2] A. Cimmino et al., Fungal phytotoxins with potential herbicidal activity: chemical and biological characterization. *Natural product reports*, v. 32, n. 12, p. 1629-1653, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1039/C5NP00081E>
- [3] A. F. L. Machado et al., Caracterização anatômica de folha, colmo e rizoma de *Digitaria insularis*. *Planta Daninha*, v. 26, n. 1, p.1-8, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-83582008000100001>
- [4] L. H. S. Zobiolo et al., Controle de capim-amargoso perenizado em pleno florescimento. *Revista Brasileira de Herbicidas*, v. 15, n. 2, p. 157-164, 2016. DOI: <https://doi.org/10.7824/rbh.v15i2.474>.
- [5] H. K. Takano et al., Trp2027Cys mutation evolves in *Digitaria insularis* with cross-resistance to ACCase inhibitors. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 164, p. 1-6, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.12.011>
- [6] A. P. Souza, Fungos fitopatogênicos associados a capim amargoso (*Digitaria insularis*) em localidades da Zona da Mata e do Triângulo Mineiro, 2022. DOI: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.135>
- [7] S. T. R. Corrêa, R. Lorençoni, D. D. Neto, F. V. Scarpere, R. Vivian, and E. T. Ruiz, “Aplicações e limitações da modelagem em agricultura – Revisão,” *Rev. Agric.*, vol. 86, no. 1, pp. 1–13, 2011. DOI: <https://doi.org/10.37856/bja.v86i1.75>
- [8] J. S. Spancerski and J. A. A. dos Santos, “Redes neurais aplicadas na predição do preço da soja no estado do Paraná,” *Rev. Perspect. Online Exatas Eng.*, vol. 11, no. 32, pp. 19–32, 2021. DOI: [10.25242/885X113220212282](https://doi.org/10.25242/885X113220212282).
- [9] L. Wang, X. Zhou, X. Zhu, Z. Dong, and W. Guo, “Estimation of biomass in wheat using random Esforest regression algorithm and remote sensing data,” *Crop J.*, vol. 4, no. 3, pp. 212–219, 2016. DOI: [10.1016/j.cj.2016.01.008](https://doi.org/10.1016/j.cj.2016.01.008).
- [10] C. A. D. M. Lima, “Comitê de Máquinas: Uma Abordagem Unificada Empregando Máquinas de Vetores-Suporte,” *Diss. do Programa Pós Graduação em Eng. Comput.*, p. 378p, 2004.

CAPÍTULO III

***Bipolaris yamadae* causes foliage blight of *Digitaria insularis* in Brazil**

Alves, JF¹, Fabbris, C¹, Inokuti, EM¹, Nóbrega, TF¹ & Barreto, RW², Vieira, BV¹

Australasian Plant Disease Notes

***Bipolaris yamadae* causes foliage blight of *Digitaria insularis* in Brazil**

Alves, JF¹, Fabbris, C¹, Inokuti, EM¹, Nóbrega, TF¹ & Barreto, RW², Vieira, BV¹

¹Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia, Monte Carmelo, 38500-000, MG, Brazil

²Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 36570-900, MG, Brazil

Abstract

During a survey of the mycobiota of sourgrass (*Digitaria insularis*), a graminaceous weed from Brazil, severe foliage blight symptoms were observed on plants at different places of the state of Minas Gerais. A fungus identified as *Bipolaris yamadae*, after a polyphasic study, including analysis of ITS, GPDH and TEF genes, was isolated from diseased tissues. Pathogenicity to sourgrass was confirmed through inoculations of healthy plants. This is the first report of *B. yamadae* causing foliage blight on *D. insularis* in Brazil and worldwide.

