

FERNANDO GARCIA

**DIVERSIDADE E DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS
ASSOCIADOS À *Digitaria insularis* E SEU POTENCIAL COMO AGENTES DE CONTROLE
BIOLÓGICO**

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

Área de Concentração: Informações Geoespaciais e Tecnologias Aplicadas à Produção Agrícola.

Orientador:

Prof. Dr. Bruno Sérgio Vieira

Coorientadora:

Dr^a. Eliane Mayumi Inokuti

MONTE CARMELO/MG

2024

FERNANDO GARCIA

**DIVERSIDADE E DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS
ASSOCIADOS À *Digitaria insularis* E SEU POTENCIAL COMO AGENTES DE CONTROLE
BIOLÓGICO**

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

Aprovado em 26 de Abril de 2024.

Banca examinadora:

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

Prof Dr. André Luiz Firmino - Instituto de Ciências Agrárias (UFU)

Dr. Bruno Wesley Ferreira – Empresa Agrobiológica

MONTE CARMELO/MG

2024

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

G216 Garcia, Fernando, 1983-
2024 DIVERSIDADE E DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE FUNGOS
FITOPATOGÊNICOS ASSOCIADOS À *Digitaria insularis* E SEU
POTENCIAL COMO AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO [recurso
eletrônico] / Fernando Garcia. - 2024.

Orientador: Bruno Sérgio Vieira.

Coorientador: Eliane Mayumi Inokuti.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Agricultura e Informações
Geoespaciais.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2024.310>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Agronomia. I. Vieira, Bruno Sérgio, 1978-,
(Orient.). II. Inokuti, Eliane Mayumi, 1983-,
(Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia.
Pós-graduação em Agricultura e Informações Geoespaciais.
IV. Título.

CDU: 631

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Informações
Geoespaciais

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



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Agricultura e Informações Geoespaciais				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico				
Data:	26/04/2024	Hora de início:	08:00	Hora de encerramento:	11:30
Matrícula do Discente:	32212AIG003				
Nome do Discente:	Fernando Garcia				
Título do Trabalho:	Diversidade e Distribuição Espacial de Fungos Fitopatogenicos Associados à Digitaria insularis e seu Potencial como Agentes de Controle Biológico				
Área de concentração:	Informações geoespaciais e tecnologias aplicadas à produção agrícola				
Linha de pesquisa:	Controle biológico de doenças de plantas e de plantas daninhas: prospecção e análise de distribuição espacial de antagonistas				

Reuniu-se na sala 1A 104 - Sala de reuniões, banca examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Agricultura e Informações Geoespaciais, assim composta: Prof. Bruno Sérgio Vieira (Presidente - Universidade Federal de Uberlândia, Campus de Monte Carmelo), Prof. Dr. André Luiz Firmino (Universidade Federal de Uberlândia, Campus Monte Carmelo) e Dr. Bruno Wesley Ferreira (Agrobiológica Sustentabilidade S.A.). Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Bruno Sérgio Vieira, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

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

Aprovado.

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

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

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



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Sergio Vieira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/04/2024, às 10:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **André Luiz Firmino, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/04/2024, às 12:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Wesley Ferreira, Usuário Externo**, em 23/05/2024, às 07:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5378719** e o código CRC **DD3DBA7C**.

Dedico este trabalho aos familiares, à equipe do Núcleo de Estudos em Controle Biológico – NCBio, aos colegas da pós-graduação e, principalmente, para meu filho Emanuel.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e aos Guias que sempre foram proteção e força durante o processo de pesquisa.

Às equipes do Núcleo de Estudos em Controle Biológico – NCBio, do Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia - LAMIF da Universidade Federal de Uberlândia, *campus* Monte Carmelo e do Projeto Capim-amargoso.

Ao Prof. Dr. André Luiz Firmino que sempre foi uma fonte de inspiração e auxílio durante a pesquisa, ao Dr. Bruno Wesley, à Dra. Thaisa de Nobrega e à Dra. Eliane Mayumi Inokuti, equipe de pós-doc do projeto, pessoas que me iniciaram no mundo da pesquisa compartilhando seus conhecimentos e instigando a buscar por mais.

Agradecimento especial ao meu orientador, Prof. Dr. Bruno Sérgio Vieira, por sua ajuda, compreensão, paciência, conselhos e auxílio, sem os quais seria impossível chegar ao final deste projeto.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Informações Geoespaciais, principalmente a Laura Moura Xavier, que foi fundamental para a conquista deste título.

À Tainah Freitas Rosa, amizade de longa data, que foi uma das pessoas-chave para que a escrita desta dissertação fosse realizada.

Agradeço à minha família, pois cada um, na sua particularidade, cooperou de alguma forma para que eu conseguisse finalizar este trabalho. Emanuel Prudente Alves Garcia, filho amado, você foi e é luz em todos os processos da minha vida e durante a conquista do Mestrado, agradeço a você pela compreensão das vezes que estive ausente, dos dias que foram impossíveis dedicar toda a atenção que necessitava e, claro, toda a ajuda que me foi oferecida durante os experimentos, inclusive avaliações em dias quentes na casa de vegetação.

Finalmente, agradeço ao Programa Institucional de Bolsas FAPEMIG/UFU e à empresa Koppert, que foi responsável pelo fomento desta pesquisa.

BIOGRAFIA

Fernando Garcia, nascido em 05 de julho de 1983, na cidade de Monte Carmelo - MG, filho caçula de quatro irmãos de Zilda Rosário dos Santos Garcia e Antonio Garcia. Foi diplomado em Ciências Biológicas no ano de 2015 pela Fundação Carmelitana Mario Palmério na cidade de Monte Carmelo MG. Durante a graduação, teve como título do seu Trabalho de Conclusão de Curso AVALIAÇÃO DE ISOLADO DE *Trichoderma* SP. COMO AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO CONTRA *Sclerotium rolfsii*. Em março de 2022, iniciou o Curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Informações Geoespaciais, na linha de pesquisa Sistemas Integrados de Produção Vegetal da Universidade Federal de Uberlândia – *Campus* Monte Carmelo – MG, onde desenvolveu o projeto de dissertação **DIVERSIDADE E DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS ASSOCIADOS À *Digitaria insularis* E SEU POTENCIAL COMO AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO**

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	2
CAPÍTULO 1 - DIVERSIDADE E DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS ASSOCIADOS À <i>Digitaria insularis</i>	9
CAPÍTULO 2 – SELEÇÃO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE <i>Digitaria insularis</i>	34
CAPÍTULO 3: Primeiro relato de <i>Cladosporium digitarium</i> provocando lesões foliares em <i>Digitaria insularis</i>	51
CAPÍTULO 4: <i>Anthracocystis panici-leucophaei</i>: a Potential Biological Control Agent for the Grassy Weed <i>Digitaria insularis</i>	56

RESUMO

O capim-amargoso (*Digitaria insularis* L. Fedde) é uma planta daninha altamente prejudicial na agricultura brasileira devido à sua capacidade competitiva com as culturas, rápido crescimento e dispersão agressiva e que apresenta biótipos resistentes a herbicidas químicos, onde o controle biológico emerge como uma alternativa promissora. Fungos fitopatogênicos necrotróficos e biotróficos destacam-se como potenciais agentes de controle biológico. Este trabalho teve como objetivos apresentar a distribuição espacial dos fungos fitopatogênicos necrotróficos associados ao capim-amargoso, estimar a ocorrência deles na área de abrangência das coletas e selecionar os fungos necrotróficos coletados como potenciais agentes de controle biológico de *D. insularis*. Além disso, compilar e complementar informações sobre o potencial do fungo *Anthracycystis panici-leucophaei*, como agente de controle biológico de *D. insularis*. Foram coletadas amostras de *D. insularis* nos estados de Minas Gerais, Goiás e São Paulo e 204 isolados fúngicos necrotróficos foram obtidos e testados quanto à sua patogenicidade. O estudo revela a diversidade e distribuição geográfica dos fungos fitopatogênicos associados ao capim-amargoso, fornecendo uma base para futuras pesquisas e visando o controle eficaz dessa planta daninha. Dos isolados testados, 79 foram patogênicos para o capim-amargoso. Foram realizadas análises morfológicas e filogenéticas que permitiram identificar 67 desses isolados, os quais são pertencentes a 17 gêneros fúngicos. Os isolados KDI 0103, KDI 0145, KDI 0104, KDI 0164 e KDI 0147 foram promissores tanto quanto à inibição da germinação de sementes quanto na diminuição do desenvolvimento de parte aérea e radícula de plantas de capim amargoso (*in vitro*). *In vivo*, os isolados KDI 0204, KDI 0203, KDI 0042 se destacaram tanto em pré quanto em pós-emergência, indicando um potencial desses isolados como agentes de controle biológico para o capim amargoso. Ademais, uma nova espécie de *Cladosporium* é relatada pela primeira vez associada à *D. insularis*. Novas informações corroboram o potencial de *Anthracycystis panici-leucophaei*, agente causal do carvão em *D. insularis*, como agente de biocontrole.

Palavras-chave: Bioherbicida. Manejo de plantas daninhas. Prospecção.

ABSTRACT

Sourgrass (*Digitaria insularis* L. Fedde) is a highly detrimental weed in Brazilian agriculture due to its competitive capacity with crops, fast growth, and aggressive spread, presenting biotypes resistant to chemical herbicides. Biological control emerges as a promising alternative. For sourgrass, necrotrophic and biotrophic phytopathogenic fungi stand out as potential biological control agents. This study aimed to present the spatial distribution of necrotrophic phytopathogenic fungi associated with sourgrass collected in the states of Minas Gerais, Goiás, and São Paulo, and to estimate their occurrence in the collection areas. Additionally, it aimed to select necrotrophic fungi collected as potential biological control agents for *D. insularis*. Another objective was to compile and complement information on the potential of the fungus *Anthracoctystis panici-leucophaei* as a biological control agent for *D. insularis*. Samples of *D. insularis* were collected from different locations in these states, and 204 necrotrophic fungal isolates were obtained and tested for pathogenicity. The study reveals the diversity and geographical distribution of phytopathogenic fungi associated with bittergrass, providing a basis for future research aiming at effective control of this weed. Among the tested isolates, 79 were considered pathogenic to sourgrass. Morphological and phylogenetic analyses allowed the identification of 67 of these isolates belonging to 17 fungal genera. Isolates KDI 0103, KDI 0145, KDI 0104, KDI 0164, KDI 0147 showed positive results both in seed germination inhibition and in aerial and radicle development control (in vitro). In vivo, isolates KDI 0204, KDI 0203, KDI 0042 showed positive results in both pre- and post-emergence, indicating consistent control potential at different phenological stages. A new species of *Cladosporium* was reported for the first time associated with *Digitaria insularis*. New information supports the potential of *Anthracoctystis panici-leucophaei*, the causal agent of smut in *D. insularis*, as a biocontrol agent for sourgrass.

Keywords: Bioherbicide. Weed management. Prospecting.

INTRODUÇÃO GERAL

As plantas daninhas representam um dos principais fatores limitantes para a produtividade agrícola em todo o mundo, resultando em significativas perdas na qualidade e produtividade de todas as culturas devido à competição por recursos como água, luz e nutrientes (Dias et al., 2010). O grau de competição das plantas daninhas com as culturas está relacionado com as espécies presentes na área e com a densidade dessa infestação, além da tomada de decisão no que se refere ao manejo dessas plantas (Wandscheer et al., 2014; Frandoloso et al., 2019).

O manejo de plantas daninhas em grandes culturas vem sendo realizado por meio de estratégias mecânicas, culturais e químicas. Essa última, que consiste na aplicação de herbicidas químicos, tem sido a principal forma de controle de plantas daninhas (Cimmino et al., 2015). No Brasil, existem mais de 770 herbicidas químicos registrados e que são classificados de acordo com o espectro de ação (tipo de planta que controla), seletividade (plantas específicas), época de aplicação (pré-plantio, pré-plantio incorporado, pré-emergência, pós-emergência) e translocação na planta (movimentação na planta) (Embrapa, 2021). Outra forma de classificação está relacionada ao mecanismo de ação, tais como os inibidores da ACCase (Acetil-CoA carboxilase), inibidores da ALS (acetolactato sintase), inibidores de Fotossistemas, inibidores da Protox (inibe a atuação da enzima protoporfirinogênio oxidase), inibidores da 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato (EPSP), inibidores da biossíntese de carotenoides, inibidores da glutamina, inibidores da divisão celular e mimetizadores de auxinas (Cimmino et al., 2015).

Devido à pressão de seleção exercida pelo excesso de aplicações de um mesmo herbicida químico com o mesmo mecanismo de ação durante anos consecutivos, surgem biótipos de espécies daninhas com resistência a esses herbicidas. Por consequência, a eficácia de alguns herbicidas tem sido comprometida e o número de relatos de espécies de plantas daninhas resistentes a um ou mais herbicidas com diferentes modos de ação vem crescendo, estreitando cada vez mais as possibilidades para o manejo (Santos, 2022).

A resistência de uma planta daninha a um herbicida está associada à seleção de biótipos resistentes que já existiam previamente. Isso ocorre devido à constante pressão de seleção causada por repetidas aplicações do mesmo herbicida ou mecanismo de ação, proporcionando condições favoráveis para a multiplicação da planta daninha (Vencill et al., 2012).

Quando se trata de espécies de plantas daninhas resistentes a herbicidas químicos, algumas têm recebido uma atenção especial devido às perdas que vem causando em culturas agrícolas (Heap, 2017). Existem hoje, no Brasil, 29 espécies de plantas daninhas resistentes a herbicidas, tais como: *Amaranthus retroflexus*, *A. viridis*, *Conyza sumatrensis*, *Eleusine indica*, *Bidens pilosa*, *Bidens subalternans*, *Euphorbia heterophylla*, *Digitaria insularis*, etc (Heap, 2017)

Digitaria insularis L. Fedde, popularmente conhecida como capim-amargoso, é uma das espécies daninhas que apresenta biótipos resistentes ao herbicida *glyphosate* e aos inibidores da acetil coenzima A carboxilase (ACCCase) (Carvalho, 2013). É uma planta robusta, nativa da América tropical e subtropical, encontrada em terrenos baldios e em áreas agricultáveis, tornando-se um grande problema de ordem econômica para os agricultores (Machado, 2008; Pyon et al., 1977). Além disso, é uma gramínea de ciclo perene, com metabolismo C4 (Kissmann e Groth, 1997), com alto potencial de infestação, já que suas sementes são facilmente dispersas pelo vento. As plantas podem reproduzir-se por rizomas e sementes, podendo produzir até 40.000 sementes/planta/ano (Machado, 2008).

O seu desenvolvimento inicial é lento e 45 dias após a emergência (DAE) seu crescimento é acelerado até os 105 DAE com as inflorescências ocorrendo entre 63 a 70 DAE (Takano et al., 2020). As sementes são pequenas e cobertas por pelos, característica que ajuda na dispersão dessa espécie, podendo até mesmo serem carregadas por animais, insetos e vento. Uma vez introduzidas em novas áreas e existindo as condições ideais, como uma ampla faixa de temperatura e intensidade luminosa, e com o alto poder germinativo das sementes, contribuindo assim para a disseminação da espécie, novas plantas de *D. insularis* são capazes de se instalarem e se reproduzirem (Mendonça et al., 2014).

As características de agressividade do capim-amargoso e a existência de biótipos resistentes ao *glyphosate* e aos inibidores da acetil coenzima A carboxilase (ACCCase) colocam essa planta daninha em evidência no cenário agrícola brasileiro (Zobiolo et al., 2016). A maioria das populações de plantas de *D. insularis* presentes na América do Sul são resistentes ao *glyphosate* (Lopez Ovejero et al., 2017). O primeiro caso de resistência de *D. insularis* ao *glyphosate* foi relatado em 2005 no Paraguai e, posteriormente, nos campos de soja do Brasil e Argentina (Heap 2019). Os problemas de infestação e controle dessa espécie tem se agravado em grande parte das regiões produtoras do Brasil. Tal fato torna-se um dos principais desafios técnicos no manejo de plantas daninhas, sendo necessário mais investimentos em programas de monitoramento e pesquisa para o manejo dessa importante espécie de daninha nos diferentes sistemas de cultivo do nosso país (Adegas, 2017).

Frente ao cenário de ampla distribuição de biótipos de *D. insularis* resistentes aos herbicidas químicos, fica clara a necessidade de novos estudos visando outras formas de manejo dessa planta daninha. Dentre as possibilidades ainda inexploradas para o manejo do capim-amargoso, destaca-se o controle biológico, que consiste na supressão ou estabilização de populações de espécies indesejáveis (no caso, as plantas daninhas) utilizando-se seus inimigos naturais.

Os fungos fitopatogênicos apresentam-se como inimigos naturais de grande potencial (Auld; Morin, 1995). Entretanto, somente a partir do início dos anos 70 iniciaram-se os primeiros estudos em programas de controle biológico de plantas daninhas (Oliveira; Brighenti, 2018).

Existem duas abordagens relacionadas ao controle biológico utilizando fitopatógenos como agentes: o método clássico ou inoculativo e o método de mico-herbicida ou inundativo. O método clássico consiste na introdução de um patógeno inimigo natural de uma “planta-alvo” que foi selecionada no seu centro de origem e será inoculada na planta-alvo que se tornou de difícil controle na nova área de distribuição, pois está livre de seus inimigos naturais, visando restabelecer o equilíbrio. Já o método de mico-herbicida ou inundativo envolve o uso de fungos fitopatogênicos endêmicos, já associados à planta-alvo, que são produzidos de forma massal, sendo formulados e aplicados de modo semelhante a um herbicida químico onde a população da planta daninha está estabelecida (McRae, 1988).

No caso do capim-amargoso, a melhor forma de manejá-lo é através do método inundativo utilizando um bioherbicida desenvolvido a partir de um fungo fitopatogênico. O uso de bioherbicidas teve seu início na década de 1980 na América do Norte, onde foram desenvolvidos e comercializados para controlar algumas espécies de plantas daninhas: Collego® (atualmente LockDown™), à base de *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*, para o controle de *Aeschynomene virginica*; Devine®, formulado à base de *Phytophthora palmivora* para o controle de *Morrenia odorata*; Biomal®, desenvolvido para o controle de *Malva pusila* (= *Malva rotundifolia* L.) à base de *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* (Figueiredo, 1995) e Camperico®, desenvolvido a partir da bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *poae* para controle de *Poa annua* L. no Japão (Imaizumi et al., 1997). Para o controle de *Parkinsonia aculeata* foi desenvolvido o produto Di-Bark® Parkinsonia, à base dos fungos *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Neoscytalidium novaehollandiae* e *Macrophomina phaseolina*, registrado em 2018 e comercialmente disponível na Austrália (Galea e Goulter, 2013; Morim, 2020). Entretanto, até o momento, não existe nenhum bioherbicida registrado no Brasil (Mondim, 2023).

Para a prospecção de futuros bioherbicidas é necessário identificar os inimigos naturais na própria planta-alvo localizada em campo e amostras de tecidos doentes devem ser coletadas, identificadas e conduzidas para laboratório para isolamento de microrganismos. Após isolamentos, a identificação, no caso dos isolados fúngicos, é realizada a nível de gênero através da morfologia, ou utilizando a região ITS (Internal Transcribed Spacer), que é uma região espaçadora encontrada entre os genes ribossomais de fungos e com alta repetibilidade no genoma. Após realizada a identificação prévia, são realizados testes de patogenicidade através de observações visuais; se o isolado provocar lesões, ele é patogênico ao capim-amargoso, e a seleção de agressividade é de acordo com o tamanho e quantidade de lesões provocadas por aquele isolado, assim selecionando isolados promissores.

Os fungos fitopatogênicos avaliados quanto à possibilidade de se tornarem um bioherbicida podem ser classificados como fungos necrotróficos ou biotróficos. Fungos fitopatogênicos necrotróficos são os que acometem os tecidos sadios das plantas, causando lesões em caules, folhas e raízes. De modo geral, os patógenos necrotróficos causam sintomas como necroses, manchas foliares, lesões em caule e podridões, sendo facilmente visualizados em condições de campo (Auld; Morin, 1995). Por outro lado, os fungos fitopatogênicos biotróficos são aqueles que se alimentam dos nutrientes do hospedeiro, mas não provocam a morte dele, mantendo assim uma relação parasita-hospedeiro estável, sobrevivendo e multiplicando-se apenas em tecidos vivos (Melo, Azevedo 2021).

Plantas doentes coletadas em campo devem ser georreferenciadas, de modo a obter as coordenadas geográficas por receptor de GPS manual. Depois, visando entender a distribuição espacial desses fungos em relação às suas ocorrências, podem ser gerados mapas temáticos do levantamento (Dianese et al, 2022). Essas informações serão úteis para posterior cadastro dos isolados fúngicos coletados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) e para entendimento da ocorrência de determinados grupos de fungos de acordo com fatores climáticos regionais, além de conhecer as condições em que aquele isolado foi coletado.

Diante disso, este trabalho teve como objetivos: 1) apresentar a distribuição espacial dos fungos fitopatogênicos necrotróficos associados ao capim-amargoso que foram coletados nos estados de Minas Gerais, Goiás e São Paulo e estimar a ocorrência deles na área de abrangência das coletas; 2) selecionar os fungos necrotróficos coletados como potenciais agentes de controle biológico de *D. insularis*; 3) compilar e complementar informações sobre o potencial do fungo *Anthracoystis panici-leucophaei* como agente de controle biológico de *D. insularis*.

Referências

- ADEGAS, Fernando Storniolo; VARGAS, Leandro; GAZZIERO, Dionísio Luiz Pisa; KARAM, Décio. **Impacto econômico da resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil**. Londrina: Embrapa, 2017. (ISSN 2176-2864).
- AULD, Bruce A.; MORIN, Louise. Constraints in the Development of Bioherbicides. **Weed Technology**, [S.L.], v. 9, n. 3, p. 638-652, set. 1995. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0890037x00023964>.
- CARVALHO, Leonardo Bianco de Plantas Daninhas/Editado pelo autor, Lages, SC, 2013 vi, 82 p.: 14,8x21,0 cm Chandramohan, S.; Charudattan, R.; Sonoda, R.M.; Singh, M. (2000) Multiple-pathogen strategy: a novel approach for bioherbicidal control of several weeds. In: "3º International Weed Science Congress". Foz do Iguaçu, Brazil.
- CIMMINO, Alessio; MASI, Marco; EVIDENTE, Marco; SUPERCHI, Stefano; EVIDENTE, Antonio. Fungal phytotoxins with potential herbicidal activity: chemical and biological characterization. **Natural Product Reports**, [S.L.], v. 32, n. 12, p. 1629-1653, ago. 2015. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c5np00081e>.
- DIANESE, José Carmine; INÁCIO, Carlos Antônio; CARVALHO-JUNIOR, Anibal Alves de; SANTOS, Maria do Desterro Mendes dos; CANTILLO-PÉREZ, Taimy; PINHO, Danilo Batista. Exploring the overlooked diversity of plant-associated Cerrado Microfungi. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, [S.L.], v. 28, p. 69-101, 30 jan. 2021. Sociedade Brasileira De Fitopatologia. <http://dx.doi.org/10.31976/0104-038321v280004>.
- DIAS, A.C.R.; CARVALHO, S.J.P.; MARCOLINI, L.W.; MELO, M.s.C.; CHRISTOFFOLETI, P.J.. Competitiveness of alexandergrass or Bengal dayflower with soybean. **Planta Daninha**, [S.L.], v. 28, n. 3, p. 515-522, 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-83582010000300008>.
- FIGUEIREIDO, G. Herbicidas microbiológicos empregados no controle de planta daninhas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. 3 ed, v. 1, p. 111-132, 1995.
- FRANDOLOSO, Fernando. et al. Competition of maize hybrids with alexandergrass (*Urochloa plantaginea*). **Australian Journal Of Crop Science**, Austrália, n. 13092019, p. 1447-1455, 20 set. 2019. Southern Cross Publishing. <http://dx.doi.org/10.21475/ajcs.19.13.09.p1540>.
- GALEA, V.; GOULTER, K. Field evaluation of a bioherbicide for control of parkinsonia (*Parkinsonia aculeata*) in Australia. 2013. In: Proceedings of the 19th Australasian Plant 28 Pathology Conference. Auckland, New Zealand: Australasian Plant Pathology Society (APPS), 2013
- HEAP, I. **International Survey of Herbicide Resistant Weeds**. Disponível em: <https://www.weedscience.org/>. Acesso em: 01 abr. 2019.
- IMAIZUMI, S.; NISHINO, T.; MIYABE, K.; FUJIMORI, T.; YAMADA, M.. Biological Control of Annual Bluegrass (*Poa annua*L.) with a Japanese Isolate of *Xanthomonas campestris* sp. poae (JT-P482). **Biological Control**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 7-14, jan. 1997. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/bcon.1996.0475>.
- KISSMANN, Kurt Gottfried; GROTH, Doris. **PLANTAS INFESTANTES E NOCIVAS**. 2. ed. São Paulo: Basf, 1997. 722 p.
- OVEJERO, Ramiro F. Lopez; TAKANO, Hudson K.; NICOLAI, Marcelo; FERREIRA, Antonio; MELO, Marcel S. C.; CAVENAGHI, Anderson L.; CHRISTOFFOLETI, Pedro J.; OLIVEIRA, Rubem S.. Frequency and Dispersal of Glyphosate-Resistant Sourgrass (*Digitaria insularis*) Populations across

Brazilian Agricultural Production Areas. **Weed Science**, [S.L.], v. 65, n. 2, p. 285-294, 23 jan. 2017. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/wsc.2016.31>.

