

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CLAUDIA FABBRIS

PRIMEIRO RELATO DE *Bipolaris* spp. CAUSANDO LESÕES FOLIARES EM *Digitaria
insularis* NO BRASIL E SEU POTENCIAL COMO AGENTE DE CONTROLE
BIOLÓGICO

Monte Carmelo - MG
2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CLAUDIA FABBRIS

PRIMEIRO RELATO DE *Bipolaris* spp. CAUSANDO LESÕES FOLIARES EM *Digitaria insularis* NO BRASIL E SEU POTENCIAL COMO AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO

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

CLAUDIA FABBRIS

PRIMEIRO RELATO DE *Bipolaris* spp. CAUSANDO LESÕES FOLIARES EM *Digitaria insularis* NO BRASIL E SEU POTENCIAL COMO AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO

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, 2 de fevereiro de 2023.

Banca Examinadora



Prof. Dr. Bruno Sérgio Vieira
Orientador



Dr.ª. Thaisa Ferreira da Nóbrega
Membro da Banca



Dr.ª. Eliane Mayumi Inokuti
Membro da Banca

Monte Carmelo - MG
2023

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar ao meu lado em todas as fases da minha vida.

Ao meu orientador, Bruno Sérgio Vieira, por ter desempenhado tal função com dedicação, paciência e amizade.

À KOPPERT que me concedeu a oportunidade de trabalhar com o time e pela bolsa na realização desse projeto.

Aos meus pais, Ana Claudia e Paulo, e ao meu irmão, Paulo, por todo apoio e incentivo, por nunca terem soltado a minha mão e por sempre acreditarem em mim. Não existem palavras suficientes para expressar o quanto sou grata por tudo o que fizeram por mim.

As minhas avós, Ana e Neuza, por me ensinarem valores que eu jamais esquecerei.

Ao meu namorado, por todo apoio, incentivo e cuidado.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia (LAMIF), em especial, ao Fernando, Juliana e Thúlio pela amizade e contribuições no desenvolvimento do projeto.

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

Aos amigos e familiares que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes na minha vida.

À Universidade Federal de Uberlândia e o seu corpo docente que demonstrou estar comprometido com a qualidade e excelência do ensino.

À todos aqueles que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS.....	9
2.1. GERAL.....	9
2.2. ESPECÍFICOS	9
3. REFERENCIAL TEÓRICO	10
3.1. CAPIM-AMARGOSO	10
3.2. RESISTÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS A HERBICIDAS	10
3.3. HERBICIDAS INIBIDORES DE ACCASE	11
3.4. GLYPHOSATE	12
3.5. CONTROLE BIOLÓGICO DE PLANTAS DANINHAS.....	12
3.6. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS	13
3.7. FILOGENIA.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1. COLETA DE AMOSTRAS	14
4.2. OBTENÇÃO DE ISOLADOS	14
4.3. TAXONOMIA	15
4.3.1. Identificação e caracterização morfológica	15
4.3.2. Caracterização molecular.....	15
4.4.1. Produção de inóculo.....	16
4.4.2. Obtenção de sementes.....	16
4.4.3. Teste de patogenicidade.....	16
4.4.4. Avaliação do potencial de <i>Bipolaris</i> spp. para o controle de <i>D. insularis</i> em pré-emergência.....	17
4.4.5. Avaliação do potencial de <i>Bipolaris</i> spp. para o controle de <i>D. insularis</i> em pós-emergência.....	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5.2. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	20
5.3. TESTE DE PATOGENICIDADE COM DISCOS DE MICÉLIO DE <i>Bipolaris</i> spp.	20

5. 4. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE <i>BIPOLARIS</i> SPP. PARA O CONTROLE DE <i>D. INSULARIS</i> EM PRÉ-EMERGÊNCIA	22
5.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE <i>Bipolaris</i> spp. PARA O CONTROLE DE <i>D. insularis</i> EM PÓS-EMERGÊNCIA COM SUSPENSÃO DE ESPOROS	23
6. CONCLUSÕES.....	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

RESUMO

Digitaria insularis é uma planta daninha nativa das regiões tropicais e subtropicais da América e de difícil controle devido à resistência ao glyphosate e a herbicidas inibidores da ACCase. Dessa forma, torna-se viável introduzir o controle biológico como uma das alternativas no manejo integrado de plantas daninhas e, em especial, do capim-amargoso. Dessa forma, foi feito um levantamento preliminar na região da Zona da Mata de Minas Gerais que resultou em dois isolados fúngicos fitopatogênicos associados a *D. insularis*. O presente trabalho teve por objetivo a caracterização e a descrição completa dos isolados fúngicos coletados e identificados como pertencentes ao gênero *Bipolaris*, comprovada pela identificação e caracterização morfológica. Além disso, objetivou-se nesse trabalho testar preliminarmente esse isolados quanto ao potencial como agentes de biocontrole para o capim-amargoso. A caracterização molecular com base nas regiões ITS e LSU não indicou a espécie dos isolados fúngicos devido a não especificidade das regiões para os fungos do gênero *Bipolaris*. Através da avaliação do potencial de isolados de *Bipolaris* spp. para o controle de *D. insularis* em pré e pós-emergência, notou-se que os isolados fúngicos apresentam potencial como agentes de controle biológico contra *D. insularis*.

Palavras-chave: patogenicidade, taxonomia, controle biológico.

ABSTRACT

Digitaria insularis is a weed native to tropical and subtropical regions of America and difficult to control due to resistance to glyphosate and ACCase inhibitor herbicides. Thus, it is feasible to introduce biological control as an alternative in the integrated management of weeds and, in particular, of the sourgrass. Thus, a preliminary survey was conducted in the Zona da Mata regions of Minas Gerais, which resulted in two phytopathogenic fungal isolates associated with *D. insularis*. The present work aimed the characterization and complete description of the fungal isolates collected and identified as belonging to the genus *Bipolaris*, confirmed by the identification and morphological characterization. In addition, the objective of this work was to preliminarily test these isolates for their potential as biocontrol agents for sourgrass. Molecular characterization based on ITS and LSU regions did not indicate the species of the fungal isolates due to the non-specificity of the regions for fungi of the genus *Bipolaris*. Through the evaluation of the potential of *Bipolaris* spp. for the control of *D. insularis* in pre- and post-emergence it was noted that the fungal isolates present potential as a biological control agent against *D. insularis*.

Key words: pathogenicity, taxonomy, biological control.

1. INTRODUÇÃO

O capim-amargoso (*Digitaria insularis*) é uma planta daninha nativa das regiões tropicais e subtropicais da América (MACHADO *et al.*, 2008), pertencente à família Poaceae. No Brasil, está atribuído principalmente no estado do Paraná e nas regiões do Sudeste e Centro-Oeste (CORTEVA AGRISCIENCE, 2019).

Existem biótipos de *D. insularis* que são resistentes ao glyphosate devido ao menor fluxo de absorção, menor translocação e maior rapidez na metabolização dessa molécula em aminometilfosfônico, glioxilato e sarcosina (CARVALHO, 2011). As plantas de capim-amargoso são mais sensíveis ao glyphosate no início do seu desenvolvimento, aproximadamente até 40 dias após a sua emergência quando os rizomas não estão formados completamente (MACHADO *et al.*, 2008).