Keywords: Pathogenicity • Phylogeny • Poaceae • Taxonomy • Weeds

Sourgrass (*Digitaria insularis*) is a perennial weed native to tropical and subtropical America – including Brazil (Machado *et al.*, 2008). It is an erect grass with striated stems reaching 50 to 150 cm in height and can propagate by seeds and rhizomes (Grazziero *et al.*, 2015). The seeds have a high germination percentage and can be spread over long distances by wind (Mondo *et al.*, 2010). It is one of the worst weeds in Brazilian agriculture. The intensive use of herbicides has resulted in the selection, and widespread occurrence, of sourgrass populations resistant to glyphosate and, more recently, also to ACCase inhibitor herbicides. New management methods are urgently needed to tackle sourgrass infestations. Strangely, biological control has never been investigated for this weed species. A preliminary study is presently under way to survey the pathogenic mycobiota associated with this weed.

Early (Feb 2022) in the survey for diseased sourgrass in the state of Minas Gerais, plants bearing necrosed areas on leaves were observed at a road side near the city of Ubá. Necrotic elongated light brown spots arised from the margin or tip of the leaves but also at the midrib and increased in size with age (5.5 - 10 x 0.4 - 0.7 cm), coalescing to provoking the blight of up to 50% of the lamina of individual leaves. Diseased leaves were collected, immediately placed in dried newspaper sheets and placed in a plant press in order to prepare herbarium samples. Upon arrival in the laboratory (either at the Universidade Federal de Uberlândia – Campus Monte Carmelo, or at the Universidade Federal de Viçosa) the samples were readily scanned under a dissecting microscope in order to detect the presence of sporulating fungi and to allow for isolation from newly collected samples. Sporulation of a dematiaceous fungus on the leaves was evident. A pure culture was through direct transfer of conidia, with the help of a sterile needle onto potato dextrose-agar (PDA) plates. The isolate was deposited at the “Coleção Octávio Almeida Drummond” as COAD 3424. This isolate was grown in PDA for seven days in an incubator adjusted to 25 ± 2 °C and a 12 h photoperiod for a preliminary observation of colony morphology. The colony was fast-growing (84 mm diam. in seven days), flat, with an entire border, felty grayish aerial mycelium, sporulation was scarce. Slides were mounted with fungus structures in lactoglycerol. Measurements and photographs were taken with a Primostar microscope with Axiocam ERc 5D digital camera and Zen software. Morphology was as follows: conidiophores cylindrical, $61.5\text{--}181 \times 2\text{--}2.5$ μm , macronematous, isolate or in small loose groups, simple, 5-8 septate, somewhat geniculate, with a swollen, darker brown basal cell; conidiogenous cells $5\text{--}21 \times 2\text{--}3.5$ μm , mono- or polytretic, terminal or intercalary; conidia $17.5\text{--}38.5 \times 5\text{--}8$ μm , curved, sometimes straight, elliptical or obclavate, wider in the middle or just below, tapering towards the apices, pale to dark brown, 3–9 distoseptate, with a thickened external hilum. Chlamydospores $3.5\text{--}8.5 \times 3.5\text{--}5.5$ μm , globose brown, terminal sometimes forming chains (n=30) (Fig. 1). This morphology is typical for fungi in the *Bipolaris/Curvularia*-complex and was recognized as close to that described for *Bipolaris yamadae* (Manamgoda et al. 2014).

Total genomic DNA sample of COAD 3424 was extracted using the Wizard® genomic DNA purification kit (Promega) following the manufacture’s protocol. For molecular identification, the primer ITS1/ITS 4 (White et al. 1990), EF 983/2218R (Schoch et al. 2009) and GPD1/GPD2 (Berbee et al. 1999) were used to amplify the internal transcribed spacer (ITS) regions of rDNA, part of translation elongation factor (TEF) and part of the glyceraldehyde-3-