MACHADO, A.F.L.; FERREIRA, L.R.; FERREIRA, F.A.; FIALHO, C.M.T.; TUFFI SANTOS, L.D.; MACHADO, M.S. Análise de crescimento de *Digitaria insularis*. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 24, n. 4, p. 641-647, 2006

MCRAE, C. F.. Classical and inundative approaches to biological weed control compared. **Plant Protection Quarterly**, [s. l], v. 3, n. 3, p. 124-127, 1988.

MELO, Itamar Soares de; AZEVEDO, João Lúcio de (ed.). **Microbiologia Ambiental**. 2. ed. Jaguariúna: Embrapa, 2008. 647 p.

MENDONÇA, Giovana Soares de; MARTINS, Cibele Chalita; MARTINS, Dagoberto; COSTA, Neumárcio Vilanova da. Ecophysiology of seed germination in *Digitaria insularis* ((L.) Fedde)1. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 45, n. 4, p. 824-832, out. 2014.

MORIN, Louise. Progress in Biological Control of Weeds with Plant Pathogens. **Annual Review Of Phytopathology**, [S.L.], v. 58, n. 1, p. 201-223, 25 ago. 2020. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-010820-012823>.

OLIVEIRA, Maurílio Fernandes de; BRIGHENTI, Alexandre Magno. **Controle de plantas daninhas: métodos físico, mecânico, cultural, biológico e alelopatia..** Brasília, Df: Embrapa, 2018. 194 p.

PETERSON, M.A.; COLLAVO, A.; OVEJERO, R.; SHIVRAIN, V.; WALSH, M.J. The challenge of herbicide resistance around the world: a current summary. *Pest Management (2018) Science*. 74: 2246-2259.

PYON, Jong Yeong; WHITNEY, A.s.; NISHIMOTO, R.K.. Biology of Sourgrass and Its Competition with Buffelgrass and Guinea grass. **Weed Science**, [S.L.], v. 25, n. 2, p. 171-174, mar. 1977. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0043174500033191>.

SANTOS, Letícia Menezes. **COMERCIALIZAÇÃO DOS ALIMENTOS AGROECOLÓGICOS E ORGÂNICOS NOS CIRCUITOS CURTOS EM ARACAJU/SE**. 2022. 126 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Geografia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 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, p. 1-6, mar. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.12.011>.

VENCILL, William K.; NICHOLS, Robert L.; WEBSTER, Theodore M.; SOTERES, John K.; MALLORY-SMITH, Carol; BURGOS, Nilda R.; JOHNSON, William G.; MCCLELLAND, Marilyn R.. Herbicide Resistance: toward an understanding of resistance development and the impact of herbicide-resistant crops. **Weed Science**, [S.L.], v. 60, n. 1, p. 2-30, 2012. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1614/ws-d-11-00206.1>.

WANDSCHEER, A.C.D.; RIZZARDI, M.A.; REICHERT, M.; GAVIRAGHI, F.. Capacidade Competitiva da Cultura do Milho em Relação ao Capim-Sudão. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 129-141, 30 ago. 2014. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*. <http://dx.doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v13n2p129-141>.

ZOBIOLE, Luiz Henrique Saes; KRENCHINSKI, Fábio Henrique; ALBRECHT, Alfredo Junior Paiola; PEREIRA, Gabriel; LUCIO, Felipe Rodolfo; ROSSI, Caio; RUBIN, Rogério da Silva. Controle

de capim-amargoso perenizado em pleno florescimento. **Revista Brasileira de Herbicidas**, [S.L.], v. 15, n. 2, p. 157, 15 jun. 2016. Revista Brasileira de Herbicidas. <http://dx.doi.org/10.7824/rbh.v15i2.474>.

CAPÍTULO 1 - DIVERSIDADE E DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS ASSOCIADOS À *Digitaria insularis*

Resumo

O capim-amargoso (*Digitaria insularis* L. Fedde) é uma planta daninha altamente prejudicial à agricultura brasileira devido à sua capacidade competitiva com as culturas, rápido crescimento e dispersão agressiva. Diante do aumento da resistência das plantas daninhas aos herbicidas químicos, o controle biológico emerge como uma alternativa promissora. Para o capim-amargoso, fungos fitopatogênicos necrotróficos e biotróficos destacam-se como potenciais agentes de controle biológico. A bioprospecção por um candidato promissor envolve a coleta de plantas infectadas por fungos no campo, sua análise em laboratório e a identificação de características desejáveis para o desenvolvimento de um bioherbicida e, concomitantemente, a espacialização das ocorrências dos fungos coletados. Este estudo teve como objetivo mapear a ocorrência de fungos fitopatogênicos associados ao capim-amargoso em Minas Gerais, São Paulo e Goiás, identificando preliminarmente os isolados e testando sua patogenicidade. Foram coletadas amostras de *D. insularis* em diferentes localidades desses estados e 204 isolados fúngicos foram obtidos e testados quanto à patogenicidade. Dos isolados testados, 79 foram considerados patogênicos para o capim-amargoso. Realizou-se análises morfológicas e filogenéticas dos isolados que permitiram identificar 67 desses isolados, pertencentes a 17 gêneros fúngicos. A predominância de isolados ocorreu em Minas Gerais, especialmente nas mesorregiões do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. Os gêneros mais comuns foram *Fusarium* e *Didymella*. As ocorrências foram mapeadas geograficamente, destacando a distribuição dos gêneros fúngicos em diferentes municípios. O estudo forneceu *insights* importantes para o desenvolvimento de estratégias de controle biológico do capim-amargoso. Este estudo revela a diversidade e distribuição geográfica dos fungos fitopatogênicos associados ao capim-amargoso, fornecendo uma base para futuras pesquisas visando o controle eficaz dessa planta daninha.

1. Introdução

O capim-amargoso (*Digitaria insularis* L. Fedde) é uma das plantas daninhas mais nocivas na agricultura brasileira por conta da sua alta competitividade com as culturas e desenvolvimento rápido e agressivo (Dias et al., 2010). É uma espécie nativa da América tropical e subtropical e frequentemente encontrada em pastagens, cafezais, pomares e em áreas ruderais, como beira de estradas e terrenos baldios, sendo especialmente problemática na cultura da soja no Brasil (Pyon et al., 1977; Machado et al., 2008).

O capim-amargoso tem recebido crescente atenção devido à sua capacidade de estabelecimento de biótipos resistentes ao herbicida *glyphosate* e aos inibidores da acetil coenzima A carboxilase (ACCase) e pelo seu alto potencial de infestação com capacidade de reproduzir via sementes (40.000 sementes/planta/ano) e rizomas (Carvalho, 2013). Como em

muitas espécies perenes de gramíneas, suas sementes são os principais meios de introdução em novas áreas (Carvalho, 2013). As sementes são cobertas por aristas, que facilitam a dispersão por animais, insetos e pelo vento (Gemelli et al., 2012). Uma vez dispersas, essas sementes podem germinar sob uma ampla faixa de temperatura e intensidade luminosa, contribuindo para a disseminação da espécie em diversas regiões do Brasil (Mendonça et al., 2014). Algumas estratégias de manejo de plantas daninhas vêm sendo utilizadas na agricultura, tais como mecânicas, culturais e químicas. Por muitos anos, o controle químico tem sido a estratégia predominante para o manejo de plantas daninhas, o que inclui *D. insularis* (Cimmino et al., 2015). Entretanto, a indústria de herbicidas químicos viveu um momento de estagnação de inovação, ou seja, novos herbicidas com um alvo molecular claramente novo ou Modo de Ação (MOA) não eram lançados no mercado há cerca de 30 anos (Gerwick et al., 2010). No ano de 2021, a empresa FMC obteve uma nova classificação de modo de ação para sua molécula proprietária de herbicida, o *tetflupirrolimet*. É o primeiro ingrediente ativo do Grupo 28 do Comitê de Ação de Resistência a Herbicidas (HRAC) e da *Weed Science Society of America* (WSSA) e o primeiro novo herbicida com um novo modo de ação na indústria de proteção de cultivos em mais de 30 anos.

Nas últimas décadas, houve aumento significativo na seleção de plantas daninhas resistentes aos herbicidas químicos (Heap, 2019). Diante desse cenário, o controle biológico torna-se uma opção de manejo cada vez mais procurada. Esse tipo de controle consiste na supressão ou estabilização de populações de espécies indesejáveis (no caso, de plantas daninhas) em níveis subeconômicos, utilizando-se inimigos naturais.

Como *D. insularis* possui resistência ao *glyphosate* e aos inibidores da acetil coenzima A carboxilase, essa espécie apresenta-se como um alvo interessante para a implementação do controle biológico. Existem duas abordagens para definir o controle biológico: a clássica, que envolve a introdução de um inimigo natural específico de uma planta daninha a ser manejada em alguma área onde já é considerada um problema (Pitelli, 2003), e outra abordagem, trabalhada no manejo de plantas daninhas, que utiliza fitopatógenos como ingrediente ativo de um produto comercial. Isso é feito por meio de aplicações sucessivas de inóculo do agente fitopatogênico, conhecida como abordagem inundativa (Boyetchko et al., 2002).

Dentre os inimigos naturais de *D. insularis*, os fungos fitopatogênicos podem se destacar no manejo dessa planta daninha; no entanto, nem todos os microrganismos infecciosos apresentam as qualidades necessárias para a produção de um bioherbicida (Oliveira; Brighenti, 2018).

Para desenvolver um bioherbicida, é preciso obter fungos fitopatogênicos associados ao capim-amargoso que apresentem as características desejáveis, tais como: fácil cultivo e produção de estruturas infecciosas, gama de hospedeiro limitada, virulência, estabilidade genética, efeito rápido em relação ao manejo da planta daninha e adequada vida de prateleira (Kumar; Aggarwal; Malik, 2018). Essa bioprospecção por um candidato promissor é feita através da coleta de plantas infectadas no campo, levando-as para o laboratório e obtendo culturas puras ou isolados. É fundamental nesse processo coletar as coordenadas geográficas para mapear os locais de coleta dos materiais vegetais.

A bioprospecção pode ser definida como a busca sistemática por organismos, genes, enzimas, compostos, processos e partes provenientes de seres vivos em geral que possam, eventualmente, levar ao desenvolvimento de um produto em vários setores de atividades como: biotecnologia, agricultura, nutrição, indústria farmacêutica e de cosméticos, biorremediação, saúde, dentre outros (Fenical, 1997). São etapas da bioprospecção: seleção da área e coleta de amostras, isolamento e obtenção de culturas puras dos fungos, triagem de atividades bioativas, identificação taxonômica, escalonamento e produção e desenvolvimento e tecnologia de aplicação (Harvey, 2008).

Este trabalho teve como objetivo realizar o mapeamento temático da ocorrência de fungos fitopatogênicos associados à *Digitaria insularis* em localidades nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Goiás. Além disso, comprovar a patogenicidade dos isolados obtidos e realizar a identificação preliminar dos isolados fitopatogênicos associados ao capim-amargoso.

2. Material e Métodos

2.1. Coletas das amostras de *D. insularis*

As coletas foram realizadas no período de 2019 a 2021 nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Goiás, em pontos aleatórios definidos de acordo com a ocorrência de *D. insularis*, tendo as coordenadas geográficas amostradas com auxílio de receptor GPS. As amostras de tecidos doentes de *D. insularis* foram acondicionadas em prensa botânica entre folhas de jornal e conduzidas para processamento ao Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia – LAMIF da Universidade Federal de Uberlândia, *Campus* Monte Carmelo-MG.

2.2. Obtenção dos isolados fúngicos, cultivo e armazenamento

Para obtenção dos isolados, folhas apresentando lesões necróticas foram observadas em microscópio estereoscópico e as estruturas fúngicas visíveis nas lesões foram transferidas com auxílio de seringa hipodérmica para placas de Petri contendo o meio de cultura caldo de vegetais ágar (CVA) (15 g de beterraba, 25 g de batata, 25 g de cenoura, 25 g de tomate, 25 g de abobora, 25 g de repolho, 6,5 g de abobrinha, 12,5 g de couve, 6,5 g de salsinha). Para preparar o caldo, os vegetais devem ser cozidos em água, posteriormente filtrados e deve-se completar o volume do caldo para 1 L, acrescido do antibiótico rifamicina para evitar o crescimento bacteriano e 20 g de ágar/L.

Quando as lesões não apresentaram nenhum tipo de estrutura fúngica visível, fragmentos limítrofes dos tecidos doentes com partes sadias e partes da lesão foram desinfestados em álcool 70% por 30 segundos, seguido de solução de hipoclorito de sódio (fórmula) 1% por 3 minutos e, posteriormente, em água destilada esterilizada para remover o excesso do hipoclorito de sódio. Os fragmentos desinfestados foram transferidos para placas de Petri contendo Batata Dextrose Ágar (BDA) e acondicionados em Incubadora BOD a 25 °C sob fotoperíodo de 12h.

Após o crescimento das colônias fúngicas, observou-se as características macromorfológicas dos isolados e realizou-se a repicagem para placas de Petri contendo BDA, a fim de obter culturas puras dos isolados.

As culturas monospóricas ou de ponta de hifa foram obtidas por meio da transferência de um único esporo ou de uma ponta de hifa isolada para placas de Petri contendo meio BDA e incubados a 25° C.

Os isolados foram armazenados em glicerol 10% à -80° C em ultrafreezer. Os materiais fúngicos coletados no campo foram depositados no herbário micológico da Universidade Federal de Viçosa - UFV (Herbarium VIC).

2.3. Teste de Patogenicidade

Para obtenção das plântulas em estágio fenológico ideal para inoculação dos fungos, as sementes de *D. insularis* foram obtidas da Empresa Agro Cosmos Ltda., localizada no município de Engenheiro Coelho - SP. Foram realizados testes de germinação para confirmar a viabilidade das sementes. Para isso, as sementes foram desinfestadas por 3 minutos em

solução de hipoclorito de sódio a 1% e enxaguadas em água destilada esterilizada e transferidas para papel filtro esterilizado para secagem.

Os testes de patogenicidade foram feitos para todos os isolados oriundos de lesões necróticas de capim-amargoso. Para tanto, foram semeadas superficialmente 15 - 20 sementes de capim-amargoso em vasos plásticos de 500 mL contendo solo, areia e esterco na proporção de 2:1:1 e esterilizadas em autoclave por 1 hora a 121° C.

Os isolados fúngicos obtidos foram cultivados por 7 dias em placas de Petri contendo BDA. Para cada isolado, foram utilizados 3 vasos, sendo cada vaso representando uma repetição. As plântulas de capim-amargoso com 20 dias após a semeadura foram inoculadas com um disco de micélio (6 mm de diâmetro) de cada isolado fúngico, em cada folha. Para as testemunhas foram feitas inoculações com discos de BDA sem fungo. Os vasos foram mantidos em câmara úmida por 48 horas (plástico transparente umedecido internamente envolvendo as plantas inoculadas) e, após esse período, foram retirados os plásticos e os vasos acondicionados em casa de vegetação.

As plantas foram observadas diariamente até 21 dias após as inoculações a fim de avaliar o aparecimento de sintomas foliares.

2.4. Extração de DNA, amplificação e sequenciamento

Para obtenção do DNA genômico, os isolados fúngicos foram cultivados em placas de Petri contendo o meio de cultura caldo batata dextrose (Merk KGaA, Alemanha) e incubados no escuro em BOD por 7 dias, a uma temperatura de 25 °C. Os micélios foram retirados com auxílio de pinça e transferidos para secagem por dois dias em papel filtro esterilizado. Em seguida, os micélios foram transferidos para tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL para maceração com auxílio de pistilo plástico e nitrogênio líquido.

Para a extração do DNA genômico foi utilizado o kit de purificação de DNA Wizard® (Promega), seguindo o protocolo do fabricante, e o DNA extraído foi quantificado em nanodrop.

Para a identificação molecular dos isolados fúngicos foi realizada a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), ou seja, a amplificação de regiões específicas do DNA. Para os isolados em que não foi possível identificar preliminarmente os gêneros através da morfologia, realizou-se primeiramente a PCR da região ITS (ITS1/ITS4) (White et al., 1990). Para isolados que foram identificados como do gênero *Fusarium* através da morfologia, foram realizadas PCR da

região do fator de elongação (TEF-1 α) utilizando os primers EF-1/EF-2 (O'Donnell *et al.*, 1998).

Cada reação de PCR consistiu em um volume de 25 μ L, composto de 0,3 μ L Taq DNA polimerase, 0,5 μ L dNTP (10mM), 2,5 μ L solução tampão 10x, 1,25 μ L de cada primer (10 μ M), 1 μ L de DNA 10-15 ng/ μ L e 18,20 μ L de água ultra pura esterilizada. Os produtos de PCR foram avaliados em gel de agarose 1% e visualizados em transiluminador. Os fragmentos amplificados foram purificados e sequenciados pela empresa ACTGene.

2.5. Análise Filogenética

As sequências consenso foram obtidas através do pacote de programa STADEN v.1.6 (STADEN, 1996) e foram manualmente ajustadas, quando necessário, utilizando o Programa Mega 7 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (Kumar et al., 2012). As sequências consenso foram comparadas no banco de dados do GenBank (*National Center for Biotechnology Information*), utilizando-se o sistema de busca com base no índice de similaridade usando o programa BLAST que está disponível no NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). O alinhamento das múltiplas sequências de região gênica individual foi realizado utilizando-se o MAFFT v. 7.110 (Katoh; Standley, 2013) e manualmente corrigido, quando necessário. A inferência filogenética desse estudo foi baseada em Máxima Verossimilhança (MV). A análise de MV foi realizada utilizando-se algoritmo RAxML v.7.0.3 no modelo GTR com 22 parâmetros e 1000 replicações (bootstrap) (Felsenstein, 1985; Stamatakis, 2006), pelo portal online CIPRES Science Gateway v. 3.3 (Miller et al., 2010). Os valores de bootstrap foram gerados automaticamente pelo programa analisado. As árvores filogenéticas foram visualizadas pelo programa Fig tree v. 1.4 (Rambaut; Drummond, 2008) e editadas no programa Adobe Illustrator Lite® Portable v.16.0.3.691.

2.6. Geração de mapas

Para a geração de mapas, os dados obtidos em campo foram categorizados em município de coleta e gênero fúngico por ponto de coleta, a fim de espacializar a ocorrência dos gêneros de fungos necrotróficos associados ao capim-amargoso. Para isso, foi utilizada a plataforma Google Earth Pro para coleta das coordenadas geográficas no Sistema de Referência WGS84, a qual fornece adequada precisão das coordenadas para essa aplicação. As coordenadas utilizadas foram em sistema de graus decimais da região central da área urbana de cada

município. Para a geração dos mapas temáticos foi utilizado o QGIS (Quantum GIS), versão 3.22.8.

3. Resultados

3.1. Coletas das amostras de *D. insularis*

As coletas foram realizadas em 127 pontos entre os Estados de Minas Gerais, São Paulo e Goiás, totalizando 27 municípios amostrados, sendo que 110 pontos de coletas foram em Minas Gerais, 9 pontos em Goiás e 8 pontos em São Paulo.

3.2. Obtenção dos isolados fúngicos, cultivo e armazenamento

Após os processamentos das amostras de capim-amargoso coletadas e a realização dos isolamentos, foram obtidos 204 isolados fúngicos que apresentavam características morfológicas diferentes. Apenas 11 isolados produziram esporos em meio de cultura BDA e foram identificados como sendo: 7 isolados do gênero *Fusarium* (KDI 0019, KDI 0058, KDI 0102, KDI 0135, KDI 0142, KDI 0143 e KDI 0145), 2 isolados do gênero *Bipolaris*-like (KDI 0124 e KDI 0125) e 2 isolados do gênero *Cladosporium* (KDI0116 e KDI118). Os isolados obtidos foram preservados em glicerol 10% e mantidos em ultrafreezer a -80 °C para estudos posteriores.

3.3. Teste de Patogenicidade

Dos 204 isolados fúngicos inoculados em plantas sadias de capim-amargoso, 79 provocaram algum tipo de lesão no local onde os discos de micélio de suas respectivas colônias foram inoculados nas folhas de capim-amargoso, mostrando-se, assim, que são patogênicos à espécie-alvo (Figura 1).

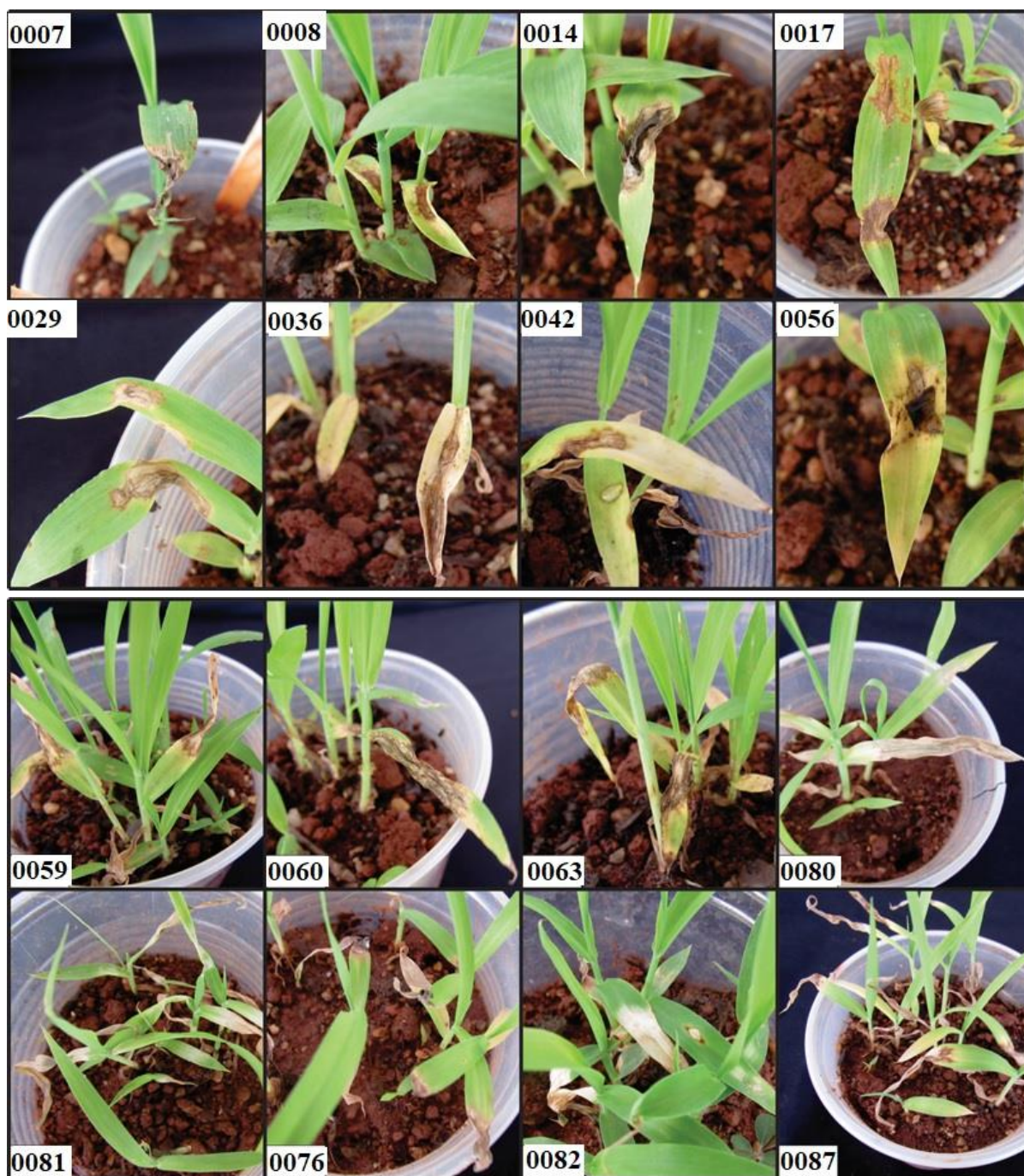


Figura 1. Teste de Patogenicidade em plântulas de capim-amargoso

Os isolados fúngicos que apresentaram alguma lesão nas folhas de capim-amargoso foram posteriormente reisolados e, a fim de realizar a identificação dos gêneros e espécies, tiveram seus DNA's extraídos, amplificados, sequenciados e submetidos a análises filogenéticas.