Além do glyphosate, há biótipos que possuem resistência a herbicidas inibidores da Acetil CoA carboxilase – ACCase (PAES, 2018), mas, ainda assim, esse grupo de herbicidas é o mais utilizado no controle químico em pós-emergência (LOPES *et al.*, 2021). Segundo Carvalho (2013), no Brasil, os inibidores a ACCase são divididos em dois grupos químicos: Ariloxifenoxi-propionatos (FOPs) e Ciclohexanodionas (DIMs). Devido a essa problemática relacionado a existência de biótipos de capim amargoso resistente a herbicidas químicos, torna-se viável introduzir o controle biológico como uma das alternativas no manejo integrado de plantas daninhas e, em especial, do capim-amargoso.

O controle biológico consiste na supressão ou estabilização de populações de espécies indesejáveis (no caso, de plantas daninhas) em níveis subeconômicos, utilizando-se inimigos naturais (VIEIRA; BARRETO; NECHET, 2018). Como alvo para o controle biológico, *D. insularis* apresenta-se como particularmente interessante, e como para outras plantas daninhas, os fungos fitopatogênicos como inimigos naturais com grande potencial (VIEIRA; BARRETO; NECHET, 2018).

Embora o reconhecimento de que os fitopatógenos (e em particular os fungos) são importantes inimigos naturais de plantas daninhas seja antigo, o seu uso em programas de controle biológico é relativamente recente, com início nos anos 70 (OLIVEIRA; BRIGHENTI, 2018). Diversos autores publicaram revisões sobre este tema desde então (HASAN, 1974; WAPSHERE, 1982; TEMPLETON, 1984; EVANS; ELLISON, 1990; AYRES; PAUL, 1990; CHARUDATTAN, 1991; WATSON, 1991; TEBEEST *et al.*, 1992; JULIEN; WHITE, 1997). Há duas abordagens principais para o uso de fitopatógenos como

agentes de controle biológico de plantas daninhas: o método clássico ou inoculativo que envolve a introdução de um patógeno inimigo natural de uma “planta-alvo” desde o seu centro de origem até a nova área de distribuição da planta, onde está livre de seus inimigos naturais tornando-se agressiva, visando restabelecer o equilíbrio; e o método de micoherbicida, ou inundativo, tipicamente envolvendo o uso de fungos fitopatogênicos endêmicos, já associados à planta-alvo, que são produzidos em massa, formulados e aplicados de modo semelhante a um herbicida químico onde a população da planta daninha está estabelecida (MCRAE, 1988), sendo esta última abordagem objeto do presente projeto.

O controle biológico é muito específico, com capacidade de controlar somente uma ou poucas espécies de um gênero. Além disso, é necessário a alta seletividade para que não provoque danos as culturas de interesse do agronegócio (FONTES *et al.*, 2003).

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo a realização de um levantamento preliminar de capim amargoso associado a sintomas de manchas foliares na região da Zona da Mata de Minas Gerais e identificar através da caracterização morfológica e molecular as espécies associadas a esta planta daninha. Ademais foi testado o potencial dos isolados encontrados como agentes de controle biológico para o capim amargoso.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Caracterização dos isolados fúngicos coletados e identificados preliminarmente como pertencentes ao gênero *Bipolaris*.

2.2. ESPECÍFICOS

- Identificar, descrever e depositar material herborizado dos fungos obtidos;
- Depositar os isolados fúngicos em coleções de culturas;
- Confirmar a patogenicidade dos fungos encontrados em plantas de capim-amargoso;
- Identificação morfológica e molecular dos isolados obtidos de capim-amargoso;
- Explorar o potencial dos isolados como agentes de biocontrole do capim-amargoso;
- Avaliar o potencial biológico dos isolados coletados.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. CAPIM-AMARGOSO

O rendimento e produtividade dos cultivos agrícolas são influenciados por fatores abióticos (YAMASHITA *et al.*, 2009) e bióticos (SILVA *et al.*, 2017), de forma direta ou indireta (PITELLI, 1987). As plantas daninhas são um dos fatores bióticos de maior importância, devido à alta competição por água, luz e nutrientes (NERY, 2017). Atualmente, o manejo químico é o método mais adotado para o controle das plantas daninhas em cultivos agrícolas (SIQUEIRA, 2013). O uso intensivo dos herbicidas com o mesmo mecanismo de ação tem contribuído com a contaminação ambiental e com a seleção de biótipos resistentes (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2003). O capim-amargoso é uma planta daninha que tem prejudicado muito os sistemas de produção devido à alta dificuldade de controle (PLINE-SRNIC, 2006).

Trata-se de uma gramínea perene, herbácea, rizomatosa, entouceirada, de colmos estriados com 50 a 100 cm de altura, inflorescência em panículas, sementes pequenas e pilosas (GRAZZIERO *et al.*, 2015). Apresenta metabolismo do tipo C₄, de crescimento acelerado e grande capacidade competitiva (LOPES *et al.*, 2021).

Os biótipos resistentes possuem maior velocidade de crescimento do que as plantas daninhas suscetíveis (MELO, 2011) e produzem sementes que germinam mais rápido do que as plantas daninhas suscetíveis, apresentando baixo nível de dormência (BARROSO *et al.*, 2015). A semente é facilmente disseminada pelo vento devido ao revestimento por cerdas e apresenta boa porcentagem de germinação (LORENZI, 2008), sendo mais elevada em maiores faixas de temperatura, profundidade de semeadura e déficit hídrico (MARTINS; BARROSO; ALVES, 2017). As condições ideais para a germinação são temperaturas próximas a 35 °C, luz intermitente e disponibilidade de água, que favorecem a atividade enzimática das sementes e o processo de embebição (MENDONÇA *et al.*, 2014).

3.2. RESISTÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS A HERBICIDAS

A resistência de plantas daninhas a herbicidas é a capacidade natural e herdável de alguns bióticos em sobreviver e se reproduzir após a exposição à dose de um herbicida que seria letal a uma população suscetível da mesma espécie (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2003). Segundo o Herbicide Resistance Action Committee (HRAC, 2022), há 267 espécies de plantas daninhas resistentes a herbicidas globalmente, sendo 154 eudicotiledôneas e 113

monocotiledôneas, relatadas em 97 culturas em 72 países. No Brasil, há 47 biótipos resistentes registrados.

No Brasil, o primeiro relato de um biótipo resistente de capim-amargoso ao glyphosate foi em 2007/08 no Paraná. A partir desse caso foi comprovado a resistência dessa planta daninha em outras regiões (VARGAS *et al.*, 2016). Até o momento, não existe assenso da comunidade científica sobre os mecanismos de resistência que o capim-amargoso possui ao herbicida glyphosate (PAES, 2018).

Na década de 90, era intensa a aplicação de herbicidas inibidores da Acetil CoA carboxilase (ACCase) para controlar monocotiledôneas. Dessa forma, o primeiro relato no Brasil, de uma gramínea resistente a herbicidas inibidores da enzima ACCase foi a papuã (*Brachiaria plantaginea*) (VARGAS *et al.*, 2016). Os problemas pelo uso contínuo dessas moléculas aumentaram e as lavouras apresentaram biótipos resistentes a esse grupo de herbicida (exemplo: leiteiro e picão-preto), principalmente na região do Sul do Brasil (VARGAS *et al.*, 2016). Segundo Takano *et al.* (2020), o capim-amargoso, além de ser resistente ao glyphosate, também possui resistência aos herbicidas inibidores da enzima ACCase do grupo químico do Ariloxifenoxi-propionatos (FOPs), tanto simples quanto múltipla com os inibidores da 5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintase (EPSPS).

3.3. HERBICIDAS INIBIDORES DE ACCASE

De acordo com Carvalho (2013), os herbicidas inibidores da ACCase, utilizados no Brasil, são divididos em dois grupos químicos: Ariloxifenoxi-propionatos (FOPs) e Ciclohexanodionas (DIMs). São graminicidas exclusivos sistêmicos, pós-emergente e a seletividade para folhas largas depende da forma da enzima ACCase presente no citoplasma e cloroplasto.

