

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

JAIRLA GOMES RODRIGUES

POTENCIAL DE *Phoma conyzaphthora* PARA O CONTROLE DE BUVA (*Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*) EM PRÉ-EMERGÊNCIA

Monte Carmelo-MG  
2023

JAIRLA GOMES RODRIGUES

POTENCIAL DE *Phoma conyzaphthora* PARA O CONTROLE DE BUVA (*Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*) EM PRÉ-EMERGÊNCIA

Trabalho de Conclusão apresentado ao curso de Agronomia da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Monte Carmelo, como requisito necessário para a obtenção do grau de Engenheira Agrônoma.  
Orientador: Prof. Dr. Bruno Sérgio Vieira.

Monte Carmelo-MG  
2023

JAIRLA GOMES RODRIGUES

POTENCIAL DE *Phoma conyzaphthora* PARA O CONTROLE DE BUVA (*Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*) EM PRÉ-EMERGÊNCIA

Trabalho de Conclusão apresentado ao curso de Agronomia da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Monte Carmelo, como requisito necessário para a obtenção do grau de Engenheira Agrônoma.

APROVADA em 05 de julho de 2023.

Dra. Eliane Mayumi Inokuti

UFU

Me. Fernando Garcia

UFU

Prof. Dr. Bruno Sérgio Vieira  
ICIAG-UFU  
(Orientador)

Monte Carmelo-MG  
2023

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por tornar possível a conclusão deste trabalho.

Ao meu filho Matias, por ser a razão da minha vida.

À minha mãe Sonia Gomes, pelo cuidado e exemplo, pelo esforço, por me motivar todos os dias a seguir meus sonhos.

Ao meu companheiro Sergio Daniel pelo apoio e incentivo.

À minha família e amigos que sempre me motivaram.

A todos os professores que fizeram parte da minha formação.

Ao professor Bruno Sergio Vieira, pela dedicação em suas orientações prestatadas na orientação deste trabalho.

A Koppert, pela bolsa concedida e pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os envolvidos nos projetos da UFU/Monte Carmelo que participei, onde pude aprender bastante.

À Universidade Federal de Uberlândia/Campus Monte Carmelo.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. OBJETIVO .....	10
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	13
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	16
6. CONCLUSÃO .....	20
7. REFERÊNCIAS .....	21

## RESUMO

Um dos fatores que limitam a produtividade agrícola no cenário atual a nível mundial são as plantas daninhas, interferindo direta e indiretamente nas grandes culturas resultando significativamente em perdas na qualidade e produtividade. A buva (*Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*) é uma das plantas daninhas mais nocivas na agricultura brasileira, sendo bastante agressiva, de fácil dispersão. São plantas anuais caracterizadas como espécies de inverno e verão. O uso indiscriminado de herbicidas químicos, principalmente o glyphosate para o controle dessas espécies aumentou substancialmente a pressão de seleção, resultando na seleção de populações resistentes. Torna-se essencial a busca por meios alternativos de controle, como o controle biológico que é uma excelente opção ao uso de herbicidas químicos. Objetivou-se neste trabalho avaliar o potencial de isolados de *Phoma conyzaphthora* para o controle de buva (*Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*) em pré emergência. Foram utilizados quatro isolados (isolados COAD 1066B, COAD 2380C, COAD 2383A e COAD2383C). Foram testados suspensões preparadas com fragmentos de micélio na concentração de  $1 \times 10^6$  fragmentos/mL, com arroz triturado na concentração de 50% m/v e fragmentos de micélio nas concentrações de 2.5%, 5%, 7% e 10% m/v e do filtrado do fungo. Os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os tratamentos com o isoado COAD 1066B que apresentaram maior inibição de germinação das sementes de *C. canadensis* foram aqueles nas porcentagens de concentração de 2,5%, 5%, 7,5% e 10% m/v, sendo que o tratamento na concentração 2.5% foi melhor para inibição da germinação das sementes. Para os tratamentos realizados com fragmentos de micélio na concentração  $1 \times 10^6$  fragmentos/mL, o tratamento COAD 1066B foi o melhor para inibir a germinação de *C. bonariensis*. O isolado COAD 1066B de *Phoma conyzaphthora* possui potencial como agente de controle biológico para as espécies *C. bonariensis* e *C. canadensis*.

**Palavras-chave:** plantas daninhas, bioherbicida, controle biológico.

## ABSTRACT

One of the factors that limit agricultural productivity in the current scenario worldwide are weeds, directly interfering and influencing large crops produced significantly in losses in quality and productivity. The horseweed (*Conyza bonariensis* and *Conyza canadensis*) is one of the most harmful weeds in Brazilian agriculture, being quite aggressive, easily distributed, they are annual plants characterized as winter and summer species. The indiscriminate use of chemical herbicides, mainly glyphosate, to control these species increased the selection pressure, gaining in the selection of resistant resistant ones. It is essential to search for alternative means of control, such as biological control, which is an excellent option to the use of chemical herbicides. The objective of this work was to evaluate the potential of *Phomaconyza* isolates for the control of horseweed (*Conyza bonariensis* and *Conyza canadensis*) in pre-emergence. Four isolates were used (isolates COAD 1066B, COAD 2380C, COAD 2383A and COAD2383C). Suspensions prepared with fragments of mycelium at a concentration of  $1 \times 10^6$  fragments/mL, with crushed rice at a concentration of 50% m/v and fragments of mycelium at concentrations of 2.5%, 5%, 7% and 10% m/v and of fungus filtrate. The experiments were set up in a completely randomized design (DIC). The treatments of the fungus COAD 1066B that followed the highest tendency of germination of the seeds of *C. canadensis* were those in the concentration percentages of 2.5%, 5%, 7.5% and 10% m/v, being that the treatment in the concentration 2.5% was better for monitoring seed germination. For the treatments carried out with mycelium fragments at a concentration of  $1 \times 10^6$  fragments/mL, the COAD 1066B treatment was the best to inhibit the germination of *C. bonariensis*. *Phoma conyza* isolate COAD 1066B has potential as a biological control agent in *C. bonariensis* and *C. canadensis* species.