3.4. Extração de DNA, amplificação e sequenciamento

A identificação de alguns dos isolados a nível de gênero não foi possível por meio de observações morfológicas; sendo assim, a análise filogenética auxiliou na identificação dos gêneros. A maioria dos isolados não esporularam, havendo apenas o crescimento micelial.

Dentre os 79 isolados fitopatogênicos submetidos à extração de DNA, amplificação e sequenciamento, 67 isolados foram identificados e pertencem a 17 gêneros fúngicos e 10 famílias (Tabela 1).

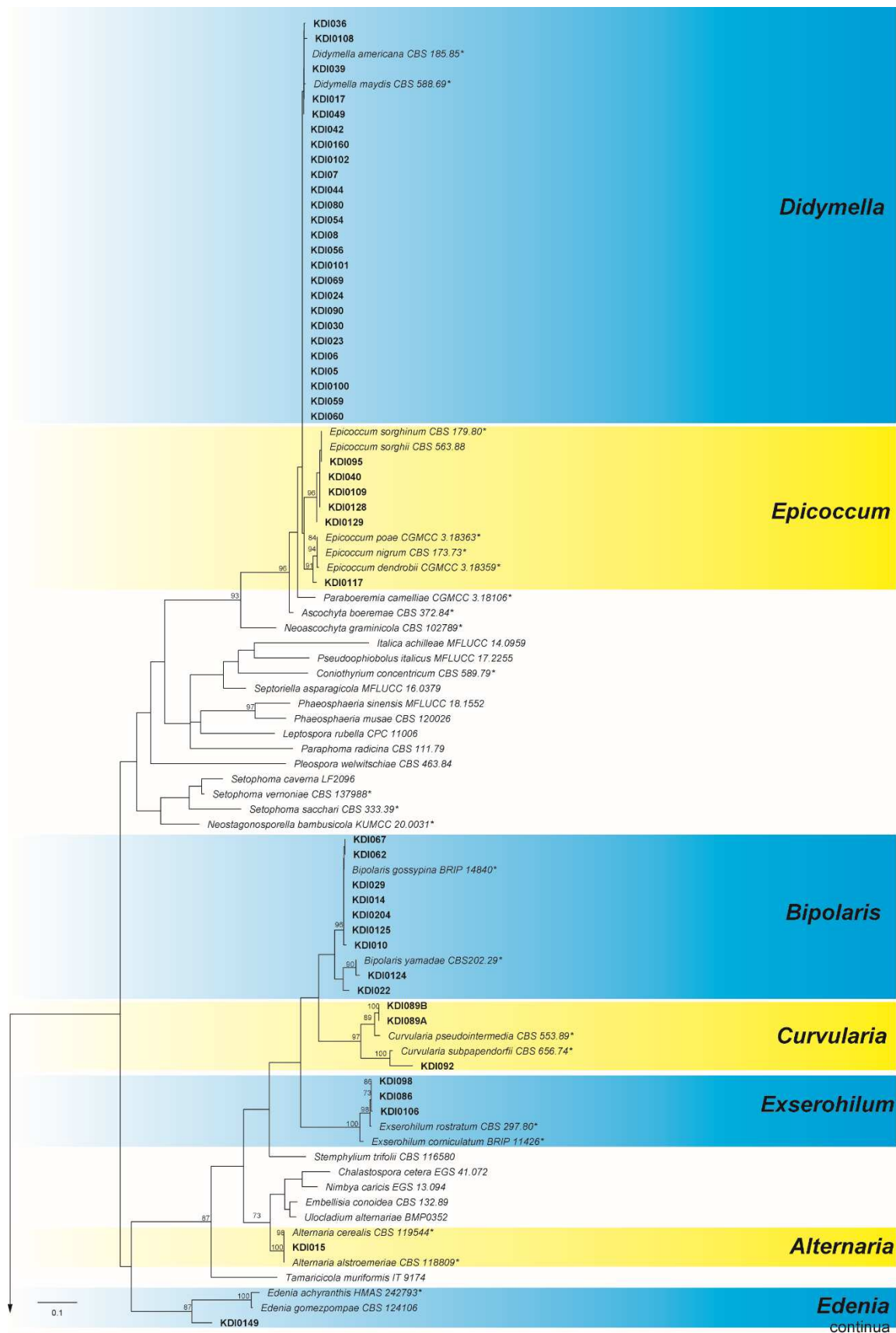
Tabela 1: Famílias fúngicas do Gêneros identificados

Gênero	Família
<i>Alternaria</i>	<i>Pleosporaceae</i>
<i>Apiospora</i>	<i>Apiosporeaceae</i>
<i>Bipolaris</i>	<i>Pleosporaceae</i>
<i>Cladosporium</i>	<i>Cladosporiaceae</i>
<i>Colletotrichum</i>	<i>Glomerellaceae</i>
<i>Curvularia</i>	<i>Pleosporaceae</i>
<i>Didymella</i>	<i>Didymellaceae</i>
<i>Edenia</i>	<i>Pleosporaceae</i>
<i>Emericellopsis</i>	<i>Bionectriaceae</i>
<i>Epicoccum</i>	<i>Didymellaceae</i>
<i>Exserohillum</i>	<i>Pleosporaceae</i>
<i>Fusarium</i>	<i>Nectriaceae</i>
<i>Microdochium</i>	<i>Microdochiaceae</i>
<i>Neottiosporina</i>	<i>Massarinaceae</i>
<i>Nigrospora</i>	<i>Apiosporeaceae</i>
<i>Neokalmusia</i>	<i>Didymosphaeriaceae</i>
<i>Pseudopithomyces</i>	<i>Didymosphaeriaceae</i>

3.5. Análise Filogenética

Foram realizadas as identificações de 67 isolados somente baseadas na análise filogenética RAxML, dado o resultado das sequências da região ITS. Os isolados foram agrupados em 17 gêneros: 1 isolado de *Alternaria* (KDI 0015), 1 isolado de *Apiospora* (KDI 0127), 9 isolados de *Bipolaris* (KDI 0010, KDI 0014, KDI 0022, KDI 0029, KDI 0062, KDI 0067, KDI 0124, KDI 0125, KDI 0204), 2 isolados de *Cladosporium* (KDI 0116, KDI 0118), 1 isolado de *Colletotrichum* (KDI 0028), 3 isolados de *Curvularia* (KDI 0089A, KDI 0089B, KDI 0092), 25 isolados de *Didymella* (KDI 0005, KDI 0006, KDI 0007, KDI 0008, KDI 0017, KDI 0023, KDI 0024, KDI 0030, KDI 0036, KDI 0039, KDI 0042, KDI 0044, KDI 0049 KDI 0054, KDI 0056, KDI 0059, KDI 0060, KDI 0069, KDI 0080, KDI 0090, KDI 0100, KDI 0101,

KDI 0102, KDI 0108, KDI 0160), 1 isolado de *Edenia* (KDI 0149), 2 isolados de *Emericellopsis* (KDI 0130 e KDI 0133), 6 isolados de *Epicoccum* (KDI 0040, KDI 0095, KDI 0109, KDI 0117, KDI 0128, KDI 0129) 3 isolados de *Exserohillum* (KDI 0086, KDI 0098, KDI 0106), 7 isolados de *Fusarium* (KDI 0082, KDI 0103, KDI 0104, KDI 0105, KDI 0110, KDI 0119, KDI 0164), 1 isolado de *Microdochium* (KDI 0147), 1 isolado de *Neokalmusia* (KDI 0126), 1 isolado de *Nettiosporina* (KDI 0061), 2 isolados de *Nigrospora* (KDI 0037, KDI 0113) e 1 isolado de *Pseudopithomyces* (KDI 0115).



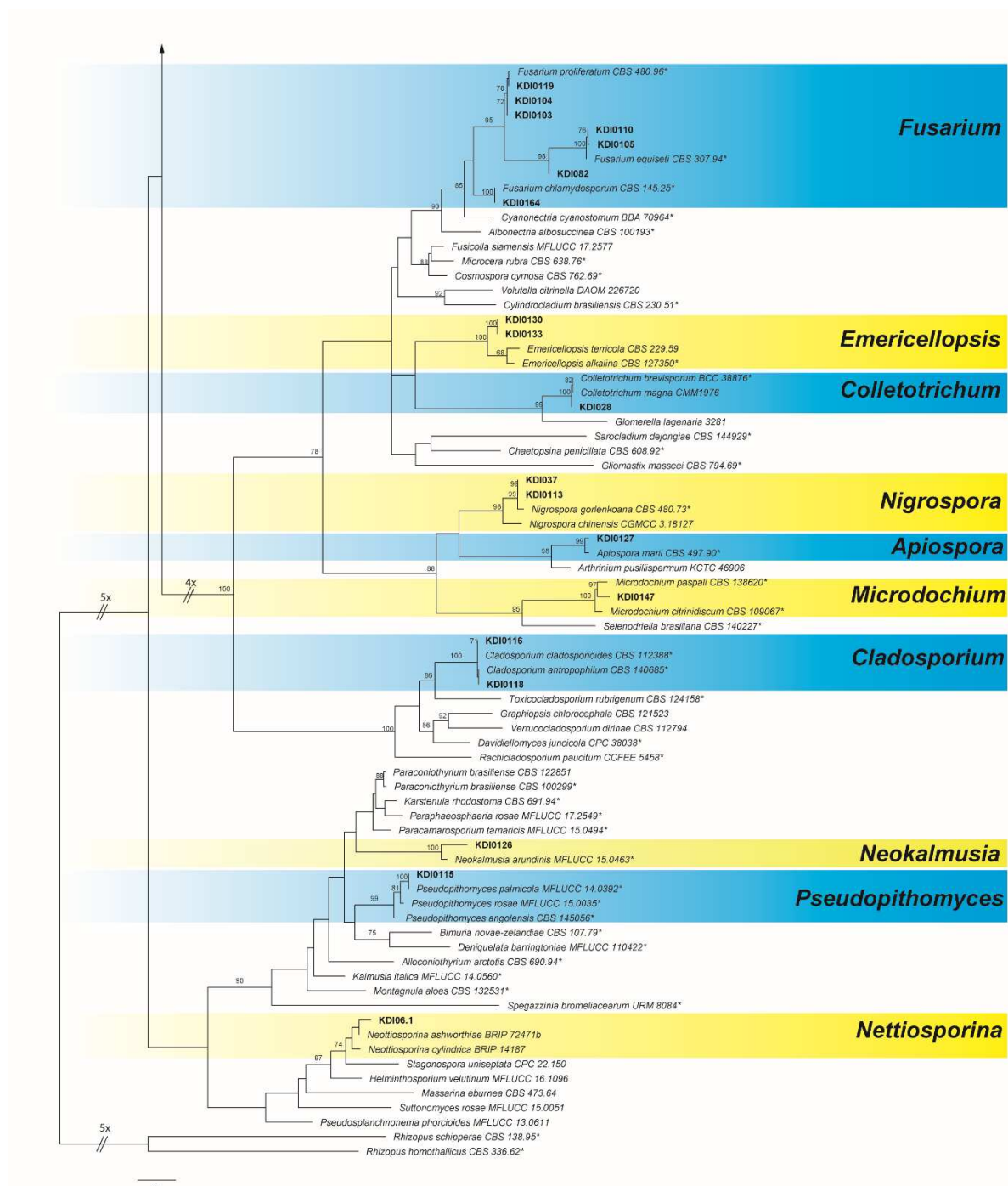


Figura 2. Análise filogenética inferida pela máxima verossimilhança baseada no alinhamento da região ITS de isolados fúngicos fitopatogênicos associados à *Digitaria insularis* (capim-amargoso) de várias famílias e outgroup. Somente os valores de suporte de RAXML acima de 70% são mostrados nos nós. Os gêneros dos isolados identificados na análise estão delimitados por caixas coloridas, com o nome do gênero indicado à direita. Isolados com “*” no final da identificação do isolado são isolados identificados como ex-type ou isolados representativos. A análise filogenética foi enraizada com os isolados *Rhizopus schipperae* CBS 138.95 e *Rhizopus homothallicus* CBS 336.62.

Foram identificados sete isolados (KDI 0002, KDI 0019, KDI 0058, KDI 0135, KDI 0142, KDI 0143, KDI 0145) do gênero *Fusarium* através da morfologia dos conídios e do crescimento micelial em meio de cultura. Além disso, foram realizadas análises filogenéticas

específicas com o gene TEF-1 α a fim de identificar as espécies de *Fusarium*. Foram identificadas 3 espécies de *Fusarium* associadas ao capim-amargoso (Figura 3), sendo 4 isolados (KDI 0135, KDI 0142, KDI 0143, KDI 0145) pertencentes à espécie *Fusarium tjaetaba*, 2 isolados (KDI 0002, KDI 0019) como *Fusarium annulatum*, 1 isolado (KDI 0058) como *Fusarium madaense*.

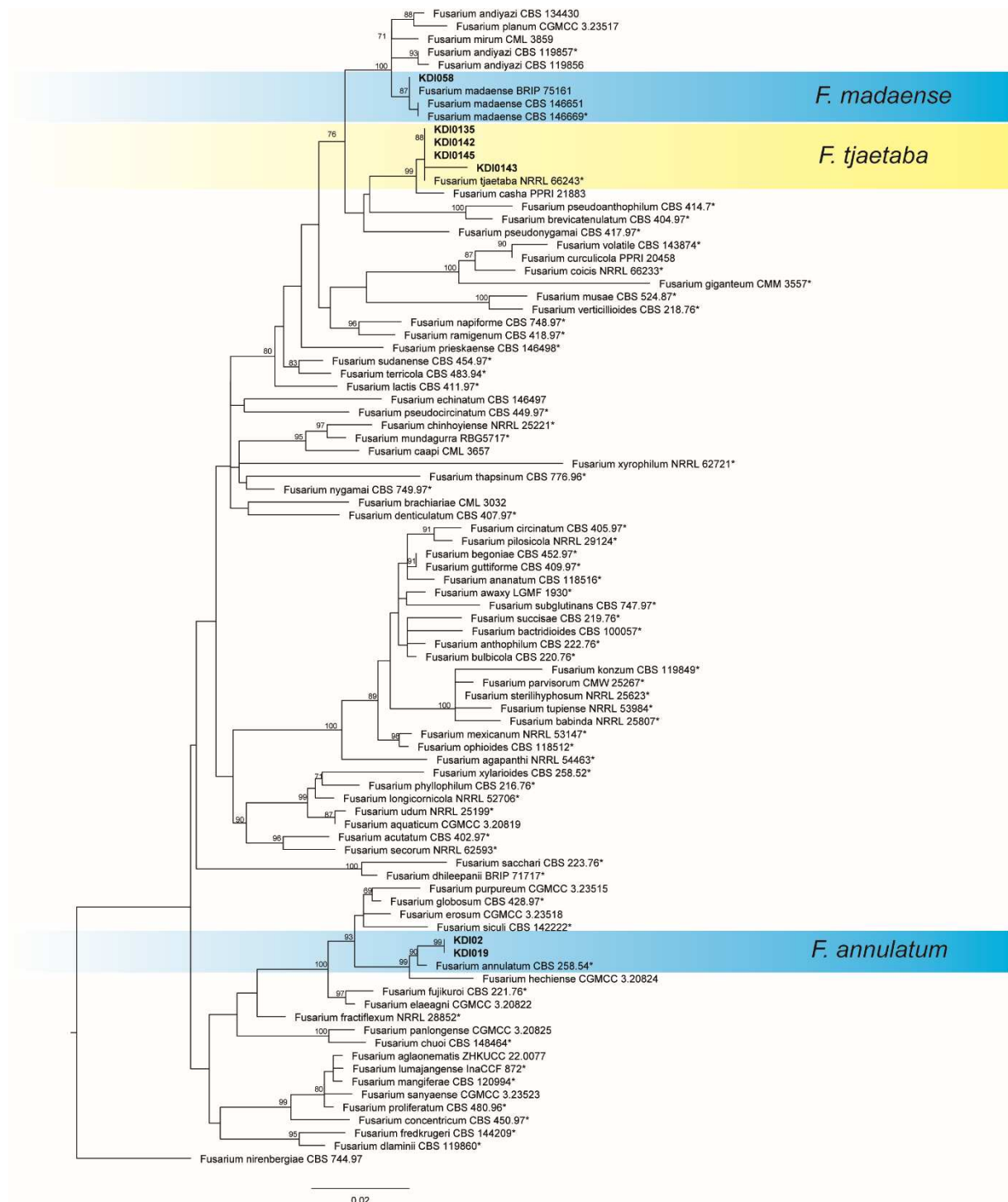


Figura 3. Análise filogenética inferida pela máxima verossimilhança baseada no alinhamento do gene de fator de alongação (TEF-1 α) de isolados de espécies fitopatogênicas de *Fusarium* associados à

Digitaria insularis (capim-amargoso) e outgroup. Somente os valores de suporte de RAxML acima de 70% são mostrados nos nós. As espécies dos isolados identificados na análise estão delimitados por caixas coloridas, com o nome do gênero indicado à direita. Isolados com “*” no final da identificação do isolado são isolados identificados como ex-type ou isolados representativos. A análise filogenética foi enraizada com o isolado *Fusarium nirenbergiae* CBS 744.97.

3.6. Geração de mapas

Os gêneros mais encontrados nos 3 Estados de coleta foram *Fusarium* e *Didymella*, sendo o gênero *Didymella* o único que foi isolado das amostras nos três Estados; *Fusarium* e *Curvularia* foram isolados de amostras dos Estados de Minas Gerais e Goiás, ao passo que *Epicoccum* e *Cladosporium* foram isolados das amostras de Minas Gerais e São Paulo (Tabela 2).

Tabela 2: Isolados de gêneros de fungos fitopatogênicos associados à *D. insularis* e suas ocorrências por estado

Gênero	MG	SP	GO
<i>Alternaria</i>	1	0	0
<i>Apiospora</i>	1	0	0
<i>Bipolaris</i>	9	0	0
<i>Cladosporium</i>	1	1	0
<i>Colletotrichum</i>	1	0	0
<i>Curvularia</i>	1	0	2
<i>Didymella</i>	19	2	4
<i>Edenia</i>	1	0	0
<i>Emericellopsis</i>	2	0	0
<i>Epicoccum</i>	4	2	0
<i>Exserohillum</i>	3	0	0
<i>Fusarium</i>	6	0	1
<i>Microdochium</i>	1	0	0
<i>Neokalmusia</i>	1	0	0
<i>Nettiosporina</i>	1	0	0
<i>Nigrospora</i>	1	1	0
<i>Pseudopithomyces</i>	0	1	0
	53	7	7

A predominância do número de isolados obtidos em Minas Gerais deu-se ao fato de o maior número de coletas estar concentrado nesse Estado, uma vez que os pontos de partida e chegada dos campos de coletas foi a cidade de Monte Carmelo.



Figura 4. Mapa dos Municípios onde foram realizadas as coletas de *D. Insularis*. Os símbolos representam o centroide da área urbana dos municípios em que foram realizadas as coletas.

A maior concentração de coletas está localizada na região Central do estado de Minas Gerais, especificamente nas mesorregiões do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, e a menor concentração está nos estados de Goiás e São Paulo.

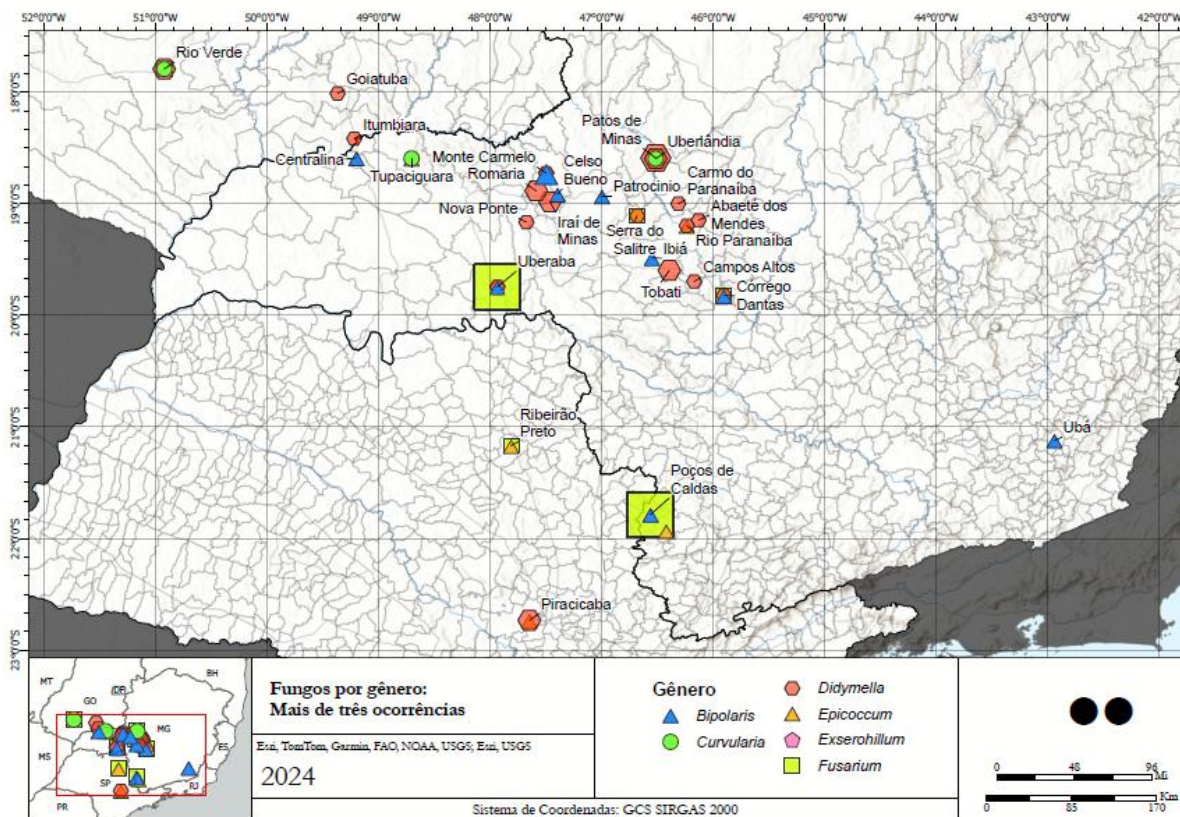


Figura 5. Mapa de localização dos gêneros com mais de três ocorrências. O mapa apresenta a localização dos gêneros de maior ocorrência, com mais de três ocorrências, diferenciados por formas geométricas.