Há dois tipos de plantas que possuem a enzima ACCase em seu citoplasma e cloroplasto: eudicotiledôneas e monocotiledôneas. A primeira contempla uma forma procariótica da enzima no cloroplasto, ou seja, a enzima ACCase é composta de diversas subunidades e a forma eucariótica, uniproteica, no citoplasma; a segunda contempla somente a forma eucariótica tanto no citoplasma quanto no cloroplasto. Apenas a produção de forma eucariótica é inibida por esses herbicidas, ou seja, afeta somente as gramíneas (ROSS; CHILDS, 1996).

Na literatura já foram descritos níveis de controle de biótipos resistentes com a aplicação do glyphosate juntamente com os inibidores de ACCase. No entanto, há biótipos de *D. insularis* que são resistentes aos inibidores de ACCase e que foram descritos no Brasil. O mais preocupante para os pesquisadores é o surgimento de resistência múltipla dessa planta daninha ao glyphosate e aos inibidores de ACCase (PAES, 2018).

3.4. GLYPHOSATE

Em 1950, o glyphosate foi sintetizado como potencial quelante industrial, mas em 1970 passou a ser empregado como herbicida sistêmico, não seletivo, pós-emergente e com alta eficiência de controle de diversas plantas daninhas (IARC, 2017). Originalmente foi fabricado nos Estados Unidos com uso registrado em mais de 130 países (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2002; IARC, 2017).

O herbicida glyphosate é classificado como inibidores de 5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintase (EPSPs) e seu grupo químico é glicina substituída (ROMAN *et al.*, 2005). A resistências das plantas daninhas por herbicidas inibidores da EPSPs ocorre devido a mutação do gene das mesmas que codifica a enzima do sítio-ativo (VAN BRUGGEN *et al.*, 2018), ocasionado pelas altas doses e ação prolongada do produto (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2002).

A resistência compromete o controle das plantas daninhas devido ao aumento na dosagem juntamente com os custos de produção. Por exemplo, Vargas *et al.* (2016) verificaram que, em geral, com a ausência de resistência, o custo de controle foi de R\$ 90,00 por hectare, que consistia em uma aplicação de glyphosate na dessecação e duas em pós-emergência. Com a resistência, o custo passa a ser de R\$ 140,00, devido a necessidade de aplicar um herbicida alternativo associado com o glyphosate. Comparando os dois casos, há um aumento de 57% no custo de controle, aproximadamente.

3.5. CONTROLE BIOLÓGICO DE PLANTAS DANINHAS

O objetivo do controle biológico é a redução da população de plantas daninhas abaixo do nível de dano econômico (SILVA *et al.*, 2018). Dentre os agentes, os fungos fitopatogênicos são de grande relevância, podendo ser utilizados em duas abordagens: método clássico ou inoculativo e método de mico-herbicida (VIEIRA; BARRETO; NECHET, 2018).

Geralmente, a eliminação de uma espécie de planta daninha em uma comunidade infestante pode abrir espaço para o desenvolvimento de diversas espécies. Porém se a planta daninha eliminada for de difícil controle sua supressão é extremamente significativa e positiva, por exemplo, a buva (*Conyza* spp.) ou capim-amargoso (*D. insularis*) (REICHERT JÚNIOR, 2017). Há relato de que o *Bipolaris euphorbiae* no controle de leiteiro (*Euphorbia heterophylla*) (NECHET; BARRETO; MIZUBUTI, 2006).

De acordo com Gurr e Wratten (2000) há casos de sucesso do controle biológico de plantas daninhas: *Alternaria alternata* no controle de aguapé (*Eichhornia crassipes*) e cambará (*Lantana camara*); *Curvularia intermedia* no controle de capim-colchão (*Digitaria sanguinalis*), caruru (*Amaranthus retroflexus*), grama-seda (*Cynodon dactylon*), capim-arroz (*Echinochloa crusgalli*), arroz-vermelho (*Oryza sativa*) e massambará (*Sorghum halepense*); *Ascochyta caulina* no controle de ançarina-branca (*Chenopodium album*); *Dactylaria higginsii* no controle de tiririca (*Cyperus rotundus*) e tiririca-amarela (*Cyperus esculentus*); *Trichoderma virens* no controle de caruru (*Amaranthus retroflexus*); *Myrothecium verrucaria* no controle de malva (*Anoda cristata*), trombeteira (*Datura stramonium*) e fedegoso (*Cassia occidentalis* e *Senna obtusifolia*); e *Alternaria crassa* no controle de trombeteira (*Datura stramonium*).

3.6. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS

Inicialmente, a identificação e caracterização de fungos é baseada em características morfológicas das estruturas típicas do fungo que consiste em observar a coloração, tamanho (largura e comprimento) e o crescimento das colônias em diferentes meios de cultura, porém somente a utilização de características morfológicas na identificação a nível de espécie é muito limitado, sendo necessária a utilização de técnicas moleculares (LAZAROTTO, 2013).

3.7. FILOGENIA

A filogenia passou a ser baseada em dados moleculares com a entrada de técnicas biotecnológicas, como o sequenciamento de ácidos nucleicos e aminoácidos, sendo mais confiável e preciso estudar as relações evolutivas dos organismos (RIDLEY, 2006), devido a obtenção de grande quantidade de dados moleculares (CALDART *et al.*, 2016). Dessa forma, é frequentemente utilizado o sequenciamento de DNA para a geração de sequências que serão utilizadas para identificação e delimitação dos limites filogenéticos entre gêneros e espécies (MARIN-FELIX *et al.*, 2017).

A extração de DNA é o primeiro passo para realizar grande parte das metodologias de biologia molecular e há diversos protocolos para realização da mesma que depende do tipo de tecido que será utilizado, integridade essencial para a aplicação em que o DNA será utilizado e grau de pureza (JOHN; BARTLETT, 2003).

A análise filogenética de características variáveis de ácidos nucleicos é muito aplicada em fungos, pois parte do ponto que todas as espécies descendentes se originaram de um ancestral comum, porém sofreram alterações nas sequências gênicas, sendo possível observar antes das mudanças morfológicas e reprodutivas (TAYLOR et al., 2000). Uma das técnicas moleculares mais utilizadas é a Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), pois permite a amplificação específica de fragmentos de DNA de células fúngicas (PINHEIRO, 2004).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. COLETA DE AMOSTRAS

Foram realizadas coletas de folhas de capim-amargoso que apresentavam manchas foliares na Zona da Mata. As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia (LAMIF) – Universidade Federal de Uberlândia/Campus Monte Carmelo, examinadas sob lupa e posteriormente usadas para a confecção de lâminas e isolamento dos fungos. Após isso, foi realizada a herborização do material vegetal utilizando uma prensa e depositados na coleção da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

4.2. OBTENÇÃO DE ISOLADOS

Os isolados foram obtidos através de isolamento indireto, que consiste na técnica de transferir fragmentos do tecido do hospedeiro lesionado para o meio de cultura quando não é visível as estruturas típicas do fungo na lesão (CAROLLO; SANTOS FILHO, 2016).

Para a realização do isolamento indireto, pequenos fragmentos das folhas na zona de interseção entre os sintomas e a área sadia foram imersos em uma solução álcool 70% por 1 minuto, seguidos de imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 3 minutos, seguidos de lavagem com água destilada esterilizada (ADE) para retirada do excesso da solução de hipoclorito de sódio, posteriormente, os fragmentos foram transferidos em papel filtro esterilizado afim de remover o excesso de água. Os fragmentos foram plaqueados em placas de Petri contendo o meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) e incubados à 25 °C em

fotoperíodo de 12 horas (claro/escuro) por quatro dias quando houve o desenvolvimento de colônias típicas. Posteriormente, os isolados foram repicados para placas de Petri com BDA e utilizados para os demais estudos para obtenção de cultura. Os isolados foram preservados em ultrafreezer (-80 °C) com glicerol 10%.