**Keywords:** weeds, bioherbicide, biological control.

## 1.INTRODUÇÃO

As plantas daninhas constituem-se como um dos maiores fatores limitantes a produtividade agrícola, acarretando em muitos danos econômicos. De acordo com Lorenzi (2000), as plantas daninhas influenciam em média de 30% a 40% na redução da produção agrícola mundial. Essas plantas apresentam algumas características que as favorecem, como a rusticidade, resistência a pragas e doenças, produção de um grande número de sementes viáveis, boa dispersão das espécies, formas variadas de multiplicação e podem apresentar também efeitos alelopáticos sobre as plantas cultivadas (DE OLIVEIRA JR et al., 2011).

Além dos prejuízos diretos ligados a redução da eficiência agrícola, essas plantas também interferem no aumento dos custos de produção. A presença dessas plantas daninhas podem levar a danos maiores que os causados por pragas e doenças, dessa forma, representam a maior barreira à produção de alimentos em muitas regiões do mundo (MUZIK, 1970).

Nas últimas décadas nos sistemas de cultivo, o controle principal das plantas daninhas é o controle químico (HEAP; DUKE, 2018). O volume de gastos com agrotóxicos passou de US\$ 400 mil em 1964 para quase US\$ 7 bilhões em 2008 no Brasil (DE OLIVEIRA JR ET AL., 2011).

Nos últimos dez anos o perfil de uso de agrotóxicos manteve crescente no país, onde os produtos que dominam o mercado nacional de agrotóxicos são os herbicidas (VARGAS, LEANDRO et al., 2013). No país o uso de agrotóxicos tem sido crescente e o aumento no uso dessas substâncias químicas foi significativamente superiores aos dos Estados Unidos e países europeus (DE MORAES, 2019).

No entanto, recentemente, surgiu uma preocupação sobre o uso de herbicidas químicos, a seleção de biotipos resistentes. Estes podem surgir de aplicações consecutivas feitas de forma incorreta, que interferem na eficácia dos herbicidas, possibilitando o aumento nos números de plantas daninhas resistentes a um ou mais herbicidas com diferentes modos de ação (SANTOS et al., 2014).

*Conyza bonariensis* (L.), *Conyza canadensis* (L.) e *Conyza sumatrensis* (Retz.) são espécies de plantas daninhas mais difundidas pelo mundo e que mais se destacam negativamente no gênero *Conyza* (THEBAUD; ABBOTT, 1995). São popularmente conhecidas como buva e pertencem à família Asteraceae. As espécies de buva são uma das plantas daninhas consideradas mais nocivas na agricultura brasileira, sendo bastante agressivas, de fácil dispersão, produzindo em média 400 sementes por capítulo. Caracterizam-se como plantas anuais, de inverno e verão. Infestam pomares, vinhedos, pastagens e grandes

culturas como milho, soja e algodão (LAZAROTO et al., 2008). Mas também infesta e se desenvolve em áreas não cultivadas. São nativas da América do Sul, ocorrendo abundantemente na Argentina, Uruguai e no Brasil (VARGAS, 2007).

As espécies de buva se adaptam bem em sistemas conservacionistas, como semeadura direta e cultivo mínimo de solo, dessa forma a identificação correta da espécie é essencial na tomada de decisão da medida de controle a ser empregada na área (LAZAROTO et al., 2008). A principal forma de identificação taxonômica das espécies do gênero *Conyza* é por meio da observação dos caracteres morfológicos, como inserção das inflorescências, forma do cotilédone, cor da folhagem, número e profundidade dos dentes nas folhas (ULZURRUN et al., 2018).

Em um estudo sobre germinação de sementes de buva, foi observado que as espécies *C. canadensis* e *C. bonariensis* germinam bem em condições de temperaturas constantes (20°, 25° e 30° C) e apresentam germinação reduzida em temperaturas de 15°, 35° e 40° C (YAMASHITA; GUIMARÃES., 2011). Sua germinação ocorre com maior intensidade no final do outono e no inverno. As sementes não apresentam dormência e podem germinar prontamente em condições de temperatura e umidade favoráveis (LAZAROTO, et al., 2008).

O uso indiscriminado de herbicidas químicos, principalmente o glyphosate aumentou substancialmente a pressão de seleção, resultando na seleção de populações de buva resistentes (SANTOS et al., 2014). Torna-se essencial a busca por meios alternativos de controle, como o controle biológico que é uma excelente opção ao uso de herbicidas químicos.

O controle biológico compreende na utilização de organismos vivos que atuam na supressão ou estabilização de uma ou mais espécies nocivas de plantas, animais ou microrganismos abaixo dos níveis de dano econômico ou ambiental (VIEIRA et al., 2018). Consiste no uso deliberado de inimigos naturais para reduzir a população de uma planta daninha alvo, dividindo-se em duas abordagens principais. A clássica ou inoculativa que envolve importação ou liberação de um ou mais inimigos naturais que atacam e regulam a população da planta daninha alvo. E a abordagem inundativa ou biohercida que consiste na utilização de principalmente fungos endêmicos, já associados à planta daninha alvo e que são aplicados massalmente nas culturas agrícolas, de forma semelhante a um herbicida químico (WATSON, 1991).

Um caso de sucesso no controle biológico clássico é da planta daninha *Miconia calvescens*, por meio do fungo *Colletotrichum gloeosporioides f. sp. miconiae*, agente causal da antracnose, que reduz o crescimento da planta daninha e seu vigor (MACEDO et al., 2016).

Outro exemplo de sucesso foi o controle de *Acaciasaligna* uma planta daninha de grande importância região florística de Cape Fynbos, na África do Sul. O fungo da ferrugem *Uromycladium tepperianum* introduzido na África do Sul pela Austrália causa extensa formação de galhas em galhos, e quando fortemente infectados acaba levando a morte da árvore (CHARUDATTAN; DINOOR, 2000).