Nota-se (Figura 5) que o gênero *Bipolaris*, representado pela forma geométrica de triângulo, foi encontrado apenas em cidades de Minas Gerais. O gênero *Curvularia* foi encontrado em duas cidades de Minas Gerais (Uberlândia e Tupaciguara) e uma no Estado de Goiás (Rio Verde). Em relação ao gênero *Didymella*, ele foi encontrado em 21 cidades de Minas Gerais, em 4 cidades em Goiás e em 1 cidade de São Paulo; o gênero *Epicoccum* foi encontrado em 4 cidades de Minas Gerais (Tupaciguara, Poços de Caldas, Caldas e Rio Paranaíba) e 2 cidades em São Paulo (Ribeirão Preto e Piracicaba); já o gênero *Fusarium* foi encontrado 14 vezes em Minas Gerais, 1 vez em São Paulo e 1 vez em Goiás.

Os outros gêneros em que a ocorrência foi menor do que três vezes estão representados no mapa da Figura 6.

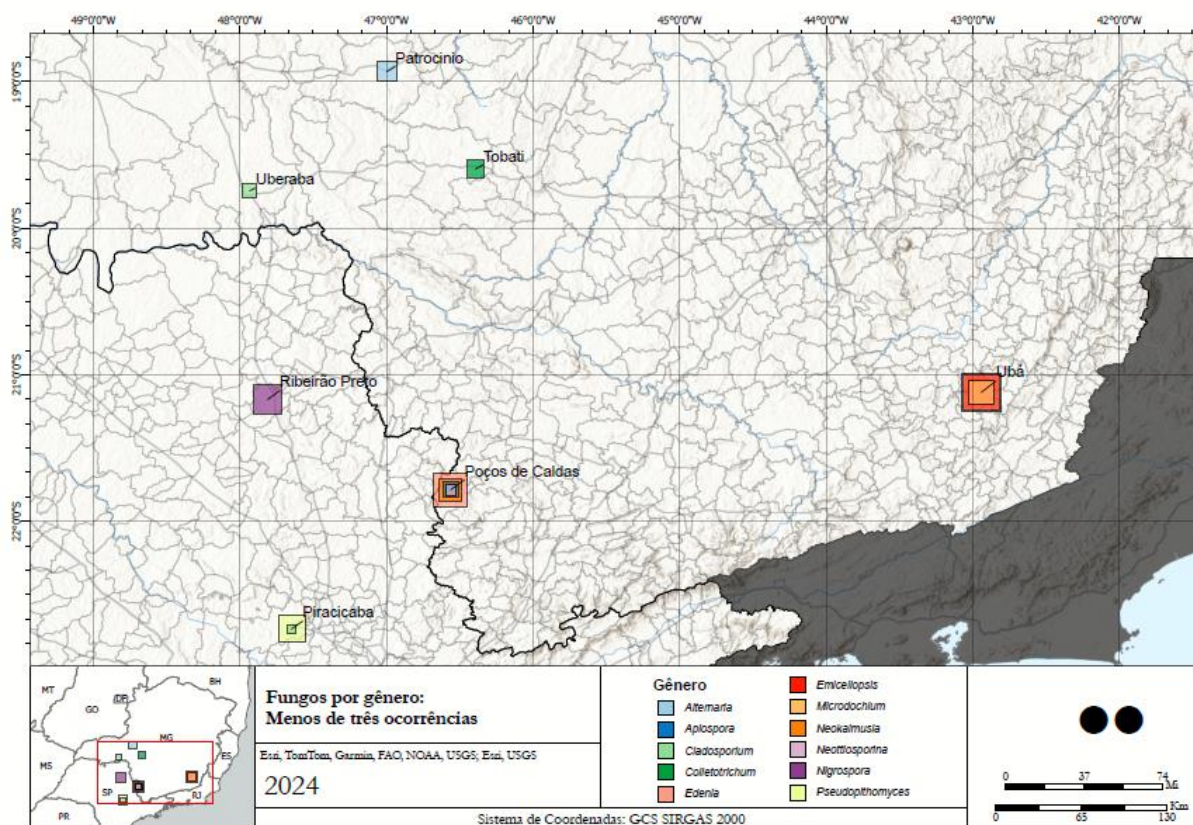


Figura 6. Mapa de localização de gêneros com menos de três ocorrências. O mapa diferencia os gêneros por meio da figura geométrica de quadrado com cores diferentes para cada gênero fúngico associado à *Digitaria insularis*.

Os dois isolados do gênero de *Emericellopsis* foram isolados de amostras da cidade de Ubá – MG; o gênero *Cladosporium* foi um isolado obtido da cidade de Uberaba – MG e outro na cidade de Piracicaba-SP; do gênero *Exserohillum* foram isoladas duas colônias fúngicas, uma da cidade de Rio Verde - GO e outra da cidade de Monte Carmelo – MG; demais gêneros que estão representados no gráfico aparecem uma única vez.

Os pontos de ocorrência dos fungos são apresentados no mapa da Figura 7 de forma quantitativa, demonstrando a ocorrência dos isolados fúngicos na área de estudo.

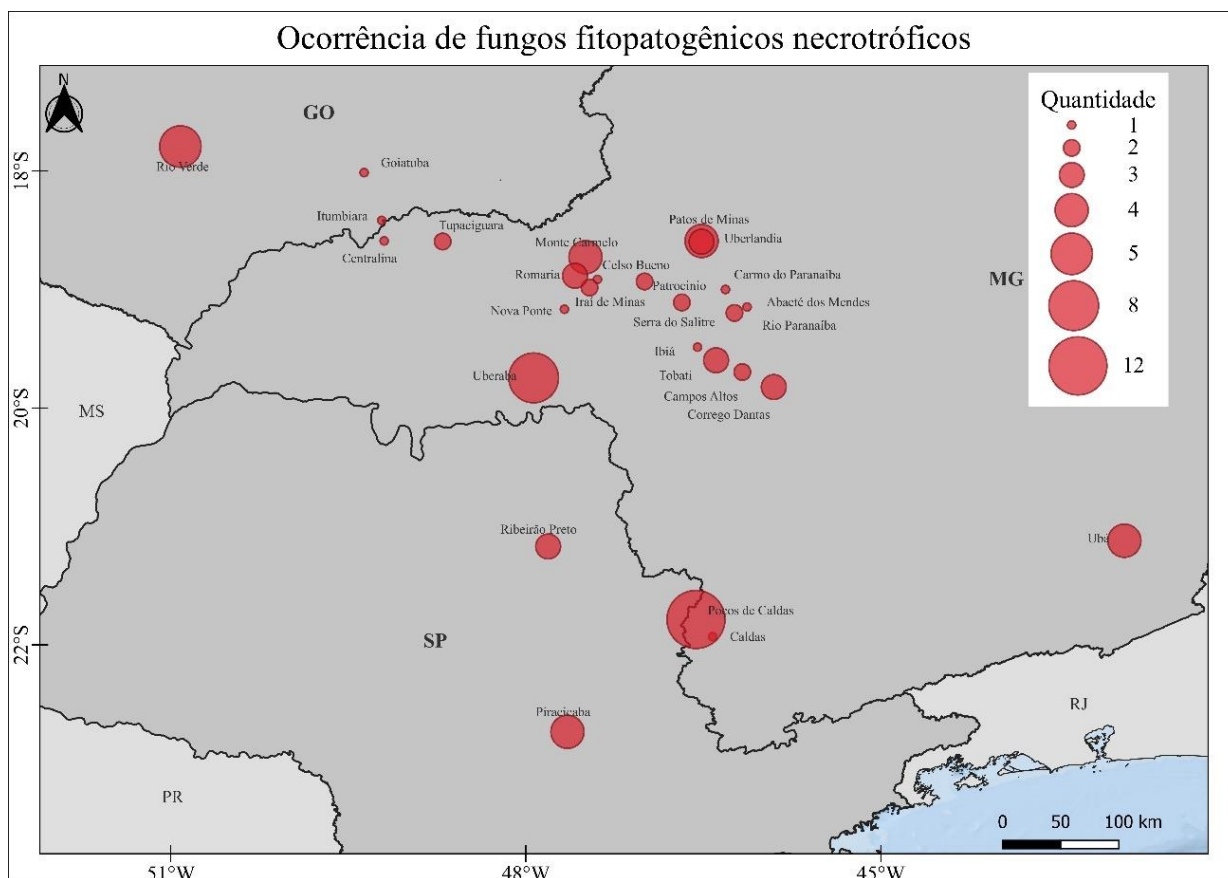


Figura 7. Mapa de ocorrência de quantidade de isolados fúngicos por município. O mapa é do tipo de símbolo pontuais proporcionais; dessa forma, quanto maior o número de isolados fúngicos por municípios, maior é a representação na figura por meio do símbolo de círculo.

Observa-se que as maiores concentrações de isolados fúngicos estão localizados na porção central do mapa, no estado de Minas Gerais, pois o maior número de coletas ocorreu em municípios desse estado. O município com a maior diversidade e maior quantidade de isolados fúngicos foi Poços de Caldas, totalizando 12 isolados, com 6 gêneros diferentes e alguns não identificados. Em seguida, a cidade de Uberaba – MG, com 8 isolados fúngicos de 4 gêneros diferentes, acompanhada pelas cidades de Piracicaba – SP e Rio Verde - GO em que foram possíveis isolar das amostras vegetais 5 colônias fúngicas.

4. Discussão

O presente trabalho trata-se de um projeto inédito, pioneiro na busca por fungos com potencial para o controle biológico do capim-amargoso, justificando-se, assim, a necessidade de levantar a micobiota de fungos necrotróficos associados à *D. insularis*.

As quatro viagens de coletas realizadas nos anos de 2019 a 2021 abrangeram uma ampla área geográfica, incluindo 27 municípios distribuídos em três Estados do Brasil (Minas Gerais,

São Paulo e Goiás). Isso garante uma representatividade geográfica significativa para o estudo, que apresenta uma diversidade fúngica considerável de 127 locais de coleta de fungos associados às lesões em *D. insularis* que foram expressos nos mapas.

A distribuição dos isolados por estado (131 em Minas Gerais, 36 em São Paulo e 29 em Goiás) reflete variações na composição fúngica que podem estar relacionadas a diferenças ambientais, climáticas e agrícolas entre as regiões amostradas. A análise dos pontos de ocorrência dos isolados fúngicos obtidos por cidades em cada estado fornece *insights* valiosos sobre a distribuição e diversidade dos fungos associados a *D. insularis*.

A compreensão da diversidade fúngica e dos potenciais patógenos associados ao capim-amargoso é crucial para o desenvolvimento de produtos biológicos eficazes para o manejo e controle dessa planta indesejada em ambientes agrícolas e naturais.

A identificação de 17 gêneros fúngicos entre os isolados patogênicos revela uma alta diversidade genética e taxonômica dentro da população fúngica associada ao capim-amargoso nos estados estudados. A presença de múltiplos gêneros fúngicos indica a complexidade das interações entre os fungos patogênicos e o capim-amargoso, sugerindo diferentes estratégias de patogenicidade e adaptação a ambientes variados.

Em um estudo realizado por Nechet et al., 2012, em que se realizou o levantamento de fungos associados a plantas daninhas *Urochloa decumbens* (= *Brachiaria decumbens*), *Digitaria horizontalis* (capim-colchão), *Rhynchelytrum repens* (capim favorito), *Bidens pilosa* (picão preto), *Cenchrus echinatus* (capim carrapicho), *Ipomoea grandifolia* (corda-de-viola), *Commelina benghalensis* (trapoeraba) e *Emilia sonchifolia* (falsa-serralha), pode-se observar que o gênero *Bipolaris* foi o agente mais frequente entre as espécies de plantas daninhas estudadas. Gêneros como *Curvularia* e *Alternaria* também foram observados em algumas plantas daninhas. Este estudo corrobora com a diversidade fúngicas presente na micobiota levantada neste estudo.

Mira et al., 2021, no trabalho realizado em coletas em quatro fazendas na região do município de San Vicente na Colômbia, observaram a presença de três gêneros de fungos que acometeram quatro espécies de plantas daninhas *Rumex crispus* (*Colletotrichum cigarro*, *Epicoccum draconis*, e *Didymella rumicicola*); *Digitaria horizontalis* (*Bipolaris* sp.); *Persicaria nepalensis* (*Bipolaris zeicola*, *Phialemoniopsis curvata*, e *Stemphylium beticola*) e *Thunbergia alata* (*Alternaria thunbergiae* e *Nigrospora sphaerica*). Dianese et al., 2021, realizaram coletas em 28 pontos no cerrado brasileiro nos estados de Goiás, São Paulo, Mato Grosso de Sul e Distrito Federal. O resultado foi a preservação de quase 25 mil exsiccatas

contendo em média duas espécies de fungos cada, representando cerca de 50 mil fungos diferentes, apresentando uma grande diversidade fúngica nos estados coletados.

Quanto à distribuição geográfica dos gêneros fúngicos relacionados a este trabalho, tem-se os gêneros *Fusarium* e *Didymella* como os mais frequentemente encontrados, sendo *Didymella* o único encontrado nos três estados amostrados. Isso sugere uma ampla distribuição geográfica de espécies de *Didymella* e uma possível associação forte com o capim-amargoso em diferentes regiões.

A presença de *Fusarium*, *Curvularia* e *Exserohillum* em Minas Gerais e Goiás, assim como *Epicoccum* e *Cladosporium* em Minas Gerais e São Paulo, revela padrões de distribuição específicos desses gêneros, possivelmente relacionados a condições ambientais regionais.

No levantamento realizado, observa-se que o município de Poços de Caldas destaca-se como o município com o maior número de isolados fúngicos, totalizando 12 isolados. Além disso, apresenta uma variedade de 6 gêneros diferentes, indicando uma riqueza fúngica significativa nessa região ou adaptabilidade dos fungos fitopatogênicos associados à *D. insularis* às condições ambientais do Sul de Minas. A identificação dos municípios com maior diversidade e quantidade de isolados fúngicos é crucial para direcionar futuras investigações ou novas coletas de fungos associados à planta alvo. Compreender a composição e a distribuição dos fungos em diferentes regiões permite realizar futuras inferências sobre determinados fungos que se destacarem como potenciais agentes de controle para *D. insularis*, bem como sobre aspectos da sua biologia ou condições favoráveis para sua infectividade.

Esses pontos destacam a relevância dos resultados obtidos na análise da distribuição e diversidade dos isolados fúngicos por município e estado, fornecendo uma base sólida para estudos futuros e ações direcionadas no manejo biológico de *D. insularis*.

Em trabalhos anteriores vinculados a este projeto, foi possível identificar dois novos relatos de fungos: *Bipolaris yamade* (Alves et al, 2023) e *Microdochium maculosum* (Souza et al, 2022), provocando lesões em partes aéreas de capim-amargoso. Estão em andamento estudos morfológicos e filogenéticos para futuras publicações de novos relatos de fungos fitopatogênicos associados ao capim-amargoso como os gêneros: *Cladosporium*, *Dydymella* e *Fusarium*, espécies nunca antes relatadas em *D. insularis*.

5. Conclusões

O estudo sobre a diversidade de fungos fitopatogênicos associados ao capim-amargoso (*Digitaria insularis*) revelou informações significativas sobre a distribuição e identificação de

diferentes gêneros fúngicos em três estados brasileiros: Minas Gerais, São Paulo e Goiás. Com coletas realizadas em 127 pontos distribuídos por 27 municípios, sendo a maioria em Minas Gerais, o levantamento mostrou uma predominância de isolados neste estado devido à maior concentração de amostras coletadas.

Após o isolamento e análise das amostras, 204 isolados fúngicos foram obtidos, dos quais 79 demonstraram patogenicidade ao capim-amargoso. Esses isolados foram submetidos a análises de DNA e sequenciamento, resultando na identificação de 67 isolados pertencentes a 17 gêneros e 10 famílias. A análise filogenética, utilizando a região ITS e o gene TEF-1 α , foi crucial para a correta identificação dos gêneros e espécies, especialmente para os isolados do gênero *Fusarium*, que foram identificados como *Fusarium tjaetaba*, *Fusarium annulatum* e *Fusarium madaense*.

Os gêneros mais frequentemente encontrados foram *Didymella* e *Fusarium*, com *Didymella* sendo o único presente em todos os estados estudados. A distribuição geográfica dos isolados mostrou uma maior ocorrência na região central de Minas Gerais, especificamente nas mesorregiões do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, refletindo a maior intensidade de coletas nessa área.

Os mapas gerados evidenciaram a concentração dos isolados por município e a diversidade fúngica presente, destacando Poços de Caldas como o município com a maior diversidade e quantidade de isolados. Este estudo contribui para o entendimento da diversidade de fungos fitopatogênicos associados ao capim-amargoso, fornecendo uma base para futuras pesquisas relacionadas ao controle biológico de *D. Insularis*.

6. Referências

- ALVES, J. F., FABBRIS, C., INOKUTI, E. M., DA NOBREGA, T. F., BARRETO, R. W., e VIEIRA, B. S. *Bipolaris yamadae* causes foliage blight of *Digitaria insularis* in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*, (2023) 18(1), 21.
- BOYETCHKO, S.M.; ROSSKOPF, E.N.; CAESAR, A.J.; CHARUDATTAN, R.. Biological weed control with pathogens: search for candidates to applications. *Agriculture And Food Production*, [S.L.], p. 239-274, 2002. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s1874-5334\(02\)80013-2](http://dx.doi.org/10.1016/s1874-5334(02)80013-2).
- CARVALHO, Leonardo Bianco de. PLANTAS DANINHAS. Lages: [S. N.], 2013. 79 p.
- CHANDRAMOHAN, S.; CHARUDATTAN, R. A Multiple-Pathogen System for Bioherbicidal Control of Several Weeds. *Biocontrol Science And Technology*, [S.L.], v. 13, n.

2, p. 199-205, abr. 2003. Informa UK Limited.
<http://dx.doi.org/10.1080/0958315021000073466>.

CIMMINO, Alessio; MASI, Marco; EVIDENTE, Marco; SUPERCHI, Stefano; EVIDENTE, Antonio. Fungal phytotoxins with potential herbicidal activity: chemical and biological characterization. *Natural Product Reports*, [S.L.], v. 32, n. 12, p. 1629-1653, ago. 2015. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c5np00081e>.

DIANESE, José Carmine; INÁCIO, Carlos Antônio; CARVALHO-JUNIOR, Anibal Alves de; SANTOS, Maria do Desterro Mendes dos; CANTILLO-PÉREZ, Taimy; PINHO, Danilo Batista. Exploring the overlooked diversity of plant-associated Cerrado Microfungi. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, [S.L.], v. 28, p. 69-101, 30 jan. 2021. Sociedade Brasileira De Fitopatologia. <http://dx.doi.org/10.31976/0104-038321v280004>.

DIAS, A.C.R.; CARVALHO, S.J.P.; MARCOLINI, L.W.; MELO, M.s.C.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Competitiveness of alexandergrass or Bengal dayflower with soybean. *Planta Daninha*, [S.L.], v. 28, n. 3, p. 515-522, 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-83582010000300008>.

DRUMMOND, C. S. Diversification of *Lupinus* (Leguminosae) in the western New World: derived evolution of perennial life history and colonization of montane habitats. ***Molecular phylogenetics and evolution***, v. 48, n. 2, p. 408-421, 2008.

FENICAL, William. New pharmaceuticals from marine organisms. *Trends In Biotechnology*, [S.L.], v. 15, n. 9, p. 339-341, set. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0167-7799\(97\)01081-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0167-7799(97)01081-0).

FELSENSTEIN, J. Phylogenies and the comparative method. ***The American Naturalist***, v. 125, n. 1, p. 1-15, 1985.

GEMELLI, Alexandre; OLIVEIRA JUNIOR, Rubem Silvério de; CONSTANTIN, Jamil; BRAZ, Guilherme Braga Pereira; JUMES, Talita Mayara de Campos; OLIVEIRA NETO, Antonio Mendes de; DAN, Hugo de Almeida; BIFFE, Denis Fernando. Aspectos da biologia de *Digitaria insularis* resistente ao glyphosate e implicações para o seu controle. *Revista Brasileira de Herbicidas*, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 231-240, 10 ago. 2012. Revista Brasileira de Herbicidas. <http://dx.doi.org/10.7824/rbh.v11i2.186>.

GERWICK, W. H. ,JONES, A. C., MONROE, E. A., EISMAN, E. B., GERWICK, L., SHERMAN, D. H. The unique mechanistic transformations involved in the biosynthesis of modular natural products from marine cyanobacteria. *Natural product reports*, (2010). 27(7), 1048-1065.

HEAP, I. International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Disponível em: <https://www.weedscience.org/>. Acesso em: 01 abr. 2019.

KATOH, K., STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, (2013). 30(4), 772-780.

KUMAR, Parveen; Clark, Michael L. Kumar and Clark's clinical medicine E-Book. Elsevier health sciences, 2012.

KUMAR, Vikas; AGGARWAL, Neeraj K.; MALIK, Anjali. Bioherbicidal Concept: a novel strategy to control weeds. Microbial Bioprospecting For Sustainable Development, [S.L.], p. 29-40, 2018. Springer Singapore. http://dx.doi.org/10.1007/978-981-13-0053-0_2.

MACHADO, A.F.L; FERREIRA, L.R; FERREIRA, F.A; FIALHO, C.M.T; TUFFI SANTOS, L.D; MACHADO, M.S. Análise de crescimento de *Digitaria insularis*. Planta Daninha, Viçosa-MG, v. 24, n. 4, p. 641-647, 2006

MENDONÇA, Giovana Soares de; MARTINS, Cibele Chalita; MARTINS, Dagoberto; COSTA, Neumárcio Vilanova da. Ecophysiology of seed germination in *Digitaria insularis* ((L.) Fedde)1. Revista Ciência Agronômica, Fortaleza, v. 45, n. 4, p. 824-832, out. 2014.

MERCADO S. A. Hifomicetes Demaciaceos de Sierra del Rosario, Cuba. Editorial Academica, Havana. 1984 181.article

MILLER, M.A.; PFEIFFER, W; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE): New Orleans. (2010)

MIRA, Y. Phytopathogenic fungi with potential as biocontrol agents for weeds of importance in crops of Antioquia, Colombia. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 31, p. 1-14, 2021.

NECHET, K. D. L., e HALFELD-VIEIRA, B. D. A. Fungos associados a plantas invasoras na cultura do café em experimento tipo FACE (Free Air CO2 Enrichment). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2., 2012, Belém, PA. Anais... Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos, 2012.

O'DONNELL, G. Poliarquias e a (in) efetividade da lei na América Latina. **Novos Estudos CEBRAP**, v. 51, p. 37-61, 1998.

OLIVEIRA, Maurílio Fernandes de; BRIGHENTI, Alexandre Magno. Controle de plantas daninhas: métodos físico, mecânico, cultural, biológico e alelopatia. Brasília, Df: Embrapa, 2018. 194 p.

PITELLI, R. A., NACHTIGAL, G. F., & PITELLI, R. L. C. M. Controle biológico de plantas daninhas In: Congresso Latinoamericano de Malezas, 1997, Manzanillo. 2003. p. 518-524.

PYON, Jong Yeong; WHITNEY, A.s.; NISHIMOTO, R.K.. Biology of Sourgrass and Its Competition with Buffelgrass and Guineagrass. Weed Science, [S.L.], v. 25, n. 2, p. 171-174, mar. 1977. Cambridge University Press (CUP).
<http://dx.doi.org/10.1017/s0043174500033191>.

RAMBAUT A, DRUMMOND A. FigTree: tree figure drawing tool, Shirling, eE. Bb.; Gottlieb, D. International Journal of Systematic bacteriology. Microbiology society, London, (2008). v. 16, n. 3, p. 313-340, 1966.

RAMBAUT, A. The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus. **Nature**, v. 453, n. 7195, p. 615-619, 2008.