4.3. TAXONOMIA

4.3.1. Identificação e caracterização morfológica

Para avaliar as características morfológicas macroscópicas dos isolados fúngicos foram preparados em quatro meios de cultura: extrato de malte (MEA), aveia ágar (OA), caldo de vegetais ágar (CVA) e batata dextrose ágar (BDA) para avaliar o crescimento das colônias, coloração, diâmetro, formato e aspecto. Discos de micélio de cada isolado com aproximadamente 5 mm de diâmetro foram repicados para o centro da placa de Petri de cada meio de cultura. As placas de Petri foram incubadas em BOD a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas, após 7 dias as colônias foram avaliadas. Os isolados fúngicos foram codificados, sendo isolado 1 (KDI 124) e isolado 2 (KDI 125). Ademais foi utilizado o grão de arroz para induzir a esporulação, onde foram repicados para o meio de caldo de vegetais ágar (CVA). Após 15 dias foi realizada a medição das estruturas microscópicas fúngicas através da captura de imagens digitais do microscópio Primo Star equipado com uma câmera digital Axiocam ERc 5s e o Software Zen. Foram realizadas medições de 30 isolados, onde foi observado e mensurado o comprimento e largura de hifas, conidióforos, célula conidiogênica, conídio, hilo e clamidósporos, além de observar as características de cada uma das estruturas.

4.3.2. Caracterização molecular

Os isolados foram cultivados em líquido batata-dextrose (BD) e incubados em BOD a 25 °C no escuro por 4 dias. O micélio fúngico foi removido e transferido para um papel filtro esterilizado por 2 dias. Foi utilizado o Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega) para a extração do DNA, seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente o DNA extraído foi quantificado no Nanodrop.

Foi realizada a amplificação de fragmentos do DNA pela Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) A amplificação foi realizada a partir dos primers ITS5 / 4 (WHITE *et al.*, 1990) e LR0R/ LR5 (VILGALYS; HESTER, 1990), respectivamente. Cada reação de PCR (25 µL)

consistiu em 2 μ L (20 ng) de DNA, 12,5 μ L de Dream Taq Master Mix (Fermentas Company), 1 μ L de DMSO, 5 μ L de BSA, 2,5 μ L de H₂O, e 1 μ L de cada primer (10 μ M). A reação de PCR para a região ITS foi realizada conforme Groenewald *et al.* (2005), ao passo que a de LSU foi feita da seguinte forma: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, 35 ciclos de amplificação a 94 °C por 1 min, seguidos de uma etapa de 50 °C por 30s, uma etapa de 72 °C por 1 min, e por fim, a etapa de extensão final a 72 °C por 5 min. Os produtos de PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1% e posterior observação em transiluminador UV.

Após o sequenciamento, os eletroferogramas e as sequências de cada isolado foram visualizados através do software SeqAssem ver. 07/2008 (HEPPERLE, 2004). As regiões amplificadas foram pouco informativas para a análise filogenética. Para a identificação preliminar dos isolados foi utilizado a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) que compara as sequências de isolados depositados no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

4.4. PATOGENICIDADE

4.4.1. Produção de inóculo

Cada isolado fúngico foi repicado para uma placa de Petri contendo meio de cultura caldo de vegetais ágar (CVA) e incubados em BOD a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após 15 dias de incubação, uma alíquota de 5 mL de água destilada com Tween 80 (0,05%) foi adicionada sobre cada colônia e raspada com auxílio da alça de Drigalski, formando uma suspensão de esporos. Foi realizada a quantificação da concentração de esporos através da câmara de Neubauer, a fim de obter uma concentração final de 1×10^5 conídios/mL.

4.4.2. Obtenção de sementes

As sementes de capim-amargoso foram coletadas no campo experimental da Universidade Federal de Uberlândia – Campus Monte Carmelo e armazenadas a 5 °C em geladeira.

4.4.3. Teste de patogenicidade

Dez sementes de capim amargoso foram semeadas em copos plásticos de 100 mL com solo e substrato esterilizado na proporção 2:1. Com auxílio de um bisturi, foram cortados

discos de micélio de cada isolado e colocados separadamente nas folhas da *D. insularis*, no estágio de desenvolvimento que apresentaram dois pares de folhas. Subsequentemente foram colocadas em uma câmara úmida, feita com sacos plásticos umedecidos por 48 horas e irrigadas diretamente no solo a fim de evitar o ressecamento. Ao término desse período, foram transferidas para casa-de-vegetação por 14 dias após a inoculação (DAI) para avaliar o surgimento de sintomas. As testemunhas foram inoculadas com discos de meio de cultura CVA sem o fungo.

O ensaio foi conduzido em DIC, com 3 tratamentos e 5 repetições:

Tratamento 1: Testemunha – Discos de CVA;

Tratamento 2: KDI 124 – Discos de micélio em meio CVA;

Tratamento 3: KDI 125 – Discos de micélio em meio CVA.

4.4.4. Avaliação do potencial de *Bipolaris* spp. para o controle de *D. insularis* em pré-emergência

Cinquenta sementes foram semeadas em copos de plástico de 100 mL com solo e substrato esterilizado na proporção 2:1. Após o semeio, foi aplicada uma suspensão de conídios de cada isolado individualmente na concentração 1×10^5 conídios/mL, com auxílio de um borrifador, com volume de 1,2 mL. Nas testemunhas foi aplicado apenas a mistura de água esterilizada com Tween 80 (0,05%).

Após isso, foi feita uma câmara úmida com sacos plásticos umedecidos, por 48 horas e irrigação diretamente no solo afim de evitar o ressecamento.

Foi contabilizado o número de plântulas que haviam emergido e convertido em porcentagem, avaliando o aparecimento de lesões foliares em 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação (DAI).

O ensaio *in vivo* foi conduzido em DIC, com 3 tratamentos e 5 repetições:

Tratamento 1: Testemunha – Água esterilizada+ Tween 80 (0,05%);

Tratamento 2: KDI 124 – Suspensão de conídios (1×10^5 conídios/mL);

Tratamento 3: KDI 125 – Suspensão de conídios (1×10^5 conídios/mL).

4.4.5. Avaliação do potencial de *Bipolaris* spp. para o controle de *D. insularis* em pós-emergência

Em copos de plástico de 300 mL, contendo solo e substrato esterilizado na proporção de 2:1, doze sementes foram semeadas superficialmente em cada copo. Após a germinação, foi feito um desbaste para ter somente dez plantas por copo. Quando as plantas apresentaram dois pares de folhas, foram pulverizadas com suspensão de conídios (1×10^5 conídios/mL) de cada isolado e colocadas em uma câmara úmida, feita com saco plástico umedecido, por 48 horas e irrigadas diretamente no solo afim de evitar o ressecamento. Ao término desse período, foram transferidas para casa-de-vegetação por 14 DAI para avaliar a severidade. A testemunha foi imersa somente na mistura de água esterilizada com Tween 80 (0,05%).

Não foi utilizado nenhuma escala diagramática específica para comprovar a severidade. Os registros foram feitos seguindo uma escala de notas, representada na tabela 1.