Desde a década de 1980, os bioherbicidas vêm sendo desenvolvidos, registrados e comercializados (VIEIRA et al., 2018). Atualmente existem poucos produtos bioherbicidas disponíveis no mercado para controle de plantas daninhas, sendo que, no presente momento encontram-se apenas treze disponíveis (CORDEAU, STÉPHANE et al., 2016). No mercado, temos o bioherbicida Collego® a base de *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*, produzido nos EUA e registrado para controle *Aeschynomene virginica* (L.), (CHARUDATTAN; DINOOR, 2000). Outro exemplo de bioherbicida possui como princípio ativo do produto Smolder®, o fungo *Alternaria destruens* (L.) Simmons, que controla várias espécies de *Cuscuta* sp. que infestam diferentes culturas, como alfafa, cenoura, amora, pimentão, tomate, berinjela, centáurea e plantas ornamentais lenhosas. (CORDEAU, STÉPHANE et al., 2016).

Desta forma, torna-se necessário a realização de trabalhos em busca de estratégias alternativas para o controle de plantas daninhas, sendo o controle biológico inundativo ou o desenvolvimento de bioherbicidas uma opção particularmente atraente.

Justifica-se a realização deste trabalho, escassez de alternativas para o controle de *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis* por meio do controle biológico utilizando-se de fungos fitopatogênicos. Pois as espécies do estudo têm grande importância para a economia no agronegócio brasileiro.

## 2. OBJETIVO

Avaliar o potencial de quatro isolados de *Phoma conyzaphthora* para o controle das espécies de buva (*Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*) em pré emergência.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

Nos últimos anos o setor agrícola vem crescendo cada vez mais e apresentando um incremento cada vez maior nos índices de produtividade. O saldo da balança agrícola no Brasil elevou-se substancialmente entres os anos de 1990 e 2017, sendo que no ano de 2018 o valor do saldo agrícola foi quase dez vezes maior, impulsionando U\$ 81,7 bilhões (EMBRAPA, 2018).

O desenvolvimento no setor agrícola se deve a vários fatores, entre eles os altos investimentos tecnológicos, que possibilitam elevar os índices de produtividade. No entanto, alguns fatores interferem negativamente na produtividade, dentre estes, as plantas daninhas que causam muitos prejuízos as culturas agrícolas (DA SILVA, 2012).

No Brasil houve um grande aumento no consumo de produtos químicos para o controle de plantas daninhas nos últimos anos. Entre os anos de 1991 a 2015, o Brasil esteve entre os países que mais utilizavam agrotóxicos, sendo que no começo de 2019, existiam cerca de 13.300 registros de agrotóxicos no país (DE MORAES, 2019). Os principais prejuízos relacionados as plantas daninhas estão associados aos efeitos ocasionados pela competição por água, luz e nutrientes minerais, produção de compostos alelopáticos e o fato de algumas plantas daninhas serem hospedeiras de pragas e patógenos (DA SILVA, 2012).

A buva (*C. bonariensis*) é uma planta bem agressiva, apresenta uma boa dispersão, uma grande produção de sementes, caracterizada como uma planta anual. No Rio Grande do Sul, a buva atua como importante planta daninha infestando lavouras de trigo, soja e milho (VARGAS, 2007). Na região nordeste da Austrália, em 2004 a buva era considerada umas das plantas daninhas de mais difícil controle (WALKER et al., 2004). A espécie *Conyza canadensis* é nativa da América, e é uma espécie que comporta como anual ou bienal e é muito prolífica, podendo produzir até 200.000 sementes viáveis por planta (LAZAROTO et al., 2008).

As espécies *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis* são plantas daninhas com resistência ao glyphosate mais disseminadas, sendo *C. bonariensis* a primeira planta daninha dicotiledônea com resistência relatada na soja nos Estados Unidos (GESSEL, 2001, apud, PIASECKI, 2020), sendo essa resistência relatada pela primeira vez no ano 2003 (VARGAS, 2007).

A resistência encontrada em biótipos de buva tornou-se ineficiente o uso de glyphosate para seu controle. Alguns autores sugerem que se deve a possibilidade de existir isômeros da enzima 5-enol-piruvil shiquimato fosfato sintase (EPSPS) que promovem menor afinidade

com a molécula do glyphosate (LAZAROTO, et al. 2008). A evolução das plantas ao adquirir resistência aos herbicidas dificulta bastante o controle, gerando perdas e mais custos e busca por herbicidas alternativos para o controle (VIEIRA et al., 2018).

O manejo de plantas daninhas é um componente importante em muitos agroecossistemas (DA SILVA, 2012), sendo importante seu controle para evitar perdas e prejuízos. Em situações de extremas infestações de *C. canadensis* as perdas de produção nas lavouras de soja cultivada em semeadura direta podem chegar a 83% (Bruce & Kells, 1990).

O controle biológico consiste na redução de plantas daninhas pela ação de inimigos naturais, tais como fungos, bactérias, insetos dentre outros. Trata-se de uma alternativa para superar alguns problemas dos herbicidas químicos. Como exemplo, o uso do fungo fitopatogênico *Puccinia chondrillina*, uma ferrugem que apresentou sucesso no controle clássico da planta daninha *Chondrilla juncea* na Austrália (KLAIC et al., 2015).

O controle biológico apresenta duas abordagens principais para o uso de fitopatógenos como agentes de controle de plantas daninhas, o método clássico, ou inoculativo, e o método inundativo. O método de controle biológico clássico ou inoculativo envolve a importação de um ou mais inimigos naturais da região do centro de origem da planta daninha, onde após a introdução deste inimigo natural se espera que este se estabeleça, se autoperpetue, se dispersando e promovendo o controle da planta-alvo ao longo do tempo (ADEGAS, et al., 2022). E o método de controle inundativo envolve o uso de fungos fitopatogênicos endêmicos, já associados à planta-alvo (VIEIRA et al., 2018).

*Phoma* sp. vem sendo investigado como um potencial bioherbicida de plantas daninhas, causando retardo no crescimento de brotos e raízes, bem como fotobranqueamento severo da folhagem, seguido posteriormente por senescência (BAILEY et al., 2011). Trabalhos mostram bons resultados usando este fungo como agente de biocontrole. Bailey et al. (2011) verificaram a eficiência de *Phoma macrostoma* ao avaliar noventa e quatro espécies agrícolas, hortícolas de importância econômica e plantas daninhas alvo e não alvo. Trinta e oito espécies de doze famílias demonstraram serem suscetível ao fungo e cinquenta e sete espécies de oito famílias apresentaram resistência a esse patógeno. Quanto as plantas daninhas, vinte e uma das trinta e nove espécies avaliadas foram consideradas suscetíveis a *P. macrostoma*.