SOUZA, A. P. Fungos fitopatogênicos associados a capim-amargoso (*Digitaria insularis*) em localidades da Zona da Mata e Triângulo Mineiro. 2022.

STADEN, R. The Staden sequence analysis package. **Molecular biotechnology**, v. 5, p. 233-241, 1996.

CAPÍTULO 2 – SELEÇÃO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE *Digitaria insularis*

Resumo

As plantas daninhas têm impactos negativos em ecossistemas terrestres e aquáticos, podendo desequilibrar ecossistemas naturais e transformados pela atividade humana. A invasão biológica por plantas, animais e microrganismos tem alterado significativamente a composição, estrutura e processos dos ecossistemas afetados, representando uma ameaça reconhecida à biodiversidade global. Atualmente, entre as plantas daninhas resistentes a herbicidas, o capim-amargoso (*Digitaria insularis*) destaca-se no Brasil devido à sua resistência à herbicidas químicos e facilidade de dispersão. O uso de bioherbicidas, derivados de organismos biologicamente ativos, seus metabólitos secundários ou enzimas, pode ser uma alternativa segura e sustentável aos herbicidas sintéticos. No entanto, há uma escassez comercial de bioherbicidas atualmente e são necessários estudos adicionais para desenvolver produtos eficazes. Este trabalho teve como objetivo selecionar fungos fitopatogênicos para o controle biológico do capim-amargoso. Foram realizados ensaios para avaliar o efeito dos fungos na germinação e desenvolvimento das plântulas de capim-amargoso em pré-emergência e sobre plantas recém-emergidas (pós-emergência). Os isolados KDI 0103, KDI 0145, KDI 0104, KDI 0164, KDI 0147 se destacaram quanto à inibição da germinação de sementes quanto no controle do desenvolvimento de parte aérea e radícula de plantas de capim amargoso (*in vitro*). *In vivo*, os isolados KDI 0204, KDI 0203, KDI 0042 se mostraram promissores como agentes de biocontrole para o capim amargoso, tanto em pré quanto em pós-emergência.

1. Introdução

Uma das principais preocupações do setor agrícola é manter a produtividade para suprir as demandas de uma população em constante crescimento. A utilização extensiva de herbicidas tem sido uma estratégia para garantir a segurança das culturas e evitar a rápida proliferação de plantas daninhas nos ambientes agrícolas, uma prática que remonta ao final da década de 60. As plantas daninhas são conhecidas por suas características agressivas, competindo por nutrientes com outras culturas (Junior et al., 2020).

As plantas daninhas provocam impactos negativos em ecossistemas terrestres e aquáticos, tanto em ambientes naturais quanto em áreas transformadas pela atividade humana. Em ambientes naturais, plantas introduzidas podem perturbar o equilíbrio dos ecossistemas. Invasões biológicas por plantas, animais e microrganismos têm causado mudanças significativas na composição, estrutura e processos dos ecossistemas afetados, representando uma ameaça à biodiversidade global reconhecida por cientistas e governos ((IUCN, 2000; Mack et al., 2000).

No contexto agrícola, as plantas daninhas competem diretamente com as culturas, reduzindo sua produtividade, interferindo na colheita e servindo como hospedeiras para pragas e patógenos (Dias et al, 2010).

Os prejuízos econômicos causados pelas plantas daninhas são difíceis de quantificar, mas estudos estimam perdas significativas na produção agrícola global. O aumento no uso de herbicidas químicos ao longo do tempo também tem impactos ambientais graves, como a redução da biodiversidade e contaminação de lençóis freáticos. A resistência crescente de espécies de plantas daninhas a herbicidas químicos tradicionais também representa um desafio, incentivando a busca por alternativas mais sustentáveis, como o controle biológico.

O uso contínuo de herbicidas químicos levou ao estabelecimento de resistência em algumas populações de plantas daninhas, resultando em menor rendimento e custos elevados para manter a produção de alimentos ((Reichert Júnior et al., 2019; Perotti et al., 2020; Verma et al., 2020).

Nos dias atuais, dentre as espécies de plantas daninhas resistentes a herbicidas, destaca-se a *D. insularis*, uma planta daninha conhecida como capim-amargoso, pois apresenta biótipos resistentes a herbicidas, propagando-se por rizomas e também por sementes que são facilmente dispersas pelo vento. O capim-amargoso é uma gramínea de ciclo perene, de metabolismo tipo C4, e vem sendo um problema em áreas agricultáveis no Brasil (Kissmann e Groth, 1997).

Uma alternativa segura para garantir a disponibilidade de alimentos saudáveis e sustentáveis pode ser o uso de bioherbicidas, reduzindo a dependência de herbicidas sintéticos. Os bioherbicidas são produtos derivados de organismos biologicamente ativos, seus metabólitos secundários ou enzimas por eles produzidos. Utilizar produtos naturais para o controle de plantas daninhas oferece vantagens como especificidade de ação, degradação rápida e menor risco de contaminação ambiental. Embora muitos produtos naturais possam ser usados com atividade bioherbicida, há uma escassez comercial desses produtos no mercado mundial (Cordeau et al., 2016; Radhakrishnan; Alqarawi; Abd Allah, 2018).

No Brasil, até o momento, não há registro de nenhum bioherbicida. Entretanto, nos Estados Unidos, foi desenvolvido um bioherbicida líquido à base de esporos de *Phytophthora palmivora*, com o objetivo de controlar a *Morrenia odorata* em citros (Boyetchko et al., 2002). O processo para a comercialização de tal produto demanda uma série de estudos e pesquisas sobre os microrganismos a serem empregados no biocontrole, incluindo a produção de esporos infectivos, a produção em larga escala, a especificidade de ação, bem como sua persistência no ambiente, dentre outros aspectos.

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo selecionar potenciais fungos fitopatogênicos para o controle biológico de *D. insularis*.

2. Material e métodos

2.1. Obtenção de isolados

Os bioensaios foram realizados na Universidade Federal de Uberlândia (UFU) – *Campus* Monte Carmelo, no estado de Minas Gerais, Brasil, utilizando a estrutura do Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia (LAMIF) e da casa de vegetação, de fevereiro de 2022 a setembro de 2023. Foram utilizados 32 isolados fúngicos que estão depositados na coleção de cultura do LAMIF (Tabela 1). Os isolados foram previamente selecionados de acordo com o capítulo 1 deste trabalho (dados não publicados). Os isolados foram recuperados da preservação em glicerol a 10% que estavam armazenados no ultrafreezer a – 80 °C. Os isolados preservados foram repicados e mantidos em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA e foram incubados em BOD a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. As sementes de *D. insularis* foram obtidas da empresa Cosmo Agrícola Produção e Serviços Rurais LTDA.

Tabela 1. Identificação dos isolados utilizados neste estudo.

Isolados	Gêneros
KDI07	<i>Didymella</i>
KDI08	<i>Didymella</i>
KDI014	<i>Bipolaris</i>
KDI017	<i>Didymella</i>
KDI029	<i>Bipolaris</i>
KDI036	<i>Didymella</i>
KDI042	<i>Didymella</i>
KDI056	<i>Didymella</i>
KDI058	<i>Fusarium</i>
KDI098	<i>Exserohilum</i>
KDI099	<i>Didymella</i>
KDI0102	<i>Didymella</i>
KDI0103	<i>Fusarium</i>
KDI0104	<i>Fusarium</i>
KDI0105	<i>Fusarium</i>
KDI0106	<i>Exserohilum</i>
KDI0108	<i>Didymella</i>
KDI0113	<i>Nigrospora</i>
KDI0115	<i>Pseudopithomyces</i>
KDI0118	<i>Cladosporium</i>

KDI0124	<i>Bipolaris</i>
KDI0125	<i>Bipolaris</i>
KSI0126	<i>Neokalmusia</i>
KDI0129	<i>Epicoccum</i>
KDI0130	<i>Emericellopsis</i>
KDI0135	<i>Fusarium</i>
KDI0136	<i>Fusarium</i>
KDI0141	<i>Fusarium</i>
KSI0145	<i>Fusarium</i>
KDI0164	<i>Fusarium</i>
KDI0203	<i>Bipolaris</i>
KDI0204	<i>Bipolaris</i>

2.2. Efeito da microbiolização de sementes de *D. insularis* com suspensão de propágulos de fungos necrotróficos *in vitro*

Sementes de *D. insularis* previamente desinfestadas por três minutos em solução de hipoclorito de sódio a 1% e secas em papel filtro esterilizado por 20 min foram microbiolizadas com suspensões de conídios de cada isolado (20 mL), separadamente, na concentração 1×10^6 conídios/mL ou com fragmentos de micélio, permanecendo sob agitação em shaker por 30 min a 150 rpm. Posteriormente, 10 sementes de *D. insularis* foram dispostas em cada placa de Petri de 90 mm de diâmetro contendo Ágar – Água (AA) e incubadas em BOD por 15 dias sob fotoperíodo de 12h a 25 °C. As testemunhas foram tratadas apenas com água destilada esterilizada e Tween 80 (0,05%).

Após 15 dias, o número de sementes germinadas foi contabilizado, bem como a altura da parte aérea e o comprimento das raízes das plântulas foram mensurados com auxílio de paquímetro digital. O experimento foi conduzido em DIC com 5 repetições (placas com 10 sementes) para cada tratamento. Foram realizados dois experimentos e a análise estatística foi gerada através da média dos dois experimentos e comparadas pelo Teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5 %.

2.3. Potencial de fungos necrotróficos para o controle de *D. insularis* em pré-emergência *in vivo*

Cinquenta sementes de *D. insularis* foram semeadas superficialmente em vasos de 100 mL contendo solo autoclavado, areia e esterco na proporção de 2:1:1. As suspensões de conídios

na concentração 1×10^6 conídios/mL ou suspensões de fragmentos miceliais de cada tratamento, separadamente, foram pulverizadas no solo com auxílio de micro-pulverizadores manuais logo após o semeio. As testemunhas foram pulverizadas apenas com água destilada esterilizada e o adjuvante codificado BH3 da empresa Koppert do Brasil. Os vasos foram acondicionados em câmara úmida por 48 horas e a superfície do solo foi levemente irrigada com água diariamente para evitar o ressecamento, até que as sementes germinassem. Foram realizadas avaliações aos 21 dias após a inoculação e foi avaliado o número de plântulas que emergiram.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 5 repetições (copo com 50 sementes) para cada isolado fúngico. Foram realizados dois experimentos e a análise estatística foi gerada através da média dos dois experimentos e comparadas pelo Teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5 %.

2.4. Avaliação do potencial de fungos necrotróficos para controle biológico de *D. insularis* em pós-emergência

Vinte sementes por vaso de *D. insularis* foram semeadas superficialmente em vasos plásticos de 300 mL contendo solo + areia + esterco na proporção de 2:1:1 esterilizados. Após a germinação, foi realizado um desbaste mantendo 10 plantas por vaso.

Quando as plantas de *D. insularis* atingiram o estágio de 2 pares de folhas, elas foram pulverizadas com suspensões de conídios na concentração 1×10^6 conídios/mL ou suspensões de fragmentos de micélio de acordo com o item anterior e mantidas em câmara úmida, utilizando-se sacos plásticos transparentes umedecidos internamente, por 48 horas. Foi adicionado o adjuvante BH-03 na dose 0.1% v/v (100 mL em 100 litros de água) nas suspensões. Após esse período, foram transferidas e mantidas em condições de casa-de-vegetação até a avaliação final de severidade, aos 14 dias após as inoculações. Foram realizados 2 experimentos e para avaliação da severidade foi utilizada a escala de notas (Lustosa, 2000) em que: 0 = ausência de sintomas, 1 = sintomas escassos e manchas foliares pouco severas, 2 = sintomas comuns e manchas foliares moderadamente severas, 3 = sintomas generalizados e manchas foliares severas, 4 = plantas mortas. Plantas pulverizadas com água + adjuvante (Código BH3 da Koppert) na dose de 1 mL/L, foram utilizadas como controle. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições (vaso com 10 plantas) para cada tratamento (isolado). Com os dados da avaliação foi calculado a porcentagem de severidade (SEV) causada pelos isolados fúngicos necrotróficos pela expressão: $SEV = [\Sigma(\text{grau}$

da nota X frequência)/ (número total de unidades X grau máximo da nota)] X 100 (adaptado de MCKINNEY, 1923). Utilizou-se o Teste estatístico Scott-Knott ao nível de significância de 5% a partir das médias obtidas dos 2 experimentos.

3. Resultados

3.1. Avaliação do potencial de fungos necrotróficos para o controle biológico de *D. insularis* *in vitro*.

Os isolados agruparam-se em cinco grupos (a-e) (Figura 1). Os isolados que mais destacaram-se foram o KDI 0103, KDI 0145, KDI 0104, KDI 0164, KDI 147 (em ordem do mais agressivo para o menos agressivo), sendo os 4 primeiro do gênero *Fusarium* e o último do gênero *Microdochium*. Esses isolados inibiram em 100%, 99,5% 99%, 98%, 97% a germinação das sementes de capim-amargoso, respectivamente. Por outro lado, os isolados KDI 007, KDI 0099, KDI 0129, KDI 0108, KDI 0141, KDI 0036, KDI 0115, KDI 0136, KDI 0102, KDI 0118, KDI 0029 apresentaram piores desempenhos quanto à inibição da germinação de sementes de *D. insularis*, sendo pertencentes aos gêneros *Didymella*, *Didymella*, *Edenia*, *Didymella*, isolado não identificado, *Didymella*, *Fusarium*, isolado não identificado, *Cladosporium* e *Bipolaris*.

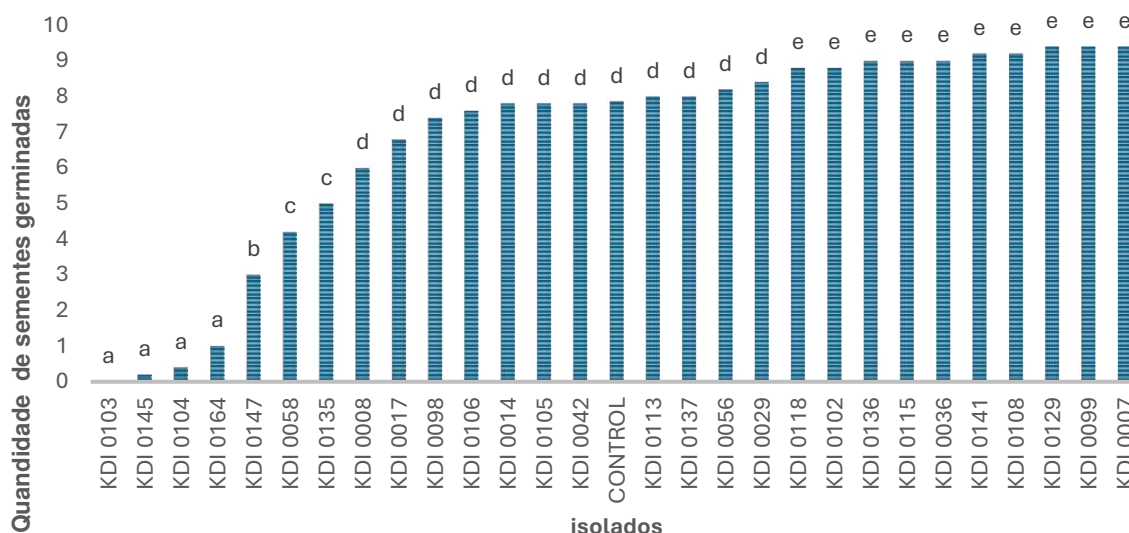


Figura 1. Inibição da germinação de sementes de *Digitaria insularis* após a microbiolização com suspensão contendo propágulos de fungos fitopatogênicos. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott Knott ao nível de significância de 5%.

Quanto à inibição do desenvolvimento da parte aérea das plântulas de capim-amargoso, os isolados testados formam agrupados em 6 grupos (a – f) (Figura 2), sendo que 6 isolados (KDI 0103, KDI 0145, KDI 0104, KDI 0164, KDI 0147, KDI 0014) pertencentes aos gêneros *Fusarium*, *Microdochium* e *Bipolaris* destacaram-se, apresentando as melhores porcentagem de inibição do desenvolvimento de parte aérea das plântulas, com índices de inibição exibidos aqui do mais agressivo para o menos agressivo (100%, 98%, 96%, 94 %, 90,5% e 90%), respectivamente. Seis isolados, a saber KDI 0098, KDI 0058, KDI 0008, KDI 0017, KDI 0137 e KDI 0126, também apresentaram resultados positivos em relação a inibição do desenvolvimento de parte aérea (82% - 65%) e cindo isolados (KDI 0135, KDI 0141, KDI 0029, KDI 0018, KDI 0129) inibiram entre 50% e 60%. Dessa forma, podemos ressaltar que 17 isolados destacaram-se quanto à inibição do desenvolvimento de parte aérea de plântulas de capim-amargoso.

Os demais isolados não diferiam da testemunha e apresentaram menos de 50% de inibição da parte aérea. Os isolados que menos destacaram-se foram KDI 0115, KDI 0102 e KDI 0136 (0% - 6% de inibição), pertencentes ao gênero *Fusarium*.

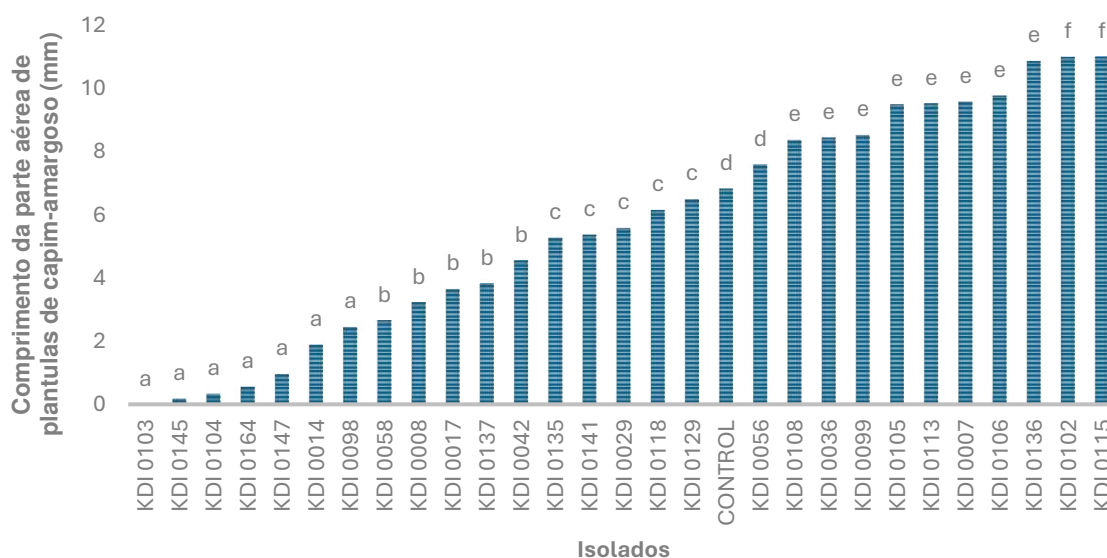


Figura 2. Inibição do desenvolvimento da parte aérea de plântulas de capim-amargoso a partir de sementes previamente microbiolizadas com propágulos de fungos fitopatogênicos. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott Knott ao nível de significância de 5%.

Quanto à inibição do desenvolvimento da radícula (Figura 3), foram definidos 6 grupos. Os isolados que mais destacaram-se quanto à inibição da radícula foram KDI 0103, KDI 0145, KDI 0104, KDI 0147 e KDI 0135, sendo todos pertencentes ao gênero *Fusarium* (100%, 99%, 99%, 98%, 97%) Os isolados que menos destacaram-se foram KDI 0141, KDI 0019 e KDI 0136, pertencentes aos gêneros isolado não identificado, *Bipolaris* e isolado não identificado.

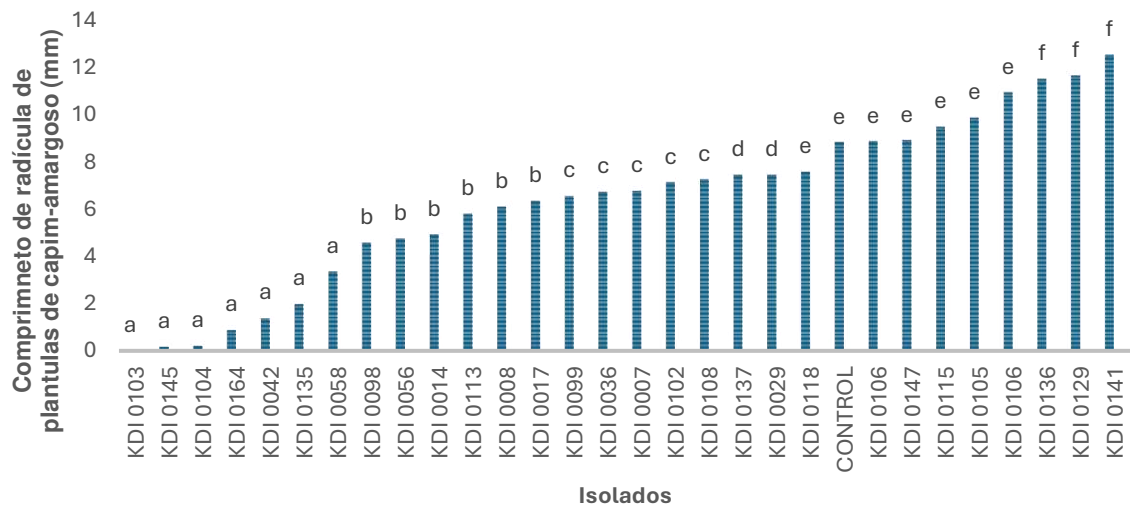


Figura 3. Inibição no desenvolvimento de radícula em plântulas de capim-amargoso a partir de sementes previamente microbiolizadas com propágulos de fungos fitopatogênicos. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott Knott ao nível de significância de 5%.

3.2. Avaliação do potencial de fungos necrotróficos para controle biológico de *D.insularis* em pré-emergência *in vivo*

Foram avaliados 32 isolados fúngicos escolhidos anteriormente em estudos prévios (Capítulo 1), sendo escolhidos os isolados mais agressivos baseados em observações visuais após as inoculações com discos de micélio dos isolados fúngicos.

Os isolados fúngicos foram agrupados em 6 grupos (Figura 4) e assim foram classificados de acordo como resultado na inibição da germinação de sementes de capim-amargoso. Dando destaque a 5 isolados que inibiram a germinação de mais de 50% das sementes (KDI 0204, KDI 0203, KDI 0124, KDI 0105 e KDI 0042), sendo pertencentes aos gêneros *Bipolaris*, *Fusarium* e *Didymella*. Por outro lado, pode-se citar três isolados que obtiveram os piores desempenhos no experimento, sendo eles, KDI 0007, KDI 0008 e KDI 0014, que, respectivamente, inibiram a germinação de 3,3 e 5 (1%, 1% e 3%) sementes de capim-amargoso e que pertencem ao gênero *Bipolaris* e *Didymella*.