Tabela 1 - Escala para avaliação da severidade dos sintomas

Escalas de Notas	Descrição
0	Ausência de sintomas
1	Sintomas escassos e lesões foliares pouco severas
2	Sintomas comuns e lesões foliares moderadamente severas
3	Sintomas generalizados e lesões foliares severas
4	Morte das plantas

Fonte: elaborado pela autora.

Essa avaliação foi conduzida em DIC, com 3 tratamentos e 5 repetições:

Tratamento 1: Testemunha – Água esterilizada + Tween 80 (0,05%);

Tratamento 2: KDI 124 – Suspensão de conídios (1×10^5 conídios/mL);

Tratamento 3: KDI 125 – Suspensão de conídios (1×10^5 conídios/mL).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos dois isolados fúngicos do município de Ubá-MG, que foram identificados como KDI 124 e KDI 125, preservados em ultrafreezer (-80 °C) e depositados na coleção de fungos da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

5.1. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Foram observadas as seguintes características morfológicas dos isolados KDI 124 E KDI 125: hifas de coloração marrom, septada, ramificada e superficial 1,61–5,37 μm . Conidióforos 61,48–212,11 $\times$ 1,69–3,19 μm , macronematosos, surgindo isolados ou em pequenos grupos, simples, septados, às vezes geniculados, com uma célula basal inchada, marrom escuro. Células conidiogênicas 4,74–21,17 $\times$ 1,24–3,55 μm , mono ou politréticas, terminais ou simpodiais. Conídios 17,63–41,67 $\times$ 4,99–7,90 μm , curvos, às vezes retos, elípticos ou obclavados, mais largos no meio ou logo abaixo, afinando para as extremidades, marrom pálido a escuro, 3–9 distoseptado, com hilo destacado, 0,33–1,79 $\times$ 1,11–2,71 μm . Clamidósporos 3,60–8,52 $\times$ 3,54–5,73 μm , globosos de coloração marrom, terminais às vezes formando cadeias. Lesões necróticas, marrom claro, irregulares, alongadas, nas margens e no ápice das folhas, com dimensões variando de 5,5 a 10 cm de comprimento $\times$ 0,4 a 0,7 cm de largura, de acordo com as características morfológicas os isolados obtidos pertencem ao gênero *Bipolaris* (Pleosporaceae, Pleosporales, Pleosporomycetidae, Dothideomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota, Fungi).

Figura 1 - *Bipolaris* spp. a-b colônias após 7 dias de cultivo em meio BDA e OA, respectivamente; c hifa; d-f conidióforo; g-h clamidósporos; i-j conídio; k-l plantas inoculadas com *Bipolaris* spp.; m colônias obtidas por meio de isolamento indireto de plantas inoculadas



Fonte: Nóbrega, 2022.

5.2. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Os isolados obtidos das folhas do capim-amargoso foram sequenciados para a região ITS rDNA e LSU, os fragmentos possuíam cerca de 500 e 900 pb, respectivamente. Por meio de análises das sequências do DNA obtidos no estudo, as sequências foram comparadas com sequências já depositadas no NCBI e foi realizado o Blast para identificação do grupo taxonômico, a região ITS do KDI 124 mostrou 100% de similaridade com *Bipolaris yamadae* e *Bipolaris setariae* e a região LSU mostrou 100% de similaridade para *B. drechsleri*, *B. maydis*, *B. yamadae*, *B. zea*, *B. zeicola*, *B. sorokiniana*, *B. setariae*, dentre outros. A região LSU do KDI 125 mostrou 100% de similaridade com *B. maydis*, *B. setariae*, *B. zeicola*, *B. sorokiniana*, *B. victoriae*, *B. salviniae*, *Bipolaris coffeana*, dentre outros, e 99,89% de similaridade com *Bipolaris yamadae*, *Bipolaris drechsleri*, *Bipolaris sorokiniana*, *Bipolaris maydis*, dentre outros. Dessa forma, fica evidente que as regiões amplificadas não são suficientes para determinar a espécie que os isolados pertencem. Para melhor compreensão da espécie, seria necessário sequenciar outros genes, tais como TEF1(REF) e GDPH (BERBEE; PIRSEYEDI; HUBBARD, 1999).

5.3. TESTE DE PATOGENICIDADE COM DISCOS DE MICÉLIO DE *Bipolaris* spp.

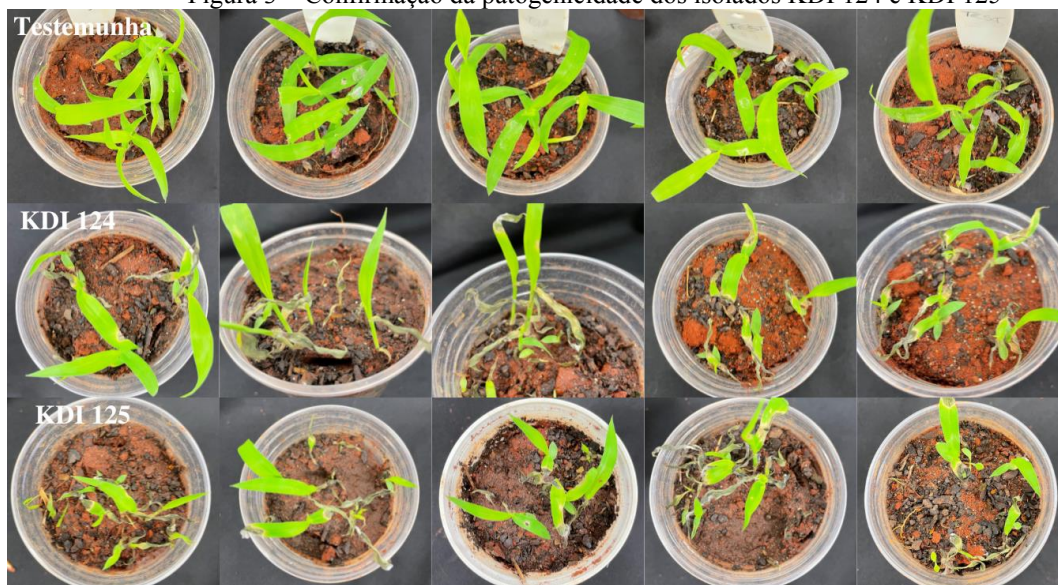
Este teste foi feito para comprovar a patogenicidade dos isolados fúngicos à *D. insularis*. A Figura 1 mostra uma visão geral do teste de patogenicidade. A Figura 2 evidencia o surgimento de lesões foliares severas e morte de plantas de capim amargoso após as inoculações com os dois isolados fúngicos, confirmando a patogenicidade dos isolados obtidos.

Figura 2 – Visão geral do teste de patogenicidade



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 3 – Confirmação da patogenicidade dos isolados KDI 124 e KDI 125



Fonte: elaborado pela autora (2023).

5.4. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE *BIPOLARIS* SPP. PARA O CONTROLE DE *D. INSULARIS* EM PRÉ-EMERGÊNCIA

Pode-se verificar que os isolados KDI 124 e KDI 125 foram eficientes em inibir a germinação de sementes de *D. insularis* (Tabela 2).