O fungo *Phoma conyzaphthora* foi descrito e proposto como uma nova espécie de *Phoma*. Seu nome é uma combinação do nome do gênero do fungo hospedeiro com a palavra grega “phthora” que significa destruidor, pois causa lesões em hastes vivas que consiste em extensa necrose levando à morte do hospedeiro (DUARTE et al., 2016).

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratórios de Microbiologia e Fitopatologia (LAMIF) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), campus Monte Carmelo-MG e no Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. Para os experimentos foram utilizados isolados promissores de *Phoma conyzaphthora* (COAD 1066B, COAD 2380C, COAD 2383A e COAD2383C) que estavam depositados na “Coleção Octávio Almeida Drummond” na Universidade Federal de Viçosa. As sementes de *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis* foram fornecidas pela empresa Agro Cosmos®. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC).

##### 1. Microbiolização de sementes com fragmentos de micélio dos isolados de *Phoma conyzaphthora in vitro*

Os isolados COAD 1066B, COAD 2380C, COAD 2383A e COAD2383C foram repicados separadamente para placas de Petri contendo o meio de cultura batata-dextrose ágar (BDA), onde foram incubados durante sete dias a 25 °C, com fotoperíodo de 12h em BOD (Demanda biológica de oxigênio). Posteriormente, foram preparadas suspensões com fragmentos de micélio dos isolados, com água destilada esterilizada com Tween 80 (0,05%). As suspensões foram filtradas e posteriormente foram realizadas as contagens de fragmentos de micélio em câmara de Neubauer. Todas as suspensões de fragmentos do micélio dos quatro isolados tiveram a concentração final de  $1 \times 10^6$  fragmentos/mL.

Em uma câmara de fluxo laminar foi realizada a desinfestação das sementes de *Conyza bonariensis* em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 3 minutos. Posteriormente as sementes transferidas para papel filtro esterilizado por 20 minutos para secar. Em seguida as sementes foram imersas, separadamente, nas suspensões contendo fragmentos de micélio, na concentração  $1 \times 10^6$  fragmentos/mL e levadas ao agitador mecânico a 150 rpm por 30 minutos. Para a testemunha foi utilizado somente água esterilizada com Tween 80% (0,05%). Logo após, as sementes que foram imersas nas suspensões foram transferidas para placas de Petri contendo o meio de cultura ágar-água (AA). Foram depositadas 10 porções de sementes (cada porção contendo aproximadamente 20 sementes) de *Conyza bonariensis* por placa de Petri. Cada placa de Petri contendo as sementes representava uma repetição. Foram realizadas 5 repetições para cada tratamento, sendo considerado cada isolado como um tratamento. Posteriormente as placas de Petri foram levadas a BOD (Demanda biológica de oxigênio) e incubadas por 17 dias sob fotoperíodo de 12h de luz a 25° C. Para a testemunha foi usado apenas água estéril + Tween 80 (0,05%). A avaliação foi realizada após dezessete dias, onde

foi observada a emergência de plântulas em cada placa de Petri e posteriormente foi realizado o cálculo da porcentagem de inibição da germinação das sementes.

## **2. Teste de inibição da germinação em pré- emergência *in vitro* – Ensaio UFV**

Simultaneamente, no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa (MG), foi realizado um teste de inibição da germinação em pré- emergência *in vitro* em placas de Petri contendo meio de cultura ágar-água (AA). O isolado COAD 1066B foi recuperado do glicerol em placas de Petri contendo meio BDA e levados a BOD sob fotoperíodo de 12h de luz a 25° C por 7 dias. Realizou-se raspagem das placas utilizando 5 a 7 mL água autoclavada e transferido assepticamente para erlenmeyers de 1000 mL contendo 500 mL de meio BD (meio BDA sem adição de ágar). Os erlenmeyers foram colocados em agitador orbital a 150 rpm por sete dias em temperatura ambiente. Após esse período, realizou-se uma filtração a vácuo até que não se observasse nenhum escorrimento do meio líquido para o interior do Kitassato. O micélio retido no papel de filtro foi utilizado para preparar a suspensão do fungo, onde foi batido no liquidificador, com relação massa/ volume conhecida usando solução de Tween 80 0,05 % v/v.

Foram utilizadas 15 sementes de *C. canadensis* por placa de Petri e 7 repetições por tratamento. Realizou-se inicialmente a desinfestação superficial das sementes com hipoclorito de sódio a 1%, por 2 minutos, em seguida as sementes foram secas em papel filtro esterilizado por 10 minutos. Com o auxílio de um borrifador manual fez-se a aplicação da suspensão até o completo molhamento superficial, aguardou-se 10 minutos e foi realizada a transferência das sementes para as placas de Petri contendo meio AA. Em seguida as placas de Petri foram levadas a BOD sob fotoperíodo de 12h de luz a 25° C por 7 dias. As avaliações foram realizadas ao 7°, 14°, 21° e 28° dias após montagem do experimento, realizando a contagem do número de plântulas emergidas. Os tratamentos consistiram em tratamento controle, tratamento com solução de Tween 80% 0,05% v/v, glyphosate dose de 7,3 mL/ L, filtrado de cultura do isolado COAD 1066B e o fungo COAD 1066B nas porcentagens de concentração de 1%, 2.5%, 5%, 7.5% e 10% m/v.