phosphate dehydrogenase (GPDH), respectively. The sequences were deposited in GenBank (OQ505161(ITS), OQ538099(GPDH), OQ538100(TEF)). The combined analyses of ITS region, GPDH and TEF genes provides the best resolved phylogeny for *Bipolaris* and allowed for the present separation of this genus from *Curvularia* (Manangoda et al. 2012, 2014). Multiple sequence alignments of individual data partitions were generated with MAFFT v. 7 (Kato, Rozewicki, Yamada; 2019; Kuraku, Zmasek, Nishimura, Kato; 2013), and manually adjusted. Maximum-likelihood trees were inferred using RAxML v. 8.2.12 program released by Alexandros Stamatakis on May 2018 in CIPRES Science Gateway (Miller et al. 2010). Bayesian inference analyses were performed with CIPRES Science Gateway (Miller et al. 2010) using MRBayes v. 3.2.6 (Miller et al. 2015). The jmodeltest was used to selected appropriate evolutionary models for Bayesian analysis (Nylander 2004). Phylogenetic trees were visualized and edited using FigTree v1.4.2 software. The analyses placed COAD 3424 within the *B. yamadae* clade (Fig. 2). Based on molecular and morphological identification the isolate COAD 3424 is identified herein as *B. yamadae*.

Ten healthy 20 days-old sourgrass plants were cultivated in separate pots in a greenhouse and used in an inoculation test. Inoculations were performed in utilizing 5 mm diam. discs taken from the margin of an actively growing COAD 3424 on PDA and deposited on fully developed leaves of five sourgrass plants. Separately, five sourgrass plants received uncolonized PDA discs and served as control. Either COAD 3424-inoculated and control plants were then kept in a dew chamber for two days and then transferred to a climatic chamber at $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. All sourgrass leaves inoculated with COAD 3424 developed severe leaf spot lesions 14 days after the inoculation. Such lesions were equivalent to those observed on diseased plants in the field, whereas no symptoms were observed on the non-inoculated plants. Typical *B. yamadae* colonies were formed after isolations were performed from diseased fragments taken from necrotic – surface sterilized necrotic fragments subjected to Clorox disinfection and plated on PDA. No foliage necrosis appeared on control plants. *Bipolaris yamadae* is a species known only as a plant pathogen. It has been previously reported on *Panicum capillare*, *P. maximum*, *P. miliaceum* and *Saccharum officinarum*, but never on *D. insularis*. None of those earlier records were from Brazil (Farr and Rossman, 2023). To our knowledge this is the first report of *B. yamadae* causing foliage blight on *D. insularis* in Brazil and worldwide and the first record of this fungus from Brazil. Several additional novel fungal records on sourgrass have resulted from our study and will be published separately.

Acknowledgments: This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Koppert do Brasil Holding LTDA.

Autor and affiliations

Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia, Monte Carmelo, Minas Gerais, Brasil

Juliana Fonseca Alvez, Bruno Sérgio Vieira, Claudia Fabbris, Eliane Mayumi Inokuti, Thaisa Ferreira Nóbrega.

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil
Robert Weingart Barreto

Corresponding autor

Correspondence to Bruno Sérgio Vieira (brunovieira@ufu.br)