Tabela 2 - Número de plântulas germinadas aos 7, 14, 21 e 28 DAI

Tratamentos	Porcentagem de sementes germinadas após 28 DAI	Porcentagem de inibição da germinação	Plântulas emergidas			
			7 DAI	14 DAI	21 DAI	28 DAI
Testemunha	100	-	87	70	85	63
KDI 124	25,4	74,6	86	73	32	16
KDI 125	60,32	39,68	68	41	43	38

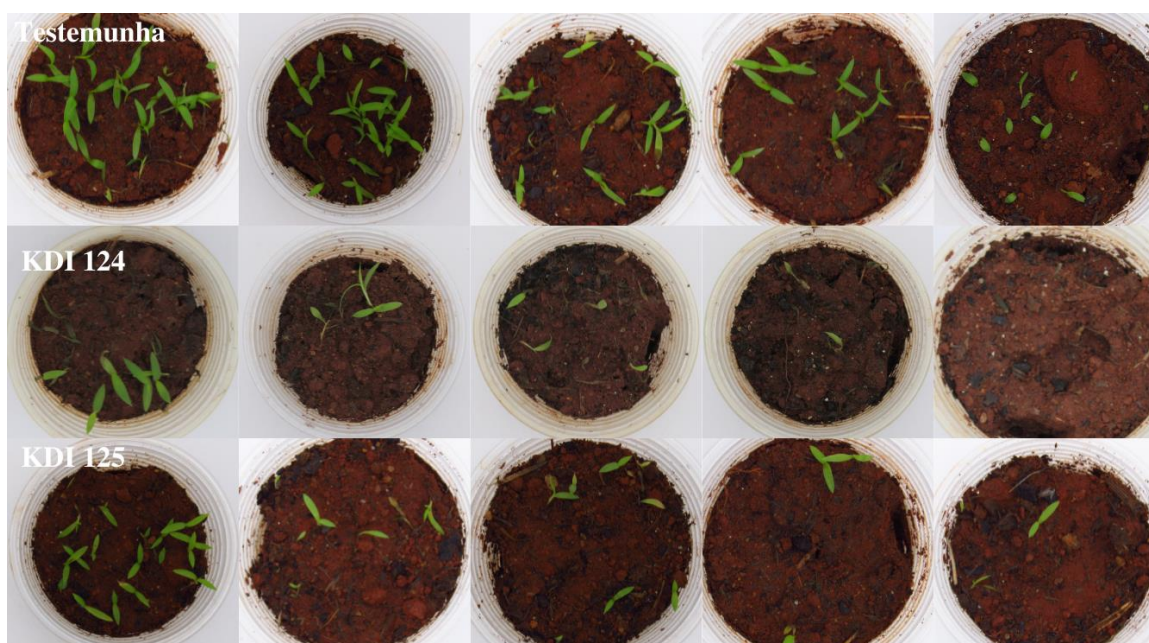
Fonte: elaborado pela autora.

Durante as avaliações, notou-se que as sementes não tinham um bom percentual de germinação, sempre abaixo de 60%. Isso pode ter ocorrido devido a fatores ligados à temperatura, umidade, luz, imaturidade de embriões, dentre outros, que podem provocar dormência em diversas espécies de plantas daninhas e inibir a germinação (CARDOSO, 2009). Dessa forma, o número de sementes da testemunha que germinaram foram

consideradas como 100% de germinação. Os isolados fúngicos KDI 124 e KDI 125 inibiram a germinação das sementes em 74,60% e 39,68% após 28 DAI, respectivamente.

Algumas plantas da testemunha morreram após a germinação, isto pode ter acontecido devido a alguma deficiência nutricional ou estrangulamento das raízes. Além disso, foi possível observar a colonização do isolado fúngico KDI 124 nas plântulas recém emergidas causando lesões severas com o passar dos dias das avaliações. Devido a isso, muitas plântulas que já tinham germinadas morreram. A Figura 4 fornece uma visão geral do experimento.

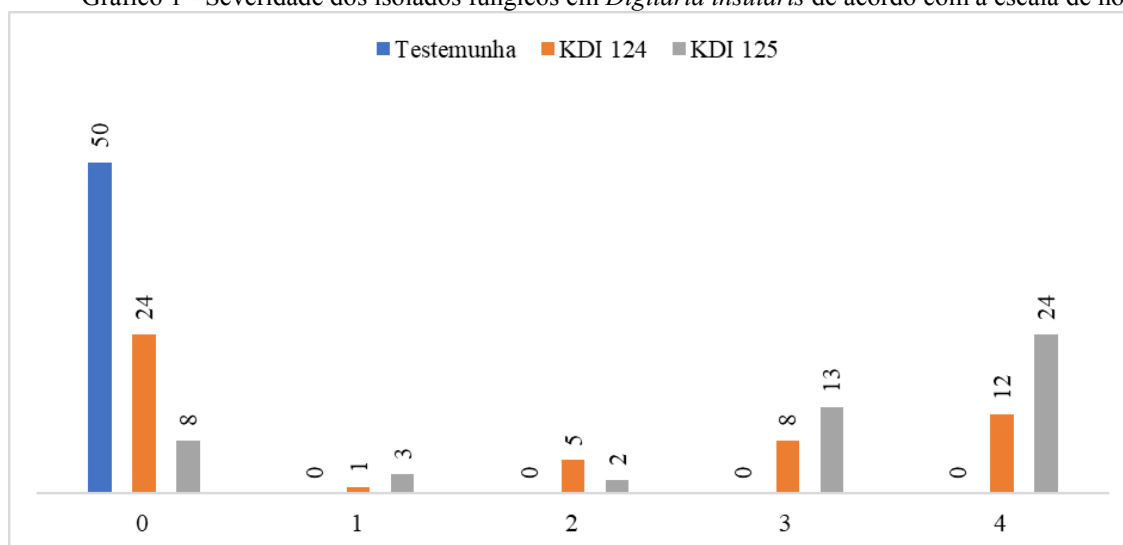
Figura 3 - Comparativo visual da emergência de plântulas de *Digitaria insularis* aos 28 dias após as inoculações



Fonte: Elaborado pela autora (2023)

5.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE *Bipolaris* spp. PARA O CONTROLE DE *D. insularis* EM PÓS-EMERGÊNCIA COM SUSPENSÃO DE ESPOROS

Após 14 DAI, os vasos foram avaliados de acordo com a escala de notas, onde 0 – Ausência de sintomas; 1 – Sintomas escassos e lesões foliares pouco severas; 2 – Sintomas comuns e lesões foliares moderadamente severas; 3 – Sintomas generalizados e lesões foliares severas; e 4 – Morte das plantas (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Severidade dos isolados fúngicos em *Digitaria insularis* de acordo com a escala de nota.

Fonte: elaborado pelo autor (2022)

Todas as plantas das testemunhas não apresentaram nenhum sintoma. O isolado fúngico mais agressivo foi o KDI 125, causando a morte de aproximadamente 50% das plantas, ou seja, o dobro do KDI 124, que causou a morte de aproximadamente 25% das plantas. O isolado KDI 125 quando classificado com nota 3 apresentava um micélio branco cottonoso na base das plantas inoculadas. É notório o potencial dos isolados fúngicos KDI 124 e KDI 125 como agentes de controle biológico contra *D. insularis*.

6.CONCLUSÕES

No presente trabalho foi possível identificar os dois isolados obtidos (KDI 0124 e KDI 0125) como pertencentes ao gênero *Bipolaris*.

Não foi possível identificar os isolados a nível de gênero pois as regiões amplificadas não foram suficientes para separar em espécies.

Os isolados KDI 124 e KDI 125 são patogênicos à *D. insularis*.