## **3. Aplicação de suspensão de fragmentos miceliais de *Phoma conyzaphthora* via solo**

Foram repicados, separadamente, os quatro isolados de *P. conyzaphthora* para placas de Petri contendo o meio de cultura (BDA). As placas de Petri foram incubadas em BOD por 7 dias sob fotoperíodo de 12h de luz a 25° C para colonização completa das placas de Petri. Para produção do inóculo, discos de micélio da margem do crescimento fúngico de cada

isolado foi adicionado separadamente e identificados em erlemeyers contendo o meio de cultura líquido BD (batata dextrose). Os erlemeyers contendo meio BD e fragmentos dos isolados fúngicos foram levados ao agitador orbital (shaker) a 150 rpm por sete dias. Após o período de sete dias houve o crescimento e a formação da biomassa micelial, consequentemente peneirou-se a biomassa em peneira de malha fina e a biomassa obtida foi transferida para o funil (suporte) para realizar a filtração utilizando a bomba de vácuo com kitassato, utilizando um filtro de papel de filtração mais rápida. A biomassa foi transferida sobre papel filtro esterilizado por 10 minutos a fim de retirar a umidade. Subsequentemente, foi pesado 10 g do material fresco e homogeneizado com 100 mL água estéril + Tween 80 (0,05%).

Realizou-se a desinfestação das sementes de *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis* em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 3 min. Após secarem, foram semeadas 10 sementes superficialmente em vasos de 100 mL contendo uma mistura de substrato estéril, solo tipo latossolo vermelho e areia em uma proporção de 1:2:2. Após o semeio das sementes de buva, foram realizadas, separadamente, as pulverizações das suspensões de fragmentos de micélio dos quatro isolados de *Phoma conyzaphthora*. Foram pulverizados 7 mL de suspensão micelial de cada isolado/vaso. Para as testemunhas foram utilizados apenas água estéril + Tween 80 (0,05%). Após a aplicação das suspensões fez-se uma câmara úmida, onde foram colocados sacos plásticos sobre os vasos por 48 horas. Após esse período, com a retirada das câmaras úmidas os vasos foram irrigados com água uma vez por dia para evitar ressecamento. A avaliação foi realizada aos 14°, 21°, 28° e 35° dias após o semeio, onde foi contabilizado o número de plântulas germinadas por vaso. Foram realizadas 7 repetições para cada tratamento.

#### **4. Aplicação de suspensão de *Phoma conyzaphthora* utilizando o arroz colonizado como substrato**

Concomitantemente ao experimento anterior, foi conduzido um ensaio semelhante, em DIC com 5 repetições para cada tratamento. Os isolados fúngicos foram mantidos em placa de Petri contendo o meio de cultura BDA a 25° C por 7 dias. Em seguida 5 discos de micélio dos quatro isolados foram transferidos, separadamente, para erlenmeyers contendo arroz parboilizado previamente autoclavado (10 mL de água por 10g de arroz) e levados a BOD sob fotoperíodo de 12h de luz a 25° C por 7 dias. Após o crescimento e a formação da biomassa micelial, foi pesado 50g de arroz colonizado de cada um dos isolados, e em seguida triturou-se no liquidificador juntamente com 50 mL de água estéril + Tween 80 (0,05%). A biomassa

obtida foi filtrada. Posteriormente as suspensões foram colocadas em borrifadores manuais e pulverizou-se aproximadamente 7 mL/ vaso.

Realizou-se a desinfestação das sementes em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 3 minutos. Semeou-se 10 sementes de *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*, separadamente, em vasos de 100 mL contendo uma mistura de substrato estéril e solo. Para a testemunha foi utilizado apenas água estéril + Tween 80 (0,05%). O Tween 80 (0,05%) foi utilizado em todos os tratamentos como adjuvante. Após a aplicação das suspensões fez-se uma câmara úmida, por 48 horas. Avaliou-se a emergência de plântulas em cada vaso, contabilizando o número de plântulas germinadas e analisando a presença e desenvolvimento de cada isolado fúngico ao 14°, 21° e 28° dias após o semeio.

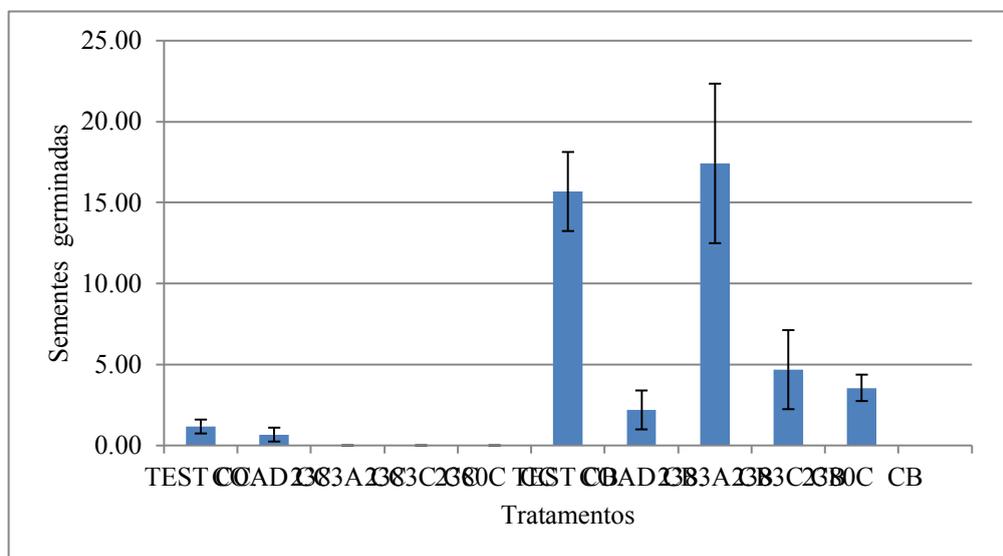
## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Microbiolização de sementes com fragmentos de micélio dos isolados de *Phoma conyzaphthora* in vitro**

No ensaio *in vitro* de microbiolização de sementes foi observado a colonização de sementes por *P. conyzaphthora* com a formação de picnídios e conídios do fungo próximos às sementes não germinadas. O isolado COAD 1066B resultou em 92,45% de inibição da germinação de sementes de *Conyza bonariensis*, se destacando entre os isolados. Os demais isolados apresentaram as seguintes porcentagens de inibição, COAD 2383C 83,02%, COAD 2383A 5,66%, COAD 2380C 79,24%.

As sementes de *C. canadensis* apresentaram um baixo vigor germinativo e para os demais testes se adquiriu novas sementes. Portanto essa espécie não foi considerada nesse ensaio.