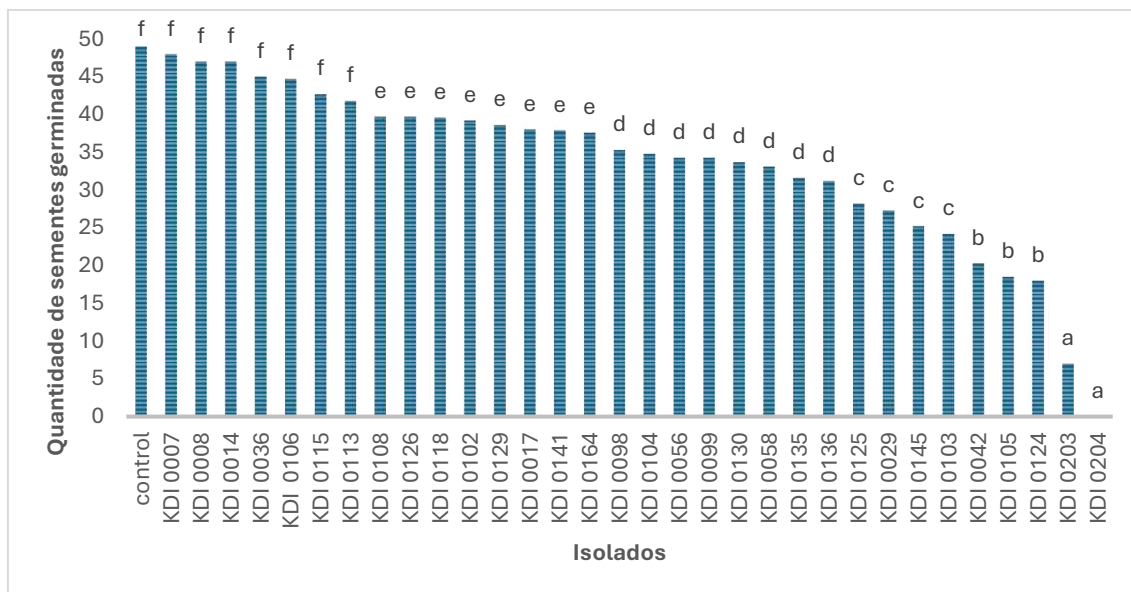


Figura 4. Germinação de sementes de capim-amargoso após serem previamente submetidas à pulverização de suspensões de propágulos fúngicos. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott Knott ao nível de significância de 5%.

3.3. Avaliação do potencial de fungos necrotróficos para controle biológico de *D.insularis* em pós-emergência

Seis isolados fúngicos, a saber: KDI 0204, KDI 0007, KDI 0203, KDI 0042, KDI 0124, KDI 0008 (*Bipolaris*, *Didymella*, *Bipolaris*, *Didymella*, *Bipolaris* e *Didymella*, respectivamente) resultaram nos maiores graus de severidade, com notas variando entre 3 e 4, sendo verificadas a ocorrência de muitas plantas mortas de capim-amargoso. Outros 22 isolados também se diferenciaram estatisticamente da testemunha, podendo esses serem apresentados como isolados intermediários no controle de capim-amargoso em pós-emergência (KDI 0099, KDI 0017, KDI 0125, KDI 0098, KDI 0145, KDI 0108, KDI 0036, KDI 0106, KDI 0118, KDI 0115, KDI 0014, KDI 0147, KDI 0102, KDI 0029, KDI 0129, KDI 0113, KDI 0164, KDI 0058, KDI 0056, KDI 0104, KDI 0103, KDI 0105). A porcentagem de severidade variou de 50,5% a 82% nas plântulas de capim-amargoso.

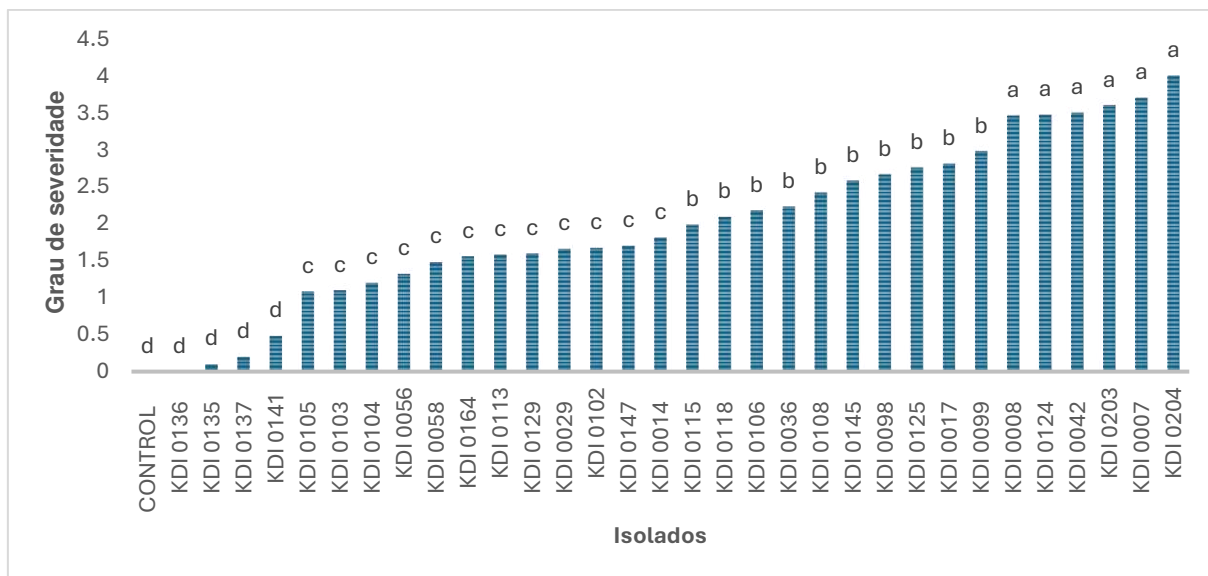


Figura 5. Severidade em plântulas de capim-amargoso após serem submetidas à pulverização de com suspensões de propágulos fúngicos. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott Knott ao nível de significância de 5%.

4. Discussão

Pesquisas relacionadas ao controle biológico de plantas daninhas com fitopatógenos têm apresentado um grande crescimento nas últimas décadas (Chaves Neto et al., 2020, Hasan et al., 2021, Souza et al., 2017; Mira et al., 2021). Para a produção de um bioherbicida para o controle biológico de plantas daninhas, são necessárias diversas etapas, desde a seleção de um isolado promissor até a formulação do produto final (Vieira; Barreto; De Nechet, 2018). No presente trabalho, foi observado que, no ensaio de microbiolização de sementes de capim-amargoso, os isolados do gênero *Fusarium* (KDI0103, KDI0104, KDI0145 e KDI0164) reduziram a germinação de sementes *in vitro* em 87,5% em relação ao controle. Essa técnica é aplicada principalmente para promover o controle de doenças e/ou o crescimento de plantas (Melo, 1996), entretanto, foi utilizada para verificar o potencial dos isolados em reduzir a germinação das sementes de *D. insularis*. Os quatro isolados pertencentes ao gênero *Fusarium* também causaram o menor desenvolvimento da parte radicular e aérea, pois são um dos principais agentes causadores de *damping off*, que causam podridões nas sementes, reduzem a taxa de germinação e possuem a característica de serem patógenos agressivos, por produzirem enzimas que podem matar a planta rapidamente (Bedendo, 2018), sendo possivelmente o mecanismo de ação utilizado para reduzir a germinação das sementes *in vitro*. Há algumas espécies de *Fusarium*, como *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. camptoceras*, *F. chlamydosporum* e

F. oxysporum f. sp. *orobanche* relatadas em estudos de controle biológico de plantas daninhas (Boari; Vurro, 2004; Saremi; Okhovvat, 2008).

Entretanto, em estudos *in vivo*, foi observado um resultado diferente, pois somente os isolados KDI0124, KDI0203 e KDI0204, pertencentes ao gênero *Bipolaris* e o isolado KDI042 pertencente ao gênero *Didymella* destacaram-se dentre os isolados testados em pré e pós-emergência. Zhang et al. (2022) demonstraram que *Bipolaris eleusines* juntamente com um herbicida potencializaram o efeito bioherbicida no controle da planta daninha *Echinochloa crus-galli* (capim-arroz) que causa grande prejuízo na produção e qualidade do arroz. Em levantamento de fungos associados a plantas daninhas na cultura do café no Brasil, foi observado a associação do fungo *Bipolaris* sp. em *Digitaria horizontalis* e de *Bipolaris* sp. em outras plantas daninhas (De Lima; De Almeida; Vieira, 2012). Além disso, *Bipolaris euphorbiae* foi avaliado como potencial mico-herbicida para o controle do leiteiro (*Euphorbia heterophylla*), e foi possível observar que, em concentrações de esporos superiores a 1×10^7 esporos/mL, houve mortalidade de 80% das plantas de leiteiro (De Nechet; Barreto; Mizubuti, 2006), sendo um fungo promissor no controle desta planta daninha. Nos testes de pós-emergência com o capim-amargoso, os isolados KDI0124, KDI0203 e KDI0204 apresentaram plantas com sintomas generalizados e manchas foliares severas a plantas mortas, indicando possíveis isolados promissores para testes futuros.

O isolado KDI042 do gênero *Didymella* também se mostrou promissor, pois inibiu mais de 50% da germinação de sementes de capim-amargoso e foi muito agressivo em pós-emergência. A redução do banco de sementes na área e a diminuição e morte das plântulas de capim-amargoso podem influenciar diretamente sobre as plantas cultivadas, principalmente pela redução da competição pelos nutrientes, luz e água, como também, no aumento da qualidade do produto de interesse colhido, pois não haverá misturas das sementes da cultura desejada com a da planta daninha (De Oliveira; Brighenti, 2011). Também foram realizados diversos estudos iniciais na Colômbia a fim de avaliar o potencial de fungos fitopatogênicos em plantas daninhas e, dentre as quatro plantas daninhas que causam sérios problemas, foram observadas duas interações planta $\times$ fitopatógenos, sendo *Bipolaris* sp. em *Digitaria horizontalis* e *Didymella ruminicola* em *Rumex crispus* (Mira; Castañeda; Patiño, 2021), como fungos promissores para o controle das plantas daninhas do estudo, corroborando com o presente trabalho o potencial dos dois gêneros como possíveis agentes de controle biológico.

No caso de *Digitaria insularis*, duas espécies de *Bipolaris* já foram relatadas em associação com esta planta: *Bipolaris sacchari* (Camino-Vilaro et al., 2019) em Cuba e *Bipolaris yamadae* (Alves et al., 2023) no Brasil. Outros fungos também foram relatados como

patogênicos ao capim-amargoso: *Alternaria longiússima*, *Cercospora digitariae*, *Drechslera sacchari*, *Fusarium oxysporum*, *Anthracoystis panici-leucophaei*, *Magnaporthe oryzae*, *Puccinia esclavensis*, *P. esclavensis* var. *panicophila*, *P. oahuensis*, *P. substriata* var. *imposita* e *Sporisorium cordobense* (Camino-Vilaro et al., 2019; Piatek; Yorou, 2019; Urtiaga, 2004; Mercado-Sierra, 1984; Deltour et al., 2018; Vanky, 2004; Yasuhara-Bell, 2018; Hennen et al., 2005; Hernandez, Hennen, 2002; Rachamar, Cummins, 1965; Vanky, 2000).

No presente estudo, além dos três gêneros de fungos que foram altamente agressivos em capim-amargoso: *Bipolaris* (KDI0124, KDI0203 e KDI0204), *Didymella* (KDI 0007, KDI 0008 e KDI 0042) e *Fusarium* (KDI 0105), outras espécies/isolados também tiveram um nível de agressividade moderado como *Pseudopithomyces* (KDI 0115), *Cladosporium* (KDI 0118), *Exserohilum* (KDI098, KDI106), *Didymella* (KDI 0017, KDI 0036, KDI 0099 e KDI 0108), *Bipolaris* (KDI 0125) e *Fusarium* (KDI 0145), confirmando a capacidade desses isolados de causarem infecção no capim-amargoso em estágios iniciais do desenvolvimento da planta, através de suspensões de esporos e micélio e que também não foram relatados previamente como causadores de doença em *D. insularis*.

Este é o primeiro estudo envolvendo diversos gêneros de fungos para um possível manejo do capim-amargoso e que mostra a perspectiva de um futuro produto para controle biológico dessa planta daninha. Entretanto, são necessários mais estudos aprofundados para validar esses isolados fúngicos como potenciais agentes de controle biológico.

No presente trabalho, pode-se considerar grupos de isolados fúngicos quanto desempenho nos testes de inibição da germinação de sementes e inibição do desenvolvimento da parte aérea das plântulas de capim-amargoso *in vitro*.

Os isolados foram agrupados em cinco grupos (a-e), indicando diferentes níveis de desempenho nos testes realizados. Os isolados KDI 0103, KDI 0145, KDI 0104, KDI 0164 e KDI 147, principalmente do gênero *Fusarium*, e KDI 0014 do gênero *Microdochium*, apresentaram as melhores médias de inibição da germinação de sementes *in vitro* e porcentagens elevadas de inibição do desenvolvimento da parte aérea das plântulas de capim-amargoso. Isso sugere uma forte atividade anti-germinativa e inibitória desses isolados. Por outro lado, isolados como KDI 0007, KDI 0099, KDI 0129, KDI 0108, KDI 0141, KDI 0036, KDI 0115, KDI 0136, KDI 0102, KDI 0118 e KDI 0029, pertencentes a diferentes gêneros como *Didymella*, *Stilbella*, *Fusarium*, *Cladosporium* e *Bipolaris*, apresentaram as piores médias de inibição. Isso pode indicar menor eficácia desses isolados nos processos avaliados. Destacam-se 17 isolados que apresentaram resultados positivos nos testes, com porcentagens variadas de inibição do desenvolvimento da parte aérea das plântulas de capim-amargoso. Isso

demonstra a diversidade de atividades anti-germinativas e inibitórias presentes nos isolados testados.

Por outro lado, isolados como KDI 0115, KDI 0102 e KDI 0136 do gênero *Fusarium* apresentaram os piores resultados, com inibições mínimas da parte aérea das plântulas, sugerindo menor potencial para controle nesses aspectos. É interessante notar que alguns gêneros, como *Fusarium* e *Microdochium*, apresentaram isolados com desempenhos significativamente diferentes, indicando a importância da diversidade genética mesmo dentro do mesmo gênero. É importante considerar que esses resultados são baseados em testes *in vitro*, e a eficácia desses isolados pode variar em condições de campo.

Recomenda-se investigar os mecanismos de ação desses isolados mais eficazes para entender melhor sua atividade anti-germinativa e inibitória, bem como explorar possíveis formulações para aplicação prática.

Os isolados KDI 0103, KDI 0145, KDI 0104, KDI 0147 e KDI 0135 do gênero *Fusarium* apresentaram os melhores resultados na inibição do desenvolvimento da radícula. Isso indica uma forte capacidade desses isolados em impedir o crescimento inicial das raízes das plântulas de capim-amargoso. Mesmo dentro do mesmo gênero, observou-se uma variação na eficácia dos isolados. Alguns isolados de *Fusarium* destacaram-se significativamente, enquanto outros não tiveram o mesmo desempenho. Isso sugere a presença de diferentes cepas ou variantes genéticas com diferentes capacidades de inibição. Os isolados KDI 0141, KDI 0019 e KDI 0136, sendo de gêneros não identificados, *Bipolaris* e não identificados, respectivamente, mostraram os resultados menos eficazes quanto à inibição do desenvolvimento da radícula. Isso indica que esses isolados podem não ser tão eficientes quanto outros na inibição do crescimento inicial das raízes. Os resultados destacam a importância da seleção criteriosa de agentes biocontroladores para o capim-amargoso. Isolados com alta eficácia na inibição do desenvolvimento da radícula, podem ser promissores para futuros estudos e aplicações práticas como bioherbicidas. Além disso, é importante realizar testes em condições mais próximas do campo para validar a eficácia desses isolados em ambientes naturais.

Quanto aos experimentos de avaliação do potencial de fungos necrotróficos para o controle de capim-amargoso em pré e pós emergência é importante considerar que os isolados foram agrupados em diferentes categorias (a-d) nos experimentos de inibição da germinação e controle pós emergente. Destaque para os 5 isolados que inibiram a germinação de mais de 50% das sementes de capim-amargoso, evidenciando sua eficácia anti-germinativa. Por outro lado, alguns isolados apresentaram desempenho inferior nesse aspecto.

Na análise pós-emergente, observou-se que alguns isolados foram mais severos no controle das plantas emergidas, com destaque para os que obtiveram as maiores porcentagens de severidade, como os isolados KDI 0204, KDI 0007, KDI 0203, KDI 0042, KDI 0124 e KDI 0008.

Outros isolados mostraram eficácia intermediária no controle pós emergente, indicando uma variedade de respostas na inibição do desenvolvimento das plantas recém-emergidas.

É interessante notar que alguns isolados apresentaram resultados consistentes em diferentes situações. Por exemplo, os isolados KDI 0103, KDI 0145, KDI 0104, KDI 0164 e KDI 0147 foram positivos tanto na inibição da germinação de sementes quanto no controle do desenvolvimento de parte aérea e radícula.

Da mesma forma, os isolados KDI 0204, KDI 0203, KDI 0042 revelaram resultados promissores tanto em pré quanto em pós-emergência, indicando um potencial consistente de controle em diferentes estádios fenológicos.

Os resultados destacam a importância da seleção de isolados fúngicos com capacidade anti-germinativa e inibitória de plântulas recém-emergidas para o manejo do capim-amargoso.

5. Conclusões

Através dos experimentos realizados tanto em pré-emergência quanto em pós-emergência com os isolados fúngicos obtidos nas coletas de fungos associados a *Digitaria insularis* e testes de patogenicidade do capítulo 1 deste trabalho, pode-se observar que alguns isolados fúngicos associados ao capim-amargoso apresentam potencial fitopatogênico para prosseguir com estudos, afim de desenvolver um bioherbicida capaz de auxiliar no manejo desta planta daninha.

Os experimentos de pós e pré-emergência revelaram isolados capazes de inibir tanto a germinação de sementes quanto provocar a morte de plantas de capim-amargoso recém-emergidas (KDI 0204, KDI 0203, KDI 0124, KDI 0042).

6. Referências

BEDENDO, I. P. DAMPING-OFF. P.323-327. IN: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, . (Eds.) Manual de Fitopatologia -Princípios e conceitos, v. 1, n.5, Agronômica Ceres: Ouro Fino-MG, p. 323-327, 2018.

- BOARI, A.; VURRO, M. Evaluation of *Fusarium* spp. and other fungi as biological control agents of broomrape (*Orobanche ramosa*). *Biological Control*, v. 30, n. 2, 2004. p.212-219.
- BOYETCHKO, S.M.; ROSSKOPF, E.N.; CAESAR, A.J.; CHARUDATTAN, R.. Biological weed control with pathogens: search for candidates to applications. *Agriculture And Food Production*, [S.L.], p. 239-274, 2002. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s1874-5334\(02\)80013-2](http://dx.doi.org/10.1016/s1874-5334(02)80013-2).
- BRIGHENTI, A. M.; OLIVEIRA, M. F. Biologia de plantas daninhas. In OLIVEIRA JR., CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. (Eds.) *Biologia e Manejo de Plantas Daninhas*. Curitiba, PR: Omnipax, p. 1-36. 2011.
- CAMARGO, A. F. Análise do potencial bioherbicida de fungos selvagens cultivados em biomassa microalgal. 2021.
- CAMINO-VILARO, M., CASTRO-HERNANDEZ, L., ABREU-HERRERA, Y., MENA-PORTALES, J., AND CANTILLO-PEREZ, T. Fungi associated with invasive plant species in Cuba. 2019 *Phytotaxa* 419: 239-267.
- CHAVES NETO, J. R.; MAZUTTI, M. A.; ZABOT, G. L.; TRES, M. V. Bioherbicidal action of *Phoma dimorpha* fermented broth on seeds and plants of *Senna obtusifolia*. *Pesqui. Agropecu. Trop.*, v. 50, e56894, 2020.
- DE LIMA K, DE ALMEIDA B, VIERA H. Fungos associados a plantas invasoras na cultura de café em experimento tipo face (Free Air CO2 Enrichment). In: Embrapa Meio Ambiente (ed) EMBRAPA (2012)
- DE NECHET, K. L.; BARRETO, R. W.; MIZUBUTI, E. S. G. *Bipolaris euphorbiae* as a biological control agente for wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*): host-specificity and variability in pathogen and host populations. *BioControl*, v. 51, p. 259-275, 2006. <https://doi.org/10.1007/s10526-005-1519-z>
- DELTOUR, P., FRANCA, S.C., HEYMAN, L., PEREIRA, O.L., and HOFTE, M. Comparative analysis of pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* populations associated with banana on a farm in Minas Gerais, Brasil. 2018. *Pl. Pathol.* 67: 707-718.
- DIAS, A.C.R.; CARVALHO, S.J.P.; MARCOLINI, L.W.; MELO, M.S.C.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Competitiveness of alexandergrass or Bengal dayflower with soybean. *Planta Daninha*. (2010) . 28: 515-22.
- HASAN, M.; AHMAD-HAMDANI, M. S.; ROSLI, A. M.; HAMDAN, H. Bioherbicides: Na Eco-friendly tool for sustainable weed management. *Plants*, v. 10, 1212, 2021. <https://doi.org/10.3390/plants10061212>
- HENNEN, J.F., FIGUEIREDO, M.B., DE CARVALHO, A.A., JR., AND HENNEN, P.G. Catalogue of the species of plant rust fungi (Uredinales) of Brazil. *Jardim Bot. do Rio de Janeiro*, 2005. 490
- HERNANDEZ, J.R., AND HENNEN, J.F. Rust fungi (Uredinales) of Northwest Argentina. 2002 *Sida* 20: 313-338.
- HOFFMANN, M., BROOKS, T. M., DA FONSECA, G. A. B., GASCON, C., HAWKINS, A. F. A., JAMES, R. E., ... & SILVA, J. M. C. Conservation planning and the IUCN Red List. *Endangered Species Research*, (2008). 6(2), 113-125.

JUNIOR, E. D., ULRICH, A., BONAFIN, F., TELES, L. O., & MOSSI, A. J. CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS EM PRÉ-GERMINAÇÃO COM ISALODOS FÚNGICOS. JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA, . (2020)1(10).

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. Plantas infestantes e nocivas. 2a. São Bernardo Do Campo: BASF; 1999.

KISSMANN, Kurt Gottfried; GROTH, Doris. PLANTAS INFESTANTES E NOCIVAS. 2. ed. São Paulo: Basf, 1997. 722 p.

MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. Revisão Anual de Patologia de Plantas, v. 4, p. 261-295, 1996.

MERCADO SIERRA, A. Hifomicetes Demaciaceos de Sierra del Rosario, Cuba. Editorial Academica, Havana : 181. 1984

MIRA, Y., CASTAÑEDA, D., MORALES, J. Phytopathogenic fungi with potential as biocontrol agents for weeds of importance in crops of Antioquia, Colombia. Egypt J Biol Pest Control 31, 122 (2021). <https://doi.org/10.1186>

MONDO, V. H. V.; CARVALHO, S. J. P.; DIAS, A. C. R.; MARCOS FILHO, J. Efeitos da luz e temperatura na germinação de sementes de quatro espécies de plantas daninhas do gênero *Digitaria*. Rev Bras Sementes 2010;32:131-7. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222010000100015>

OLIVEIRA, Maurílio Fernandes de; BRIGHENTI, Alexandre Magno Comportamento dos herbicidas no ambiente. Brasília, Df: Embrapa, 2011. 194 p.

PIATEK, M., LUTZ, M., AND YOROUS, N.S. A molecular phylogenetic framework for Anthracocystis (Ustilaginales), including five new combinations (inter alia for the asexual *Pseudozyma flocculosa*), and description of Anthracocystis grodzinskae sp. nov.. Mycol. Progr. 2019. 14: 1-15.article

PIATEK, M., LUTZ, M., AND YOROUS, N.S. A molecular phylogenetic framework for Anthracocystis (Ustilaginales), including five new combinations (inter alia for the asexual *Pseudozyma flocculosa*), and description of Anthracocystis grodzinskae sp. nov.. Mycol. Progr. 14: 1-15 Urtiaga, R. 2004?. [Host index of plant diseases and disorders from Venezuela - Addendum]. Unknown journal or publisher : 268. . 2015

RAMACHAR, P., AND CUMMINS, G.B. . The species of Puccinia on the Paniceae. Mycopathol. Mycol. Appl. 1965. 25: 7-60.

SAREMI H.; OKHOVVAT, S.M. Biological control of Orobanche aegyptiaca by Fusarium oxysporum f. sp. Orobanche in northwest Iran. Commun Agric Appl Biol Sci. 2008;73(4) 931-938. PMID: 19226845.