Ethical declarations

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

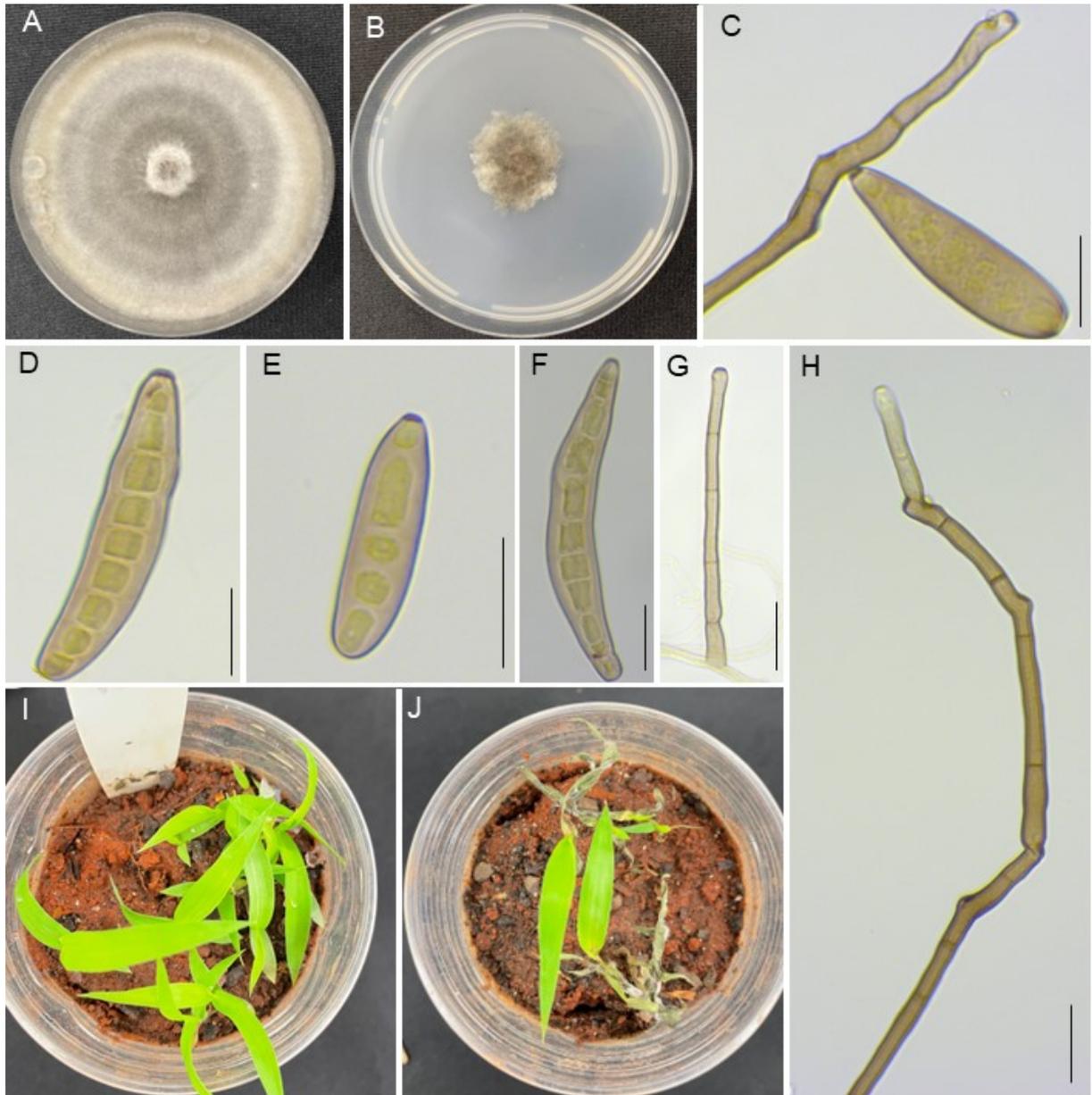


Fig. 1 *Bipolaris yamadae*. Top view of colonies after seven days on PDA (A) and oat-agar (OA) (B); conidiophore and conidium (C); conidia (D - F); conidiophores (G-H); *Digitaria insularis* non-inoculated control plants (I) and inoculated with *B. yamadae* after 14 days (J). Scale bar = 10 μ m.