Os isolados KDI 124 e KDI 125 possuem potencial como agentes de controle biológico de *D. insularis* em pré e pós-emergência

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARANTE JUNIOR, Ozelito Possidônio de *et al.* GLIFOSATO: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Quim. Nova**, [S. L.], v. 25, n. 4, p. 589-593, jul. 2002. Disponível em: . <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000400014>. Acesso em: 03 dez. 2022.
- AMASHITA, O M *et al.* FATORES AMBIENTAIS SOBRE A GERMINAÇÃO DE *Emilia sonchifolia*. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 27, n. 4, p. 673-681, jan. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-83582009000400005>. Acesso em: 28 nov. 2022.
- AYRES, P.; PAUL, N. Weeding with fungi. **New Scientist**, 1732: 36-39, 1990.
- BARROSO A. A. M.; MARTINS, D.; CARVALHO, B.; ALVES, P. L. C. A. Biologia e desenvolvimento de capim-amargoso. In.: BARROSO, A. A. M.; ALVES, P. L. C. A. **Biologia e manejo da resistência do capim-amargoso no Brasil**. Jaboticabal: Funep, p. 17.
- BERBEE, M. L.; PIRSEYEDI, M.; HUBBARD, S. Cochliobolus phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. **Mycologia**, p. 964-977, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061106>. Acesso em: 27 dez. 2022.
- CALDART, Eloiza Teles *et al.* Análise filogenética: conceitos básicos e suas utilizações como ferramenta para virologia e epidemiologia molecular. **Acta Scientiae Veterinariae**, [S. L.], v. 44, p. 1-20, set. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.22456/1679-9216.81158>. Acesso em: 03 dez. 2022.
- CARDOSO, V. J. M. Conceito e classificação da dormência em sementes. **Oecologia Brasiliensis**, v. 13, n. 4, p. 619-631, 2009.
- CAROLLO, Eliane Mazzoni; SANTOS FILHO, Hermes Peixoto. **Manual Básico de Técnicas Fitopatológicas**. Brasília: Embrapa, 2016. 109 p. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1054670/1/CartilhaManualFit o21514Hermes.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2022.
- CARVALHO, Leonardo Bianco de. **INTERFERÊNCIA DE *Digitaria insularis* EM *Coffea arabica* E RESPOSTAS DESTAS ESPÉCIES AO GLYPHOSATE**. 2011. 119 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Agrônômica, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2011. Disponível em: <https://www.lapda.org.br/storage/downloads/interferencia-de-digitaria-insularis-em-coffee-arabica-e-respostas-destas-especies-ao-glyphosate-8898.pdf>. Acesso em: 16 nov. 2022.
- CARVALHO, Leonardo Bianco de. **HERBICIDAS**. Lages: Editado Pelo Autor, 2013. 62 p. Disponível em: https://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/fitossanidade/leonardobiancodecarvalho/livro_herbicidas.pdf. Acesso em: 14 dez. 2022.

CHARUDATTAN, R. The mycoherbicide approach with plant pathogens: 24-57. In: TEBEEST, D.O. (Ed.). **Microbial control of weeds**. New York, Chapman & Hall, 1991. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4615-9680-6_2. Acesso em: 03 jan. 2023.

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-83582003000300020>. Acesso em: 28 nov. 2022.

CORTEVA AGRISCIENCE. **Plantas daninhas no Brasil**: amargoso. [S. L.], 2019. Color. Disponível em: https://www.corteva.com.br/content/dam/dpagco/corteva/la/br/pt/bpa-site/ebooks/pdfs/Ebook_MPD_Plantas_daninhas_no_Brasil_Amargoso.pdf. Acesso em: 16 nov. 2022.

EVANS, H.C.; ELLISON, C.A. Classical biological control of weeds with microorganisms: past, present, prospects. **Aspects of Applied Biology**, 24: 39-49, 1990.

FONTES, José Roberto Antoniol *et al.* **Manejo Integrado de Plantas Daninhas**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003. 48 p. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPAC-2009/27986/1/doc_103.pdf. Acesso em: 18 nov. 2022.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1323-1330, 1995.

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: 16 nov. 2022.

GROENEWALD, M.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P. W. Distinct species exist within the *Cercospora apii* morphotype. **Phytopathology**, 95, 951–959, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0951>. Acesso em: 05 jan. 2023.

GURR, G.; WRATTEN, S. **Biological control**: measures of success. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. 429 p. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-94-011-4014-0>. Acesso em: 27 dez. 2022.

HASAN, S. Recent advances in the use of plant pathogens as biocontrol agents of weeds. *Pest Articles and News Sumaries*. 20: 437-443, 1974. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09670877409418221>. Acesso em: 28 dez. 2022.

HEAP, I. Banco de dados internacional de ervas daninhas resistentes a herbicidas. Conectados. Terça-feira, 29 de novembro de 2022. Disponível em: www.weedscience.org. Acesso em: 29 nov. 2022.

HEPPERLE, D. SeqAssem©. Win32–Version. **A sequence analysis tool contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences**, 2004. Disponível em: <http://www.sequentix.de>. Acesso em: 10 jan. 2023.

International Agency for Research on Cancer (IARC). **SOME ORGANOPHOSPHATE INSECTICIDES AND HERBICIDES**. França: Lyon, 2017. 464 p. Disponível em: <https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/07/mono112.pdf>. Acesso em: 03 dez. 2022.

JOHN M. S. BARTLETT D. S. PCR Protocols. In: Park DJ, editor. **Methods in Molecular Biology**. 226. 2 ed: Humana Press; 2003

JULIEN, Mic. & WHITE, Graham. **Biological Control of Weeds: theory and practical application**. ACIAR Monograph. 49: 1-192, 1997.

LAZAROTTO, Marília. **IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Fusarium* spp. E *Pestalotiopsis* spp. ASSOCIADOS A *Carya illinoensis* NO RIO GRANDE DO SUL**. 2013. 156 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013. Disponível em: <https://www.agricultura.rs.gov.br/upload/arquivos/201711/07100433-fusarium-spp-e-pestalotiopsis-spp-tese-marilia-lazarotto.pdf>. Acesso em: 03 dez. 2022.

LOPES, Abílio F. *et al.* Controle de capim-amargoso com herbicidas gramínicidas após diferentes períodos de restrição hídrica. **Weed Control Journal**. Londrina, p. 1-8. ago. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.7824/wcj.2021;20:00756>. Acesso em: 29 nov. 2022.
LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**. 4. ed. Nova Odessa-SP: Instituto Plantarum, 2008. 640 p.

MACHADO, A.F.L. *et al.* Caracterização anatômica de folha, colmo e rizoma de *Digitaria insularis* (L.) Fedde. **Planta Daninha**, v.26, n.1, p.1-8, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-83582008000100001>. Acesso em: 16 nov. 2022.

MARIN-FELIX, Yasmina *et al.* Genera of phytopathogenic fungi: gophy 1. **Studies In Mycology**, [S. L.], v. 86, p. 99-2016, mar. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.04.002>. Acesso em: 03 dez. 2022.

MARIN-FELIX, Yasmina; HERNÁNDEZ-RESTREPO, Margarita; CROUS, Pedro W. Multi-locus phylogeny of the genus *Curvularia* and description of ten new species. **Mycological Progress**, [S. L.], v. 19, p. 559-588, mar. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11557-020-01576-6>. Acesso em: 03 dez. 2022.

MARTINS, J. F.; BARROSO, A. A. M.; ALVES, P. L. C. A. Effects of environmental factors on seed germination and emergence of glyphosate resistant and susceptible sourgrass. **Planta**

Daninha, Jaboticabal, v. 35, p. 1-9, jan. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-83582017350100039>. Acesso em: 29 nov. 2022.

MCRAE, C.F. Classical and inductive approaches to biological weed control compared. **Plant Protection quarterly** 3(3), 1988.

MELO, Marcel Sereguin Cabral de. **Alternativas de controle, acúmulo de chiquimato e curva de crescimento de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) suscetível e resistente ao glyphosate**. 2011. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Esalq, Piracicaba, 2011. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11136/tde-08022012-110558/publico/Marcel_Sereguin_Cabral_de_Melo.pdf. Acesso em: 29 nov. 2022.