SOUZA, A. R. C.; BALDONI, D. B.; LIMA, J.; PORTO, V.; MARCUS, C.; MACHADO, C.; FERRAZM R. C.; KUHN, R. C.; JACQUES, R. J. S.; GUEDES, J. V. C.; MAZUTTI, M. A. Selection, isolation, and identification of fungi for bioherbicide production. Brazilian Journal of Microbiology, v. 48, p. 101-108, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.09.004>

VANKY, K. . New smut fungi (Ustilaginomycetes) from Mexico, and the genus Lundquistia. Fung. Diversity 2004. 17: 159-190

VANKY, K. Taxonomical studies on Ustilaginales. XX.. Mycotaxon. 2000 74: 161-215

VIEIRA, B. S.; BARRETO, R. W.; DE NECHET, K. L. Controle biológico de plantas daninhas com fungos fitopatogênicos. In: OLIVEIRA, M. F.; BRIGHENTI, A. M. (Eds). Controle de Plantas Daninhas – métodos físico, mecânico, cultural, biológico e alelopatia. Embrapa:Brasília – DF, p. 113-136, 2018.

YASUHARA-BELL, J., PEDLEY, K.F., FARMAN, M., VALENT, B., AND STACK, J.P. Specific detection of the wheat blast pathogen (*Magnaporthe oryzae* Triticum) by loop-mediated isothermal amplification. Pl. Dis. . 2018. 102: 2550-2559

ZAMBÃO, J.; BITTENCOURT, H. H.; BONOME, L. T.; TREZZI, M. M.; FERNANDES, A.C.P.P. Water restriction, salinity and depth influence the germination and emergence of sourgrass. Planta Daninha. 2020; 38e020. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582020380100057>

CAPÍTULO 3: Primeiro relato de *Cladosporium digitarium* provocando lesões foliares em *Digitaria insularis*

F. Garcia, E. M. Inokuti, T. F. da Nobrega, A. L. Firmino, R.W. Barreto & B. S. Vieira, *sp. nov.*

Etymology. Referring to the host genus.

Classification – Davidiellaceae, Capnodiales, Dothideomycetes.

Lesions on living leaves, were firstly circular and grew becoming elliptical dark brown with a light brown center ($2.7\text{--}12.5 \times 0.7\text{--}4$ mm), distributed in a large part of the leaf blade and visualized predominantly on the adaxial face. *Colonies* were flat, aerial mycelium velvety, green with a thin white margin and a dark green reverse, sporulation very abundant. Morphology after 14 days growth in SNA was as follows: conidiophores macronematous, light brown, solitary, up to 40 μm long, 1.3–2.0 μm wide; ramoconidia cylindrical, pale brown, 4.7 to 7.7×1.1 to 1.8 μm , aseptate; conidia acrogenous, in branched chains, ellipsoid, obovoid, subhyaline to pale brown, with darkened and thickened hilum, $1.6\text{--}3.0 \times 0.8\text{--}2.2$ μm , aseptate. Sexual morph not observed. Chlamydospores not observed. The fungus on sourgrass is a typical *Cladosporium*.

Typus. BRAZIL, Minas Gerais, Uberaba, (19°44'52" S, 47°55'55" W), on living leaves of *Digitaria insularis* (sourgrass), 10th December 2020, B. S. Vieira (holotype VIC 49447, culture ex-type COAD 3621, ITS, TEF and ACT sequences GenBank OR473653, OR478710 and OR478711).

Notes – Based on a megablast search of NCBI's GenBank nucleotide database, the ITS, TEF and ACT sequences of *Cladosporium digitarium* showed a similarity of 99.80%, 91.24% and 90 % respectively, with the sequences of *Cladosporium anthropophilum* (CBS 140685, GenBank LN834437, LN834533 and LN834621); whereas its TEF sequence was 100 % similar to that of *Cladosporium* sp. (UTHSC DI-13-226, GenBank LN834517). The phylogenetic reconstruction using ITS, TEF and ACT of different accepted *Cladosporium* species, showed that the new specie was located in a highly-supported clade together with *C. anthropophilum*. However, *C. digitarium* has clear morphological differences distinguishing it from *C. anthropophilum*. Morphologically, *C. digitarium* can be differentiated mainly from *C. anthropophilum* by its conidia and ramoconidia, which are smaller, the conidia measuring $1.6\text{--}3.0 \times 0.8\text{--}2.2$ μm and the ramoconidia measuring $1.6\text{--}3.0 \times 0.8\text{--}2.2$ μm and *C. anthropophilum* has conidia $3.5\text{--}9.0 \times 2.0\text{--}3.0$ μm and ramoconidia $20\text{--}42 \times 2\text{--}5$ μm

(Sandoval-Denis et al., 2016). Additionally, the color of the *C. digitarium* mycelium on PDA medium after 14 days is olive-gray with a white border, measuring 55.5 to 63.6 mm at 25°C. In contrast, the mycelium of *C. anthropophilum* displays a gray-green to deep green hue and reaches sizes of 17-39 mm under identical conditions. The mycelial colorations and growth in OA and SNA media also differed, as in OA medium the coloration was greenish glaucous and growth ranged from 60.4 to 63.7 mm, while in SNA the mycelial color varied from citrine green at the center to whitish coloration and reached 58.5 to 60.6 mm in 14 days at 25°C. The *C. anthropophilum* on OA and SNA media displayed an olive to olive brown coloration and reached 24-32 mm and 23-26 mm, respectively, after 14 days at 25°C (Sandoval-Denis et al., 2016). *Cladosporium anthropophilum* have been reported from human clinical samples (Sandoval-Denis et al., 2016), *Rubus idaeus* from USA (Farr & Rossman 2023) and on *Pinus armandii* from China (Tibpromma et al., 2019), bamboo slats, *Gossypium* sp. seeds, *Chenopodium ficifolium*, *Ricinus communis*, *Phytolacca americana*, *Vigna unguiculata*, *Dalbergia* sp., *Plectranthus* sp., pruned wood, *Eucalyptus* sp., *Areca* sp., *Triticum aestivum*, coffee leaf, indoor air, unidentified aphid (Bensch et al., 2018). No species of *Cladosporium* have ever been reported on members *Digitaria* prior to the present record.

References:

- Bensch, K. et al. 2018. Studies in Mycology 89:177-301.
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.03.002>.
- Carbone, I, Kohn, L M (1999). Mycologia 91:553. <https://doi.org/10.2307/3761358> Crossref, ISI, Google Scholar.
- Cho, S-E. et al. 2023. Mitochondrial DNA part B 8:1.
<https://doi.org/10.1080/23802359.2023.2167474>
- Marin-Felix, Y. et al. 2017. Studies in Mycology 86:1.
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.04.002>.
- Sandoval-Denis, M. et al. 2016. Persoonia 36:281
<http://dx.doi.org/10.3767/003158516X691951>.
- Takano HK, Melo MSC, Ovejero RFL, Westra PH, Dayan Gaines TA, EF, (2020) Trp2027Cys mutation evolves in *Digitaria insularis* with cross-resistance to ACCase inhibitors. Pestic Biochem and Phys. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.12.011>
- Tibpromma, S. et al. 2019. Pathogens 8:285. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040285>.
- White, T. J., et al. 1990. Page 315 in: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, CA. Crossref, Google Scholar.



Figure 1. Morphology and pathogenicity of *Cladosporium digitarium*. **a.** Top view of colonies after seven days on PDA. **b.** Mycelium. **c.** Macronematous conidiophores. **d-f.** Macronematous conidiophore, ramoconidia. **g-i.** Conidiogenous cell and ramoconidia. **j.** catenulated conidia. **k.** conidia. **l.** Sourgrass seedlings (20 days-old) inoculated with a conidia suspension of *C. digitarium*. **m.** *Digitaria insularis* – Control (Water). **n.** symptoms of leaf spot on *D. insularis* caused by *C. digitarium*

Scale bars = 5µm

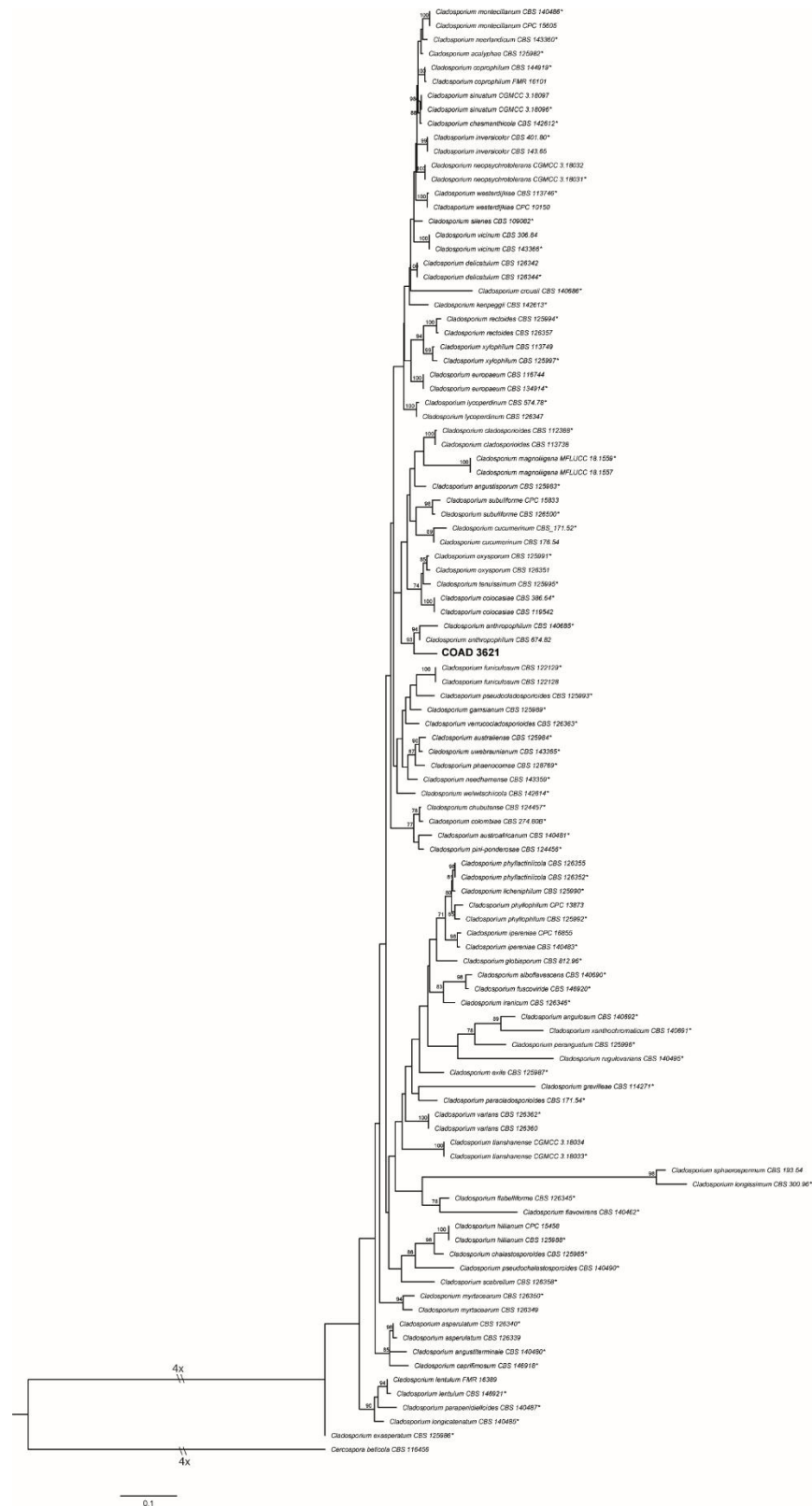


Figure 2. Multilocus phylogenetic tree of *Cladosporium* specie inferred from RAxML based on combined *ITS*, *TEF* and *ACT* sequences. The bootstrap >70 are indicated above the nodes. The isolate from the study are highlighted in bold and *** indicates types-isolates. The tree was rooted with *Cercospora beticola* (CBS 116456) isolate.

CAPÍTULO 4: *Anthracocystis panici-leucophaei*: a Potential Biological Control Agent for the Grassy Weed *Digitaria insularis*

A.P. Souza^a, J.F. Alves^a, E.M. Inokuti^a, F. Garcia^a, B.W. Ferreira^a, T.F. Nobrega^a, R.W. Barreto^b, B.S. Vieira^{a*}, C. C. Moreira^c

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

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

^c Koppert Do Brasil Holding Ltda, Piracicaba 13400-970, SP, Brazil

*Corresponding author

E-mail address: brunovieira@ufu.br

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

Abstract

Anthracocystis panici-leucophaei, causal agent of smut on *Digitaria insularis* (sourgrass), one of the main weeds of annual and perennial crops in South America, was preliminarily evaluated in the present work as a biological control agent for this target weed. Samples of *D. insularis* showing typical smut symptoms were collected from ruderal areas in cities located in the states of Minas Gerais and Goiás states. Two types of inocula (teliospore and sporidia) from isolates BSV1 and BSV2 were tested to assess its infectivity. The effects of teliospore and sporidia inoculations at different phenological stages of sourgrass (pre-emergence, 10 days after sowing (DAS), 25 days after sowing (DAS)) were compared, as well as the potential of sporidia and teliospores in post-emergence sourgrass management. Additionally, virulence tests were conducted with the isolates obtained from *D. insularis* and preliminary evaluation of specificity of *A. panici-leucophaei*. Morphological and phylogenetic characterization identified BSV1, BSV2, and 46 isolates as *Anthracocystis panici-leucophaei*. Both teliospores and sporidia of *A. panici-leucophaei* are infective to *D. insularis* in three different phenological stages. Newly emerged plants with one pair of leaves are more sensitive to *A. panici-leucophaei*. Infection by *A. panici-leucophaei* inhibit the growth of sourgrass decreasing several physiological parameters of *D. insularis* plants up to 102 days after sowing. The fungus produces systematic infection of sourgrass plants and may induce the formation of sori in a significant proportion of the plant panicles, partly castrating those plants - significantly reducing the seed production. Among sixteen *A. panici-leucophaei* isolates tested the isolate 46 was the most virulent and inhibited the growth of sourgrass plants and seems to have good potential as a biological control agent to be deployed against sourgrass. The fungus *A. panici-leucophaei* was preliminarily demonstrated to be specific to *D. insularis*.

Keywords: Smut. Mycoherbicide. Sourgrass. Weed.

1. Introduction

One of the most serious agricultural problems is the infestation of weed species in economically important crops. This is recognized as one of the main limiting factors behind losses in crop production (Cimmino et al., 2015). Brazil has a great diversity of grasses belonging to *Digitaria* (Poaceae) some of which are common in agroecosystems (Mondo et al., 2010). Sourgrass (*Digitaria insularis*) is one of the worst weeds of annual and perennial crops in South America. It is a perennial grass species with a C4 photosynthetic metabolism (Kissmann and Groth, 1997) and can reach high infestation levels and reproduce either by seeds (up to 40000 seeds/plant/year) or rhizomes (Gemelli et al., 2012; Lopes-Ovejero et al., 2017; Takano et al., 2020).

Chemical management is being jeopardized by the increasingly widespread resistance of populations of *D. insularis* to glyphosate (Lopes-Ovejero et al., 2017). This fact is due to the vast area that is cultivated with glyphosate-resistant transgenic crop varieties and to repeated applications in the same herbicide for consecutive years (Timossi, 2009). Approximately 90% of the total area of soybean (*Glycine max* L.) in South America is cultivated with glyphosate-resistant transgenic soybean varieties (RR) and glyphosate is applied at least three times per year (Peterson et al., 2018). One alternative for management of glyphosate-resistant biotypes is the use of Acetyl Coenzyme A Carboxylase (ACCase) inhibitors herbicides. The repeated use of this group of herbicides also resulted in the report of resistance to ACCase herbicides in *D. insularis* in Brazil (Gemelli et al., 2012; Takano et al., 2020).

For decades, chemical control has been the predominant strategy for weed management in most major crops (Cimmino et al., 2015); however, with the increasing herbicide-resistance problems in important weeds novel forms of management became necessary. Biological control is emerging as a key alternative for pesticides worldwide. Several studies demonstrate the potential of phytopathogens as weed biocontrol agents (Charudattan, 2001), especially phytopathogenic fungi (Klaic et al., 2015). Mycoherbicides are herbicides based on a fungi or fungal metabolites as non-chemical alternatives reducing the use of synthetic chemical substances in weed control (Saxena and Kumar, 2010).

Smut-causing fungi have been studied as potential biological control agents for various weed species. Some have shown promising results including: *Sporisorium ophiuri* for the control of *Rottboellia cochinchinensis* (Smith et al., 1997) and *Sporisorium cruentum* for the control of *Sorghum halepense* (Millhollon, 2000).

During a survey of phytopathogenic fungi associated with *Digitaria insularis* in the Alto Paranaíba region (Minas Gerais-Brazil), diseased plants were observed in the municipality of Monte Carmelo, showing severe dwarfing and smutted panicles (castration). The typical formation of a "whip" or sori at the apical meristem of the plants was often observed with panicles covered by a dark mass of spores. Such symptoms are similar to those observed in smutted sugarcane (attack by *Sporisorium scitamineum*) and as a result of attack of other members of the Ustilaginaceae on members of the Poaceae (Fig. 1).



Figure 1. Sourgrass (*Digitaria insularis*) showing smut symptoms – growth reduction and formation of sori on *Anthracocystis panici-leucophaei* in a field situation in Monte Carmelo - Minas Gerais (Brazil)

The aim of the present study was to confirm the identity of the fungus associated to smut symptoms on sourgrass as *Anthracocystis panici-leucophaei*, and to evaluate it, preliminarily, as a potential biological control agent.

The following steps were performed: (1) Collection of samples of *D. insularis* presenting smut symptoms from different locations in the states of Minas Gerais and Goiás (Brazil); (2) Elucidation of infectivity of different spore to *D. insularis*; (3) Polyphasic taxonomic identification of *A. panici-leucophaei* combining morphological and molecular features; (4) Determination of phenological stage(s) of *D. insularis* which are the most susceptible to *A. panici-leucophaei*; (5) Comparison of the virulence of different isolates of *A. panici-leucophaei* to *D. insularis*; (6) Preliminary verification of the host-range of *A. panici-leucophaei*; (7) Preliminary evaluating the potential of *A. panici-leucophaei* as a biological control agent for *D. insularis* through plant inoculations.

2. Material and Methods

2.1 Survey

Samples of *D. insularis* showing typical smut symptoms were collected from ruderal and agricultural areas in cities located in the states of Minas Gerais and Goiás, Brazil, between April 2021 and January 2022 (Fig. 2). Panicles of sourgrass bearing typical sori, as well as other disease symptoms, were brought to the Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia (LAMIF) at the Universidade Federal de Uberlândia-UFU/*Campus* Monte Carmelo.

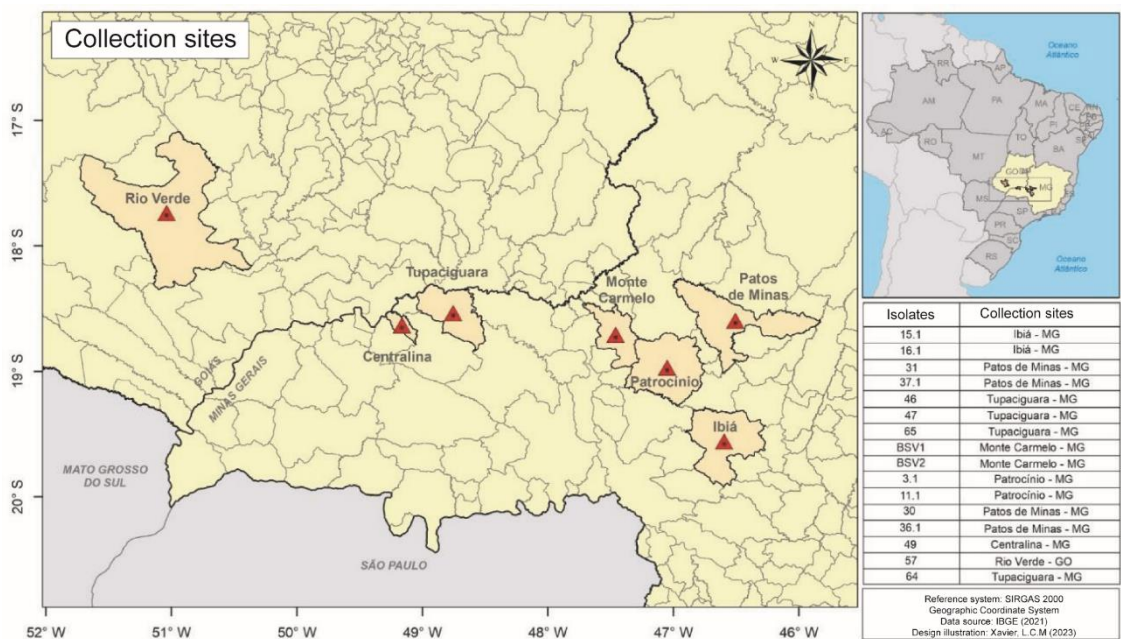


Figure 2. Collection sites (red triangles)

2.2 Isolation

Teliospores were collected from the panicles of *D. insularis* showing smut symptoms, with a sterile fine pointed needle and were transferred to microtubes containing sterilized distilled water supplemented with streptomycin sulfate (5 mg/L). Three serial dilutions were performed, and 100 µL of each suspension were transferred to plates containing yeast malt-agar (YMA) (3 g/L yeast extract; 3 g/L malt extract; 5 g/L soy peptone; 10 g/L glucose; 15 g/L agar) and incubated at 28°C in the dark. After 24 hours, under GZ-500 stereomicroscope zoom 7.5X a 50X, four individual germinated teliospores were transferred to new YMA plates and incubated for an additional 48 hours, after that, one single colony for each isolate was transferred onto another YMA plate. Pure yeast-like sporidial cultures, obtained through this process, were incorporated in a temporary culture collection.

Fragments of seven days-old yeast-like colonies produced in YMA, or fresh teliospores collected directly from sori were kept in a 10% aqueous glycerol solution in a ultrafreezer (-80 °C).

2.3 Taxonomy

2.3.1 Morphological Studies

For the observation of teliospore morphology, microscopic preparations were made using lactophenol cotton blue and lactoglycerol of teliospores present in the sori of two isolates obtained in the survey and selected for taxonomic identification, namely BSV1 and BSV2 - isolates from Monte Carmelo-MG. Subsequently, they were examined under a light microscope (Olympus, BX53) fitted with differential interference contrast illumination and equipped with a digital capture system (Olympus Q-Color 5™). Biometric measurements of at least 30 teliospores per sample were performed.

Selected sub-samples of dried material containing sporulating sori were mounted on stubs using double-sided adhesive tape and gold-coated with a Balzer's FDU 010 sputter coater. A scanning electron microscope (SEM) Carl-Zeiss Model LEO VP 1430 was utilized to further examine the ultra-structure of the fungus.

2.3.2 DNA extraction, PCR amplification and sequencing of isolates:

The genomic DNA of isolates BSV1, BSV2 and 46 (additional isolate collected in the second round of surveys) was extracted from pure cultures of the three isolates grown on YMA plates, incubated at 25 °C with a 12-hour photoperiod for seven days. Approximately 50-80 mg of each fungal colony was scraped from the colonies and transferred to sterilized 1.5 mL plastic microtubes containing zirconium beads. DNA extraction was performed using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, WI, USA) following the manufacturer's instructions.

PCR amplification of the the Internal Transcribed Spacer (ITS) region was conducted with primers ITS4 and ITS5 (White et al., 1990). The PCR reaction was set up with a total volume of 12.5 µL, comprising 2 µL (20 ng) of DNA, 6.25 µL of Dream Taq Master Mix (Fermentas Company), 0.25 µL of DMSO, 1.25 µL of BSA, 2.25 µL of H₂O, and 0.25 µL of each primer. PCR cycling consisted of initial denaturation at 95°C for 5 minutes, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 minute, annealing at 52°C for 1 minute, extension at 72°C for 2 minutes, and a final extension at 72°C for 10 minutes. PCR products were analyzed on 2% agarose gel stained with GelRed™ (Biotium Inc., Hayward, CA, USA) and visualized under UV light to assess amplification size and purity.