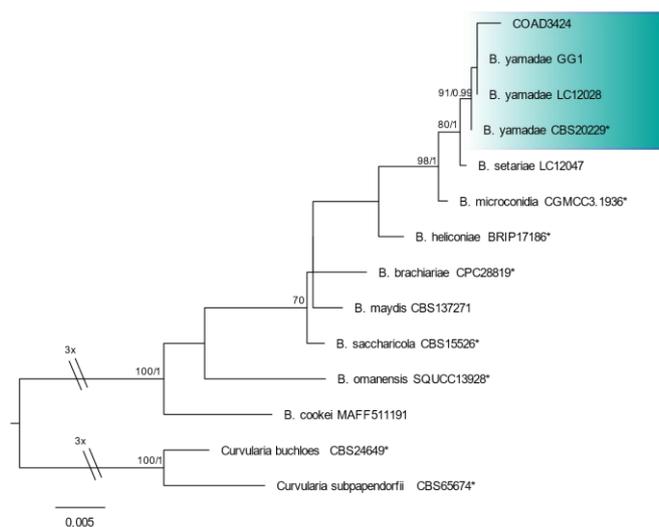


Fig. 2 Multilocus phylogenetic tree of *Bipolaris* species inferred from RAxML and Bayesian analysis based on combined ITS, GPDH and TEF sequences. The bootstraps ≥ 70 and Bayesian posterior probabilities ≥ 0.95 are indicated above the nodes, respectively. Isolate from the study are highlighted in bold. The tree was rooted with *Curvularia buchhoes* (CBS 24649) and *Curvularia subpapendorffii* (CBS 65674) isolates

References

- Berbee ML, Pirseyedi M, Hubbard S (1999) *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia* 91:964–977. <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061106>
- Farr DF, Rossman A.Y (2023) Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>. Accessed 24 Feb 2023
- Grazziero DLP, Lollato RP, Brighenti AM, Pitelli RA, Voll E (2015) Manual de identificação de plantas daninhas da cultura da soja. Embrapa Soja. <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1019323/manual-de-identificacao-de-plantas-daninhas-da-cultura-da-soja>. Accessed 16 nov 2022
- Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD (2019) MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinform* 20:1160–1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
- Machado AFL, Meira RMS, Ferreira LR, Ferreira FA, Tuffi Santos LD, Fialho CMT, Machado MS (2008) Caracterização anatômica de folha, colmo e rizoma de *Digitaria insularis* (L.) Fedde. *Planta Daninha*.

<https://www.scielo.br/j/pd/a/sSgvDfmdpdrYxFPXLmfMtw/?format=pdf&lang=pt>. Accessed 16 nov 2022. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582008000100001>

Manamgoda DS, Cai L, McKenzie EHC, Crous PW, Madrid H, Chukcatirote E, Shivas RG, Tan YP, Hyde KD (2012) A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris* – *Cochliobolus* – *Curvularia* Complex. *Fungal Diversity* 56:131-144. <https://doi.org/10.1007/s13225-012-0189-2>

Manamgoda DS, Rossman AY, Castlebury LA, Crous PW, Madrid H, Chukeatirote E, Hyde KD (2014) The genus *Bipolaris*. *Studies in Mycology* 79:221-288. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.10.002>

Mendonça GS, Martinsm CC, Martins D, Costa NV (2014) Ecophysiology of seed germination in *Digitaria insularis* (L.) Fedde. *Rev Ciência Agronômica* 45:823-832. <https://doi.org/10.1590/S1806-66902014000400021>

Miller MA, Schwartz T, Pickett BE, He S, Klem EB, Scheuermann RH, Passarotti M, Kaufman S, O’Leary MA (2015) A RESTful API for access to phylogenetic tools via the CIPRES science gateway. *Evol Bioinforma* 11:43–48. <https://doi.org/10.4137/EBO.S21501>

Mondo VHV, Carvalho SJP, Dias ACR, Marcos Filho, J (2010) Efeitos da luz e temperatura na germinação de sementes de quatro espécies de plantas daninhas do gênero *Digitaria*. *Rev Bras Sementes* 32:131-137. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222010000100015>

Kuraku C, Crous PW, Groenewald J, Boehm E, Burgess TI, De Gruyter J, De Hoog G, Dixon L, Grube M, Gueidan C (2009) A class-wide phylogenetic assessment of Dothideomycetes. *Stud Mycol* 64:1–15. <https://doi.org/10.3114/sim.2009.64.01>

Kuraku S, Zmasek CM, Nishimura O, Katoh K (2013) Leaves facilitates on-demand exploration of metazoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity. *Nucleic Acids Research* 41:W22–W28. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt389>

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR protocols: a guide to methods and applications*, Academic, San Diego, pp 315–322 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>