MENDONÇA, G.S.; MARTINS, C.C.; MARTINS, D.; COSTA, N.V. Ecophysiology of seed germination in *Digitaria insularis* ((L.) Fedde). **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, n. 4, p. 823-832. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1806-66902014000400021>. Acesso em: 29 nov. 2022.

NECHET, Kátia Lima de; BARRETO, Robert Weingart; MIZUBUTI, Eduardo S. G. *Bipolaris euphorbiae* as a Biological Control Agent for Wild Poinsettia (*Euphorbia heterophylla*): host-specificity and variability in pathogen and host populations. **Biocontrol**, [S.L.], v. 51, n. 2, p. 259-275, abr. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10526-005-1519-z>.

NERY, Leonardo Ferreira. **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: 28 nov. 2022.

OLIVEIRA, M. F.; BRIGHENTI, A. M. **Controle de Plantas Daninhas: Métodos físico, mecânico, cultural, biológico e alelopatia**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Milho e Sorgo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Embrapa Brasília, 2018.

PAES, Iago Gonçalves. **Problemática do capim-amargoso (*Digitaria insularis*) resistente ao herbicida glyphosate**. 2018. 32 f. Monografia (Doutorado) - Curso de Agronomia, IFSULDEMINAS, Machado, 2018. Disponível em: <https://saulcarvalho.com.br/wp-content/uploads/2018/12/TCC-Final-Iago-Paes.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2022.

PINHEIRO, Maria dos Reis Rodrigues. **Estudo de variabilidade genética de *aspergillus flavus* como base para o desenvolvimento de PCR multiplex para detecção de fungos produtores de aflatoxinas em castanha-do-brasil e bastanha de caju**. 2004. 149 f. Dissertação (Mestrado) - Curso em Ciências Genômicas, Genética Molecular e de Populações, Biotecnologia Molecular, Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2004. Disponível em: <https://bdtd.ucb.br:8443/jspui/handle/123456789/144>. Acesso em: 03 dez. 2022.

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: 28 nov. 2022.

PLINE-SRNIC, Wendy. Physiological Mechanisms of Glyphosate Resistance. **Weed Technology**, [S. L.], v. 20, n. 2, p. 290-300, abr. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1614/WT-04-131R.1>. Acesso em: 28 nov. 2022.

REICHERT JÚNIOR, Francisco Wilson. **CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS E SELETIVIDADE A CULTURAS PELA APLICAÇÃO DE ISOLADOS FÚNGICOS**. 2017. 57 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, 2017. Disponível em: <https://rd.uffs.edu.br/bitstream/prefix/1555/1/REICHERT%20J%C3%9ANIOR.PDF>. Acesso em: 03 dez. 2022.

RIDLEY, Mark. **Evolução**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 743 p.

ROMAN, Erivelton Scherer *et al.* **Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação**. Passo Fundo: Gráfica Editora Berthier, 2005. 152 p. Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents/1355291/12492345/Como+funcionam+os+herbicidas/954b0416-031d-4764-a703-14d9b28b178e?version=1.0>. Acesso em: 03 dez. 2022.

ROSS, M. A.; CHILDS, D. J. Herbicide mode-of-action summary. **Cooperative Extension Service Publication WS-23**, Purdue University, West Lafayette, IN. 1996. Disponível em: <http://www.btny.purdue.edu/weedscience/moa/index.html>. Acesso em: 12 jan. 2023.

SILVA, Alexandre Ferreira da *et al.* Métodos de controle de planta daninhas. In: OLIVEIRA, Maurílio Fernandes de; BRIGHENTI, Alexandre Magno. **Controle de Plantas Daninhas: métodos físico, mecânico, cultural, biológico e alelopatia**. Brasília: Embrapa, 2018. p. 11-33. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/193269/1/Controle-plantas-daninhas.pdf>. Acesso em: 03 dez. 2022.

SILVA, Arianne Kethery da *et al.* **Monitoramento dos fatores bióticos associados às cultivares de soja (Glycine max (L.) Merrill), conduzidas em neossolo quartzarênico hidromórfico típico no litoral de Santa Catarina**. 2017. 19 f. TCC (Graduação) - Curso de Agronomia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/174316>. Acesso em: 28 nov. 2022.

SIQUEIRA, Raphael Henrique da Silva. **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: 28 nov. 2022.

TAKANO, Hudson K. *et al.* Trp2027Cys mutation evolves in *Digitaria insularis* with cross-resistance to ACCase inhibitors. **Pesticide Biochemistry And Physiology**, [S. L.], v. 164, n. 1, p. 1-6, mar. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.12.011>. Acesso em: 14 dez. 2022.

TAYLOR, John W *et al.* Phylogenetic Species Recognition and Species Concepts in Fungi. **Fungal Genetics And Biology**, [S. L.], v. 31, p. 21-32, out. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1228>. Acesso em: 04 dez. 2022.

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

TEMPLETON, G.E. Biological control of weeds with fungal pathogens. **Tropical Pest Management**, 1984, 30: 333-338. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09670878409370907>. Acesso em: 23 dez. 2022.

VAN BRUGGEN, A. H. C. *et al.* Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. **Science Of The Total Environment**, [S. L.], v. 616-617, p. 255-268, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.309>. Acesso em: 03 dez. 2022.

VARGAS, Leandro *et al.* RESISTÊNCIA DE PLANTAS DANINHAS A HERBICIDAS NO BRASIL: HISTÓRICO, DISTRIBUIÇÃO, IMPACTO ECONÔMICO, MANEJO E PREVENÇÃO. In: MESCHEDE, D. K.; GAZZIERO, D. L. P. **A era glyphosate: agricultura, meio ambiente e homem**. Londrina: Midiograf, 2016. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1048114/1/ID436792016cap20LVglyphosate.pdf>. Acesso em: 29 nov. 2022.

VIEIRA, Bruno Sérgio; BARRETO, Robert Weingart; NECHET, Kátia de Lima. Controle biológico de plantas daninhas com fungos fitopatogênicos. In: OLIVEIRA, Maurílio Fernandes de; BRIGHENTI, Alexandre Magno. **Controle de Plantas Daninhas: métodos físico, mecânico, cultural, biológico e alelopatia**. Brasília: Embrapa, 2018. p. 113-136. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/193269/1/Controle-plantas-daninhas.pdf>. Acesso em: 03 dez. 2022.

VILGALYS, R.; HESTER, M. (1990) Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. **Journal of Bacteriology**. 172:4238–4246. Disponível em: 10.1128/jb.172.8.4238-4246.1990. Acesso em: 10 jan. 2023.

WAPSHERE, A.J. (1982) Biological control of weeds. In: W. Holzner & M. Numata (Eds). **Biology and Ecology of Weeds**. The Hague: Dr. Junk Publishers, 1982. p. 47-56. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-94-017-0916-3_4. Acesso em: 15 dez. 2022.

WATSON, A. K. The classical approach with plant pathogens: 3-23. D.O. TeBeest (ed.) **Microbial Control of Weeds**. Chapman and Hall: New York, 1991. p. 3-23. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4615-9680-6_1. Acesso em: 03 jan. 2023.

WHITE, T.J. *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. *et al.* **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. Academic Press: San Diego, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>. Acesso em: 16 dez. 2022.

YAMASHITA, O. M. *et al.* Fatores ambientais sobre a germinação de *Emilia sonchifolia*. **Planta Daninha**, v. 27 n. 4, 673-681, 2009. Disponível em: 10.1590/S0100-83582009000400005. Acesso em: 29 nov. 2022.