**Figura 1** – Número de sementes de *C. bonariensis* germinadas após a microbiolização com fragmentos de micélio dos isolados de *Phoma conyzaphthora* ao 17º dia. Intervalo de confiança de 95% para as médias.



TEST: testemunha, CC: *Conyzacandensis* e CB: *Conyzabonariensis*.

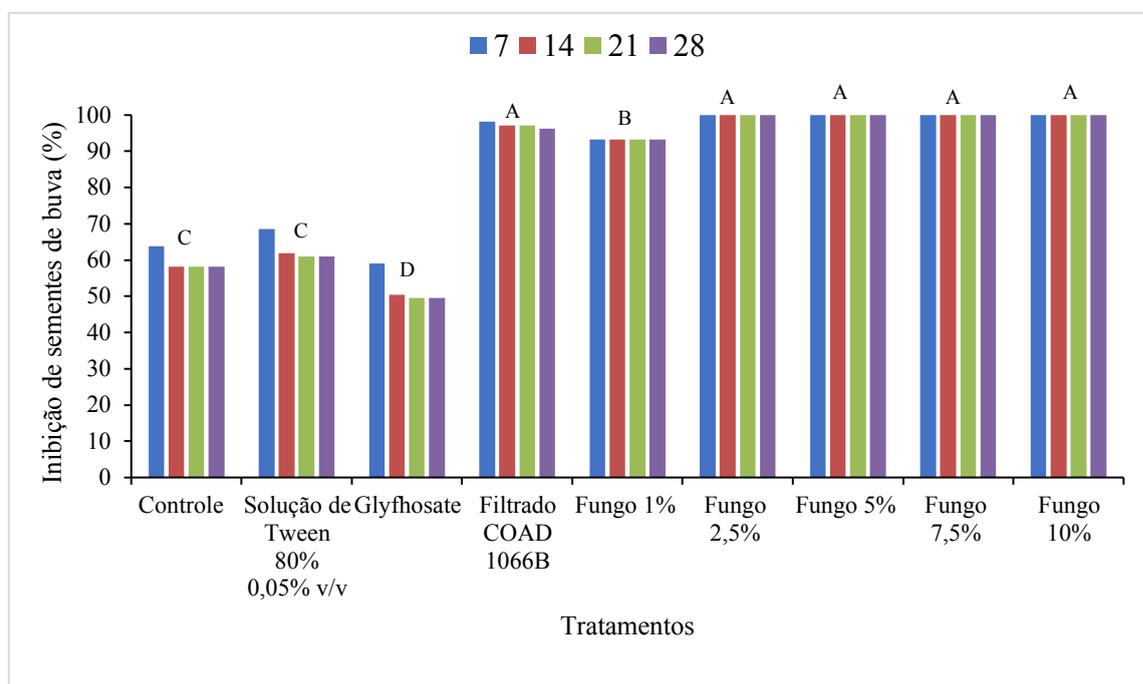
## 5.2 Teste de inibição da germinação em pré - emergência *in vitro* – Ensaio UFV

Para o teste de germinação de sementes em pré-emergência *in vitro*, o tratamento com o herbicida glyphosate apresentou maior porcentagem de germinação das sementes de buva.

Os tratamentos utilizando o isolado COAD 1066B nas concentrações de 2,5% m/v, COAD 1066B 5% m/v, COAD 1066B 7,5% m/v, COAD 1066B e 10% m/v apresentaram maior inibição de germinação de plântulas de buva, chegando aos 28º dia com 100% de inibição, bem como o tratamento filtrado de cultura do COAD 1066B, que apresentou 96% de inibição de germinação ao 28º dia. (Figura 2).

A solução de Tween 80% (0,05% v/v) não influenciou na germinação das sementes de buva. O Tween 80% 0,05% foi utilizado como adjuvante base para os tratamentos para aumentar o espalhamento do fungo. No trabalho de Todero et al. (2018), o uso de adjuvantes potencializou o efeito bioherbicida, reduzindo até 39% da tensão superficial em comparação com a água e 54% com filtrado de cultura, resultando em uma melhor distribuição do inóculo nas superfícies das plantas.

**Figura 2-** Porcentagem de inibição da germinação das sementes de buva (*Conyza canadensis*) *in vitro* – Ensaio UFV

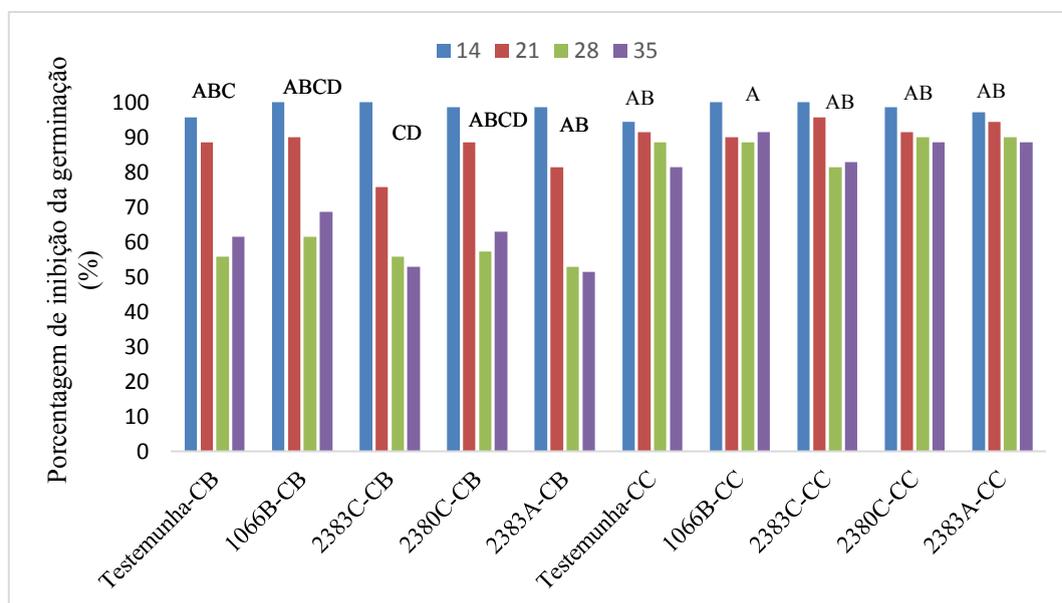


Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey para um nível de significância de 5%. Avaliações realizadas aos 7, 14, 21 e 28 dias após semeio.

### 5.3 Aplicação de suspensão de fragmentos miceliais de *Phoma conyzaphthora* via solo

Para os testes de inibição de germinação de sementes com uso de suspensão de micélio de *Phoma conyzaphthora* via solo, ao 7º dia após o semeio não haviam germinações de plântulas e ao 14º dia as germinações eram baixas mesmo para os tratamentos testemunhas (Figura 3). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos isolados em relação as testemunhas quanto a inibição da germinação das sementes de buva ao 35º dia, pelo teste de Tukey para um nível de significância de 5%.

**Figura 3** - Porcentagem de inibição da germinação de sementes de buva (*Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*) com aplicação de suspensão de fragmentos miceliais de *Phoma conyzaphthora* via solo



Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey para um nível de significância de 5%. CC: *Conyza canadensis* e CB: *Conyza bonariensis*. Avaliações realizadas aos 14, 21, 28 e 35 dias após semeio.

Foi observada uma baixa porcentagem de germinação das sementes das duas espécies de buva, mesmo na testemunha, isto em decorrência das questões climáticas já que a buva é uma planta daninha que apresenta germinação reduzida em temperaturas de 15, 35 e 40° C. Um estudo realizado na Austrália demonstrou que a temperatura ótima para germinação de sementes de *C. bonariensis*, é 20°C (ROLLIN & TAN, 2006).

A região de Monte Carmelo apresentou temperaturas mínimas de 16,9° C a 9,5° C no mês de maio, com temperatura média de 18,1° C no período onde foram realizado os experimento. Fonte: Estação Metereológica (SISMET COOXUPÉ).

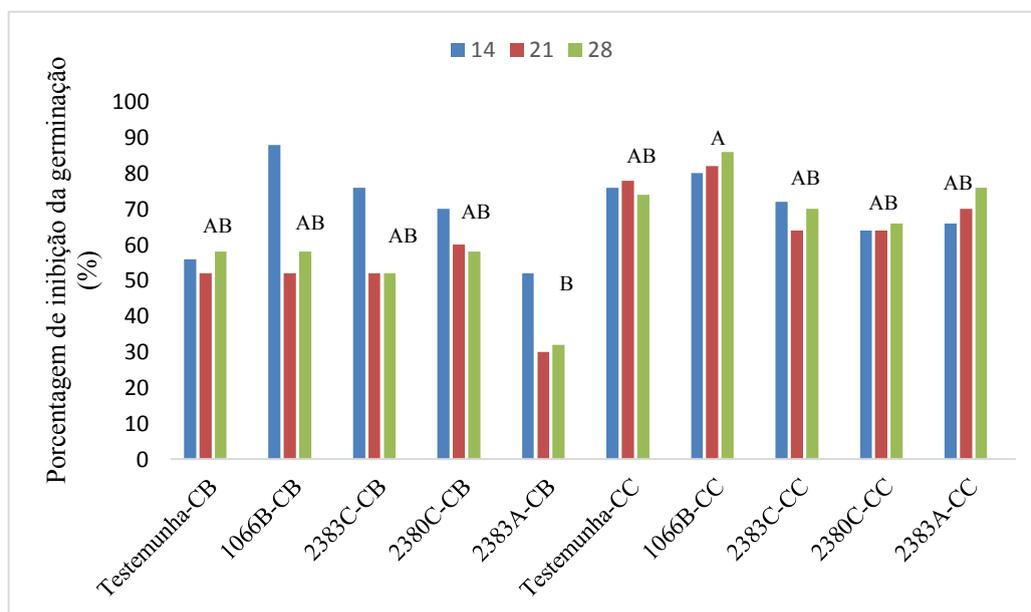
#### 5.4 Aplicação de suspensão de *Phoma conyzaphthora* utilizando o arroz colonizado como substrato

Para os testes realiados com a aplicação de suspensão de *Phoma conyzaphthora* utilizando arroz colonizado, ao realizar a avaliação ao 7° dia após semeio notou-se que as sementes não haviam germinado então a primeira avaliação foi realizada ao 14° dia após semeio. Ao 14° dia após o semeio, o tratamento que mais se destacou quanto a inibição da germinação das sementes de buva foi o isolado COAD 1066B, apresentando 88% de inibição

das sementes (Figura 4). Este isolado aos 21° e 28° dias apresentou resultados próximos aos apresentados pelos isolados COAD 2380C e COAD 2383C para *Conyza bonariensis*.

O isolado COAD 2383A foi o que apresentou menor inibição de germinação para *Conyza bonariensis*. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos demais isolados em relação as testemunhas quanto a inibição da germinação das sementes de buva ao 28° dia após semeio, pelo teste de Tukey para um nível de significância de 5%.

**Figura 4** - Porcentagem de inibição da germinação de sementes de buva (*Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*) com suspensão obtida em arroz colonizado



Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey para um nível de significância de 5%. CC: *Conyza canadensis* e CB: *Conyza bonariensis*. Avaliações realizadas aos 14, 21 e 28 dias após semeio.

## 6. CONCLUSÃO

Ensaio UFV - os tratamentos do fungo COAD 1066B nas porcentagens de concentração de 2,5%, 5%, 7,5% e 10% m/v, foram os tratamentos que apresentaram maior inibição de germinação das sementes de buva, chegando aos 28° dia com 100% de inibição. O tratamento filtrado do isolado COAD 1066B apresentou 96% de inibição ao 28° dia. O tratamento COAD 1066B 2.5% foi melhor para inibição da germinação de sementes de *C. canadensis*.

O tratamento COAD 1066B com fragmentos de micélio na concentração  $1 \times 10^6$  fragmentos/mL foi o melhor tratamento para inibir a germinação de *C. bonariensis*.

O isolado COAD 1066B possui potencial para ser utilizado como agente de controle biológico nas espécies *C. bonariensis* e *C. canadensis*.

Novos ensaios devem ser conduzidos em condições ótimas para a germinação das sementes das espécies de buva, para corroborar o efeito inibitório de *Phoma conyzaphthorae* sobre as sementes dessas espécies observado *in vitro*.

## 7. REFERÊNCIAS

- ADEGAS, F. S.; DA SILVA, A. F.; CONCENÇO, G. Controle biológico de plantas daninhas. 2022.
- BAILEY, K. L. et al. **The effects of *Phomamacrostoma* on nontarget plant and target weed species.** *Biological Control*, v. 58, 379–386, 2011.
- BRUCE JA, Kells JJ. 1990. **Horseweed (*Conyza canadensis*) control in no-tillage soybeans (*Glycine max*) with preplant and preemergence herbicides.** *Weed Technology* 4 (3): 642-647
- CHARUDATTAN, Raghavan; DINOOR, Amós. Controle biológico de plantas daninhas com fitopatógenos: realizações e limitações. *Proteção de Culturas*, v. 19, n. 8-10, p. 691-695, 2000.
- CORDEAU, Stéphane et al. **Bioherbicidas: Mortos na água? Uma revisão dos produtos existentes para o manejo integrado de ervas daninhas.** *Proteção de cultivos*, v. 87, p. 44-49, 2016.
- DA SILVA, Antonia Francilene Alves et al. Interferência de plantas daninhas sobre plantas cultivadas. *Agropecuária científica no semiárido*, v. 8, n. 1, p. 01-06, 2012.
- DE MORAES, Rodrigo Fracalossi. **Agrotóxicos no Brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória.** Texto para Discussão, 2019.
- DE OLIVEIRA JR, Rubem Silvério; CONSTANTIN, Jamil; INOUE, Miriam Hiroko. *Biologia e manejo de plantas daninhas.* Curitiba, Brasil: **Omnipax**, 2011.
- DUARTE, Lidiane Leal; SANTOS, Fabiana Maria Coutinho; BARRETO, Robert Weingart. Mycobiota of the weed *Conyza canadensis* (Asteraceae) in Brazil. *Fungal biology*, v. 120, n. 9, p. 1118-1134, 2016.

EMBRAPA. Visão 2030 : o futuro da agricultura brasileira. – Brasília, DF : **Embrapa**, 2018.

GESSEL, M. J. Glyphosate-resistant horseweed from Delaware. **WeedSci.**, v. 49, p. 703-705, 2001.

HEAP, I.; Duke, SO Visão geral das ervas daninhas resistentes ao glifosato em todo o mundo. *Pragas. Gerenciar ciência* **2018**, 74, 1040–1049.

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

LAZAROTO, Carlos Alberto; FLECK, Nilson Gilberto; VIDAL, Ribas Antonio. Biologia e ecofisiologia de buva (*Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*). **Ciência Rural**, v. 38, p. 852-860, 2008.

LORENZI, H. Plantas daninhas no Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. 3.ed., **Nova Odessa**. 2000. 608p.

MACEDO, D. M.; PEREIRA, O. L.; HORA JÚNIOR, B. T.; WEIR, B. S.; BARRETO, R. W. Mycobiota of the weed *Tradescantia fluminensis* in its native range in Brazil with particular reference to classical biological control. **Australasian Plant Pathology**, v. 45, p. 45-56, 2016

MUZIK, T.J. Weed biology and control. **New York: McGrawHill**. 1970. 273p.

PIASECKI C, Carvalho IR, Ávila LA, Agostinetto D, Vargas L. Glifosato e Saflufenacil: Elucidando sua ação combinada no controle de *Conyza bonariensis* resistente ao glifosato. *Agricultura*. 2020, 10, 236.

ROLLIN, MJ et al. Primeiro relato de buva de folha de linho resistente ao glifosato no oeste de Darling Downs. In: **Fleabane. Anais de um workshop realizado no DPI&F em Toowoomba, Austrália, 25 de fevereiro de 2004**. CRC para Australian Weed Management, 2004. p. 7-15.

SANTOS, F. M. et al. Differential susceptibility of biotypes of *Conyza sumatrensis* to Chlorimuron-ethyl herbicide. **Planta Daninha**, v. 32, n. 2, p. 427-435, 2014.

THEBAUD, C.; ABBOTT, RJ Caracterização de doenças invasivas *Conyza* espécies (Asteraceae)

na Europa: característica quantitativa e análise de isoenzimas. *Sou. J. Bot.*, v. 82, n. 1, pág. 360-368, 1995.

TODERO, Izelmar et al. Formulação de bioherbicida com metabólitos de *Phoma* sp. **Scientia Horticulturae**, v. 241, p. 285-292, 2018.

ULZURRUN, PATRICIA DIEZ DE et al. Caracterización morfológica de *Conyza blakei*, *Conyza bonariensis*, *Conyza sumatrensis* var. *sumatrensis* y *Conyza lorentzii* en el sudeste bonaerense (Argentina). **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, v. 53, n. 3, p. 1-10, 2018.

VARGAS, L. et al. Buva (*Conyza bonariensis*) resistente ao glyphosate na região sul do Brasil. **Planta Daninha**, v. 25, p. 573-578, 2007.

VARGAS, Leandro et al. Resistência de plantas daninhas no Brasil: Histórico, custo, eo desafio do manejo no futuro. **Viabilidad del glifosato en sistemas productivos sustentables**, p. 99-110, 2013.

VIEIRA, Bruno Sérgio; BARRETO, Robert Weingart; NECHET, K. de L. Controle biológico de plantas daninhas com fungos fitopatogênicos. 2018.

WALKER, S., M. Widderick, and H. Wu. Proceedings of Weeds CRC and Cotton CRC workshop on fleabane, March 2004 Toowoomba, QLD, Australia, 2004.

WATSON AK. The classical approach with plant pathogens. In: D. O. TeBeest, ed. *Microbial Control of Weeds*. New York: Chapman and Hall. p 3-23, 1991.

YAMASHITA, O. M.; GUIMARÃES, S. C. Germinação de sementes de *Conyza canadensis* e *Conyza bonariensis* em diferentes condições de temperatura e luminosidade. **Planta Daninha**, v.29,p.333-342,2011.