PCR products were purified and sequenced by Macrogen Inc., South Korea (<http://www.macrogen.com>). Electropherograms were evaluated, ambiguous nucleotides were corrected, and consensus sequences (contigs) were generated using SeqAssem ver. 07/2008 software (Hepperle, 2004).

Phylogenetic analysis of the ITS region of the smut from sourgrass was conducted using the Bayesian Inference (BI) and Maximum-likelihood methods with the Cyberinfrastructure for Phylogenetic Research (CIPRES) Science Gateway V. 3.3 using MrBayes on XSEDE 3.2.6) for BI and RAxML v.8.2.12 (Miller et al., 2011). Phylogenetic trees were visualized using FigTree v1.3.1 (Rambaut, 2009) and edited using CorelDRAW Graphics Suite 2017. Prior to phylogenetic analyses, the best substitution model for the gene/locus was determined using jModelTest2 ver. 2.1.6 (Darriba et al., 2012), and BI analysis employing a Markov Chain Monte Carlo method was performed with all sequences. The GTR + I + G evolution model was used for the ITS region, selected based on the Akaike Information Criterion (AIC) after likelihood score calculation with MrMODELTEST 2.3 (Posada and Buckley, 2004).

Once likelihood scores were calculated, models were selected according to the Akaike Information Criterion (AIC). The GTR + I + G evolution model was used for the ITS region.

Phylogenetic analysis of the ITS region was conducted using the Cyberinfrastructure for Phylogenetic Research (CIPRES) Science Gateway V. 3.3 utilizing MrBayes on XSEDE 3.2.6 (Miller et al., 2011). The resulting phylogenetic trees were visualized using FigTree v1.3.1 (Rambaut, 2009) and edited in CorelDRAW Graphics Suite 2017.

2.4. Evaluation of *Anthracoystis panici-leucophaei* as a Biological Control Agent for *Digitaria insularis*

In experiments 2.4.3 and 2.4.4, isolates obtained from the initial survey, BSV1 and BSV2 (mixed isolates in water suspension) were used. For the specificity test (2.4.6), isolate BSV2 was utilized. Following new collections and the addition of new isolates to the collection, the aggressiveness of different isolates of *A. panici-leucophaei* on *D. insularis* plants was evaluated (2.4.5).

Test plants were grown from seeds obtained at Cosmo Agrícola Produção e Serviços Rurais LTDA in a substrate consisting of sterilized soil + sand + manure in a 1:1:1 ratio kept in 300 mL plastic pots.

2.4.1 Preparation of teliospores for use as inoculum

Selected sori, examined and found free of mycoparasites or mycophagous insects were crushed with mortar and pestle and a 60 mesh sieve was used to remove plant debris and produce a clean mass of teliospores. A viability tests of teliospores was conducted prior to use in experiments. Percentage germination was assessed by placing a 50 µL aliquot of a teliospore suspension in sterilized distilled water on either microscope slides or Petri dishes containing YMA. These were placed in an incubator at 25 °C either adjusted to a 12-hour light regime or in continuous dark and observations were made after 4 and 12 hours.

2.4.2 Sporidial production

The sporidia were obtained by transfer of small portions of colonies formed on YMA onto 250 mL flasks containing liquid YM (3 g/L yeast extract, 3 g/L malt extract, 5 g/L soy peptone, 10

g of glucose). These were then placed on an orbital shaker at 28 °C, 150 rpm, for 5 days to obtain yeast-like sporidia. Sporidial suspension of BSV1 and BSV2 were then diluted with sterile distilled water (SDW) to 10^6 sporidia mL⁻¹ and plated together on YMA for compatibility testing. Compatible reaction was recognized by the appearance of white mycelium (supposedly resulting from fusing of compatible sporidia) on a plate after 5 days of incubation. The isolates BSV1 and BSV2 were considered compatible (sporidia of opposite sexual types) as described in Banuett and Herskowitz (1989) and Santiago et al. (2012).

Such compatible isolates (BSV1 and BSV2) were separately transferred to liquid YM flasks and left on an orbital shaker at 28°C, 150 rpm for 5 days in the dark to stimulate the multiplication of the sporidia. The concentration of the resulting cell suspension obtained was adjusted to 1×10^6 sporidia/mL with the help of a haemocytometer. A mixture of compatible suspensions from isolates BSV1 and BSV2 was prepared by mixing 50% of the 1×10^6 sporidia/mL suspension volume of each isolate and immediately utilized in inoculation tests.

2.4.3 Comparative effect of teliospores vs. sporidia inoculations of BSV1 and BSV2 on *D. insularis* at different phenological stages

Observations on the effect of each type of *A. panici-leucophaei* inoculum on three different phenological stages of *D. insularis* (seeds, one pair of leaves plants and 3-4 leaf-plants) was made in order to select the ideal inoculum kind and plant stage for establishing as standard for later experiments. Twelve *D. insularis* seeds were sown in 0.5 L pots containing the mixture mentioned above. Seven days after germination started the plant stand on each pot was standardized and five plants were left in each pot with excess plants removed. Sporidia of BSV1 and BSV2 were produced as described in 2.4.2. Sporidial suspensions involved a mixture of the two isolates of purported compatible mating types. Plants were sprayed until runoff with a hand-held sprayer. The treatments consisted of: (a) TS1 - application of 10 mL/pot of a teliospore suspension of isolate BSV1 (3.23×10^6 teliospores mL⁻¹ + 0.01% Tween® 20). The application was performed by drenching the seeds with inoculum suspension on the substrate surface (pre-emergence). (b) TRE1 - application of 10 mL/pot of a teliospore suspension of isolate BSV1 (3.23×10^6 teliospores mL⁻¹ + 0.01% Tween® 20), on plants having one pair of leaves (10 days after sowing (DAS)). (c) TA1 – *Ibid* application of BSV1 teliospore suspension on 3-4 leaf-plants (25 DAS). (d) ES3 – direct application of 10 mL/pot of a mixed sporidial suspension (BSV1 + BSV2) (3.17×10^6 sporidia mL⁻¹ + 0.01% Tween® 20) on the seeds and

soil surface (pre-emergence). (e) ERE3 - *Ibid* on one pair of leaves-plants (10 DAS). (f) EA3 - *Ibid* on 3-4 leaves-plants (25 DAS). Control consisted of pots seeded with sourgrass as described above but only sprayed with sterile distilled water (SDW) + 0.01% Tween® 20. The plants were kept in a greenhouse at 26–28 °C and irrigated twice a day. In the first 48 hours after inoculum application (or spraying with water), the pots were kept in a humid chamber. Evaluation was conducted 37 days after sowing. Plant height and root length measured with a ruler, stem diameter – measured with a pachymeter, dry biomass of roots and aerial part – evaluated by drying in an oven with air circulation at 65°C for 48 hours, chlorophyll with a clorofiLOG (Falker®) and number of leaves per plant were assessed. The experiment was conducted in a completely randomized design with 5 plots and 20 repetitions for each treatment, with each plant considered a repetition. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA, $p < 0.05$), and means were compared by Tukey's test. Reisolation of the fungus was made from five pieces of stunted inoculated plants (1 cm²) by transfer of these fragments in 70% ethanol for 1 min and sodium hypochlorite (2.% active chlorine) for 3 min, followed by triple washing in deionized and autoclaved water, and transferred to Petri dishes containing Potato dextrose agar medium for to confirm the presence of *A. panici-leucophaei* within diseased tissues. The presence of the pathogen was confirmed by the formation of colonies with sporidia of the fungus after 5 days of incubation at 25 °C.

2.4.4 Effect of post-emergence inoculation of sporidia and teliospores of *Anthracocystis panici-leucophaei* on *Digitaria insularis*

Thirty seeds of *D. insularis* were sown in each of 5.0 L pots containing the substrate described above. Smut sporidial suspension was applied using a mini-pressurizer on newly emerged plants (10 DAS), with 2-3 leaves. The treatments consisted of: (a) TRE - application of 20 mL/pot of a teliospore suspension of isolate BSV1 (2.31×10^6 teliospores/mL⁻¹ + 0.01% Tween® 20). (b) BSV1 + BSV2 - application of 20 mL/pot of a sporidia suspension of isolates BSV1 and BSB2 in mixture (2.64×10^6 sporidia/mL⁻¹ + 0.01% Tween® 20). (c) BSV1 - application of 20 mL of a sporidia suspension of isolate BSV1 (2.39×10^6 sporidia/mL⁻¹ + 0.01% Tween® 20). (d) BSV2 - application of 20 mL of a sporidia suspension of isolate BSV2 (2.51×10^6 sporidia/mL⁻¹ + 0.01% Tween® 20). Control consisted of pots sprayed with sterile distilled water + 0.01% Tween® 20. All treatments were kept for 48 hours in a dew chamber

after inoculation. Subsequently, the plants were maintained in a greenhouse at approximately 25 °C and a 12-hour photoperiod.

This experiment was performed after 102 days of sowing, until the emergence of healthy panicles or those with smut symptoms (sori with teliospores). Evaluation was made with the parameters: plant height), root length, stem diameter, dry weight of root and aerial part (procedure described above). Additionally, number of leaves per plant, number of tillers, number of inflorescences per plant, and number of tillers bearing at least one sorus were also recorded.

The experiment was conducted in a completely randomized design with 5 plots and 25 repetitions for each treatment, considering one plant as a repetition. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA, $p < 0.05$), and means were compared by Tukey's test.

2.4.5 Comparative virulence of 16 *A. panici-leucophaei* isolates on *Digitaria insularis*

Sixteen different isolates of *A. panici-leucophaei* which were obtained during the field surveys were included. Sporidial production was conducted as described in 2.4.2 and suspended in sterile distilled water + 0.01% Tween® 20 at a concentration of 1.0×10^6 sporidia/mL.

Suspension was sprayed onto newly emerged sourgrass seedlings grown in pots as described above (10 DAS), each of the ten plants in each pot had 2-3 leaves. Each pot was sprayed with 20 mL of the sporidial suspension, separately with each isolate until runoff. Controls were only sprayed with SDW + 0.01% Tween® 20. All pots were kept in a dew chamber for 48 hours after inoculation, and subsequently, transferred to a greenhouse bench.

Evaluation was performed 90 days after sowing as described in 2.4.4.

The experiment was conducted in a completely randomized design with 17 treatments (16 isolates plus control), with five repetitions for each treatment. Each pot with 10 seedlings represented one repetition.

Values obtained for each parameter were analyzed/tested for presuppositions, where residual normality was verified using the Shapiro-Wilk test ($p < 0.05$), and variance homogeneity was assessed using the Bartlett test ($p < 0.05$). The data were subjected to analysis of variance (ANOVA), and subsequently, the means were compared using the Scott-Knott test ($p < 0.05$). Comparison of treatment means relative to the control was conducted using the Dunnett test ($p < 0.05$).

The statistical program used was R software version 4.0.2. ANOVA and Bartlett's variance homogeneity test were performed using scripts developed for the ExpDes.pt data package version 1.2 (Ferreira et al., 2010), while the Shapiro-Wilk residual normality test was executed using scripts from the Nortest data package version 1.0-4 (Gross and Ligges, 2015). The Dunnett test was executed using scripts from the multcomp data package version 1.4-20 (Hothorn et al., 2022).

2.4.6 Preliminary evaluation of specificity of *A. panici-leucophaei* to sourgrass

Twenty-one grass species were selected for a preliminary specificity test (Table 1). Plants were inoculated, as described for 2.4.3. A larger volume (20 mL/pot) was utilized and the isolate used in inoculations was (BSV2) (1.0×10^6 sporidia/mL). Newly emerged plants (10 DAS) were targeted. After inoculation, the plants were kept in a humid chamber for 48 hours and then transferred to a greenhouse bench. For each plant species, six pots with five individual plants were included, with three pots inoculated with BSV2 and three pots serving as controls and only sprayed with a solution of 0.01% Tween® 20. Evaluation was conducted 90 days after sowing by recording the incidence or absence of disease symptoms: dwarffing and smut symptoms (sori).

Table 1 - Species included in the host-specificity test

Species	Commom name
<i>Cynodon</i> spp. cv. Tifton 85	Bermuda grass
<i>Eleusine indica</i>	Yard-grass
<i>Oryza sativa</i>	Rice
<i>Panicum maximum</i> cv. BRS Zuri	Guinea grass
<i>Panicum maximum</i> cv. híbrida BRS Quênia	Guinea grass
<i>Panicum maximum</i> cv. Massai	Guinea grass
<i>Panicum maximum</i> cv. Mombaça	Guinea grass
<i>Panicum maximum</i> cv. Tanzânia	Guinea grass
<i>Pennisetum glaucum</i>	Millet
<i>Saccharum officinarum</i>	Sugarcane
<i>Sorghum bicolor</i>	Sorghum
<i>Triticum</i> spp.	Wheat
<i>Urochloa brizantha</i>	Grass
<i>Urochloa brizantha</i> cv. Marandu	Grass
<i>Urochloa brizantha</i> cv. MG-4	Grass
<i>Urochloa brizantha</i> cv. MG-5 Vitória	Grass
<i>Urochloa brizantha</i> cv. BRS Piatã	Grass
<i>Urochloa</i> cv. Cayana	Grass
<i>Urochloa híbrida</i> cv. Sabiá	Grass

3. Results

3.1 Survey

Sixteen samples of *D. insularis* bearing typical *A. panici-leucophaei* smut symptoms were obtained and pure cultures were obtained from each with one isolate being selected from each sample/origin: 13 from the state of Minas Gerais and 3 from the state of Goiás (Brazil) (Table 2).

Table 2 – *A. panici-leucophaei* isolates obtained from survey in the states of Minas Gerais (MG) and Goiás (GO) – Brazil

Isolate	Locality	State	Date
BSV1	Monte Carmelo	MG	april/21
BSV2	Monte Carmelo	MG	jun/21
3.1	MG-223, Romaria	MG	dec/21
11.1	Patrocínio	MG	dec/21
15.1	Ibiá	MG	dec/21
16.1	Ibiá	MG	dec/21
30	Carmo do Paranaíba	MG	dec/21
31	BR-354 - Patos de Minas São João da Serra Negra,	MG	dec/21
36.1	Patrocínio	MG	dec/21
37.1	Patrocínio	MG	dec/21
46	Tupaciguara	MG	jan/22
47	Tupaciguara	MG	jan/22
49	Centralina	MG	jan/22
57	Rio Verde	GO	jan/22
64	Rio Verde	GO	jan/22
65	Rio Verde	GO	jan/22

3.2 Taxonomy

Anthracocystis panici-leucophaei (Bref.) McTaggart & R.G. Shivas, Persoonia 29:125 (2012) – MycoBank MB801662. For a complete list of synonyms see Ványi, 2004.

Notes: On specimens collected here, sori formed on upper leaves of sterile shoots or floral stems or immature inflorescences. Sori were long, cylindrical, often twisted, tapering towards the apex, 0.2-0.8 × 4-15 cm, covered by white to slightly grayish peridium that ruptures at maturity. Parenchymatous tissues between the vessels replaced by a mass of dark brown, semi-agglutinated, or granular powdery teliospores, revealed by the rupture of the peridium. Teliospores forming chains while immature, globose, to subglobose, ellipsoidal to slightly irregular, subpolyhedral, 6.0 × 8.0 µm, yellowish-brown; uniformly thick and densely verrucose wall (Fig. 3).

Specimens examined: Brazil: state of Minas Gerais; Monte Carmelo, on *Digitaria insularis*, Apr 16th April 16, 2021, B. S. Vieira, BSV1 and BSV2 isolates.

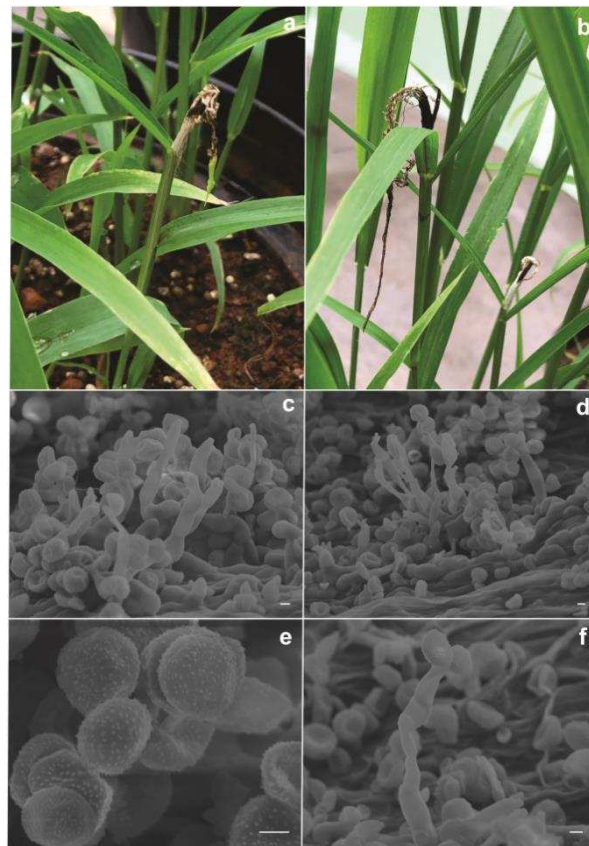


Figure 3. *Anthracocystis panici-leucophaei*. a and b - Sori on live plants (*D. insularis*). c and d - Teliospores produced on fertile hyphae forming chains while immature (SEM). e - Verruculose teliospores (SEM); f - Detail of teliospores production. Scale bar = 2µm

3.3 Phylogenetic analysis

Sequences from the ITS region of BSV1, BSV2, 46 isolates submitted to BLAST showed high similarity (100%, 99.72% and 100%, respectively) with sequence CP060299 from isolate SPL10 of *Anthracoecystis panici-leucophaei* (Bref.) McTaggart & R.G. Shivas.

The phylogenetic tree obtained from Bayesian Inference showed that BSV1, BSV2 and 46 isolates are grouped with high support (0.98) and 96% of bootstrap with other isolates of *A. panici-leucophaei*, which in turn formed a well-supported clade (1.0) within the genus *Anthracoecystis* (Fig. 4).

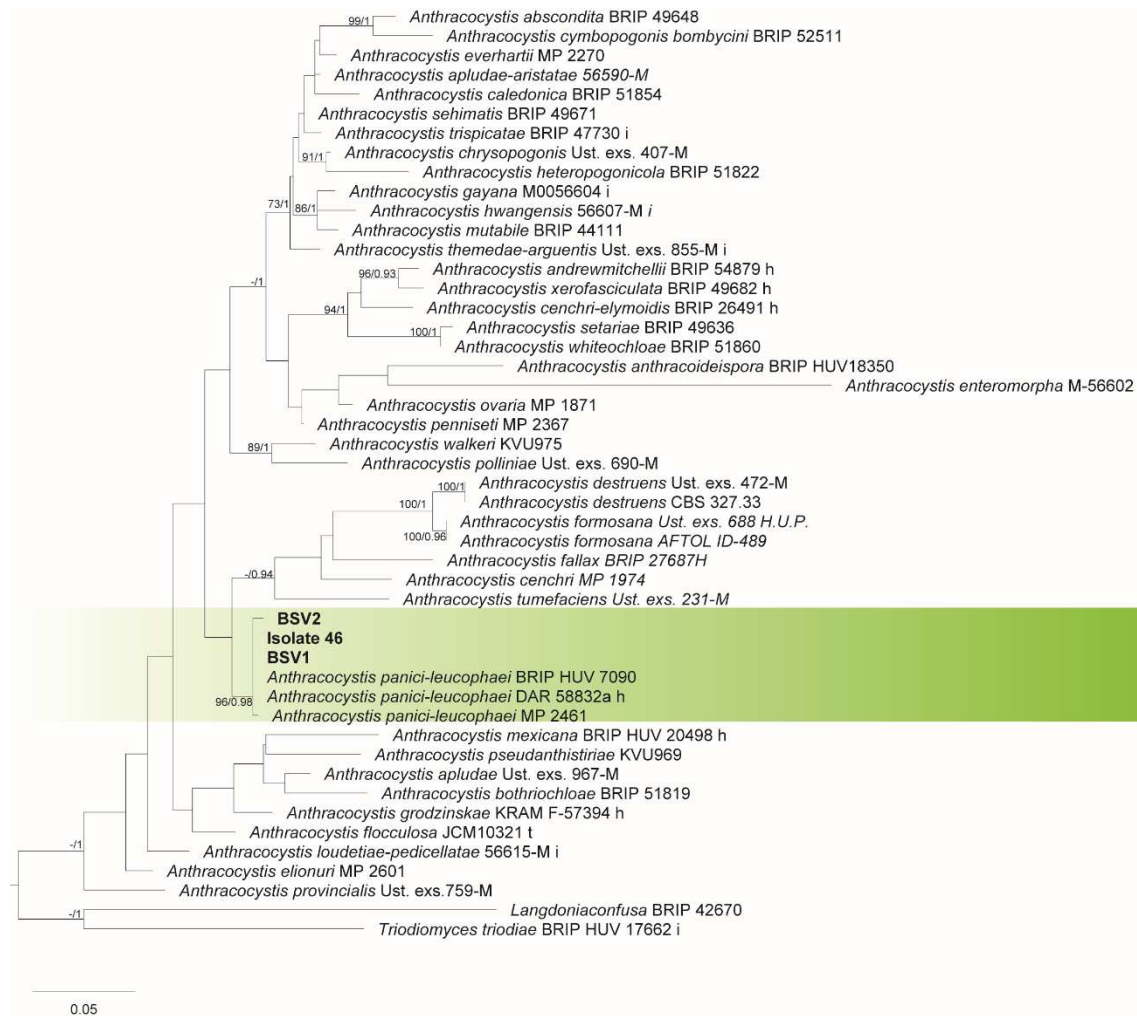


Figure 4. Multilocus phylogenetic tree of *Anthracoecystis* species inferred from RAxML and Bayesian analysis based on ITS sequences. The bootstraps ≥ 70 and Bayesian posterior probabilities ≥ 0.90 are indicated above the nodes, respectively. Isolate from the study are highlighted in bold. The tree was rooted with *Langdonia confusa* and *Triodiomyces triodiae*. The type isolate was identify as “t”, isotype as “i”, holotype as “h” in the end of the isolates identification.

3.4 Evaluation of *Anthracoctis panici-leucophaei* as a Biological Control Agent for *Digitaria insularis*

3.4.1 Comparative effect of teliospores vs. sporidia inoculations of BSV1 and BSV2 on *D. insularis* at different phenological stages

Both types of *Anthracoctis panici-leucophaei* inocula were infective to *D. insularis*. The infectivity of the two types of *A. panici leucophaei* inocula was confirmed by re-isolating the fungus from pieces of stunted inoculated plants. The presence of the pathogen was confirmed by the formation of typical yeast-like sporidial colonies after 5 days of incubation at 25 °C.

Inoculation involving either teliospores or sporidia, in pre-emergence, on newly emerged plants and on the aerial part (plants with 3-4 leaves), led to a delay in the development of the plants. The height of the sourgrass plants was reduced in all treatments as compared to the control (Table 3).

Table 3 - Effect of teliospores and sporidia application on *Anthracoctis panici-leucophaei* at different phenological stages of *D. insularis*

TREATMENTS	P H	R L	S D	D RM	D APM	C lo A	N L
CONTR OL	1 9,48 a	2 4,92 a	1 ,98 a	0, 0786 a	0, 1436 a	2 4,16 a	4 ,50 bc
PRE-EMERGENCY							
TS1	7 ,70 b	1 7,07 b	1 ,93 a	0, 0131 b	0, 0754 b	6 ,38 c	5 ,35 a
ES3	9 ,14 b	1 7,64 b	1 ,08 b	0, 0159 b	0, 0621 bc	1 1,01 b	4 ,80 ab
NEWLY EMERGED (10 DAS) – 2 leaves							
TRE1	7 ,55 b	1 5,37 b	1 ,28 b	0, 0167 b	0, 0380 cd	1 1,17 b	3 ,95 c
ERE3	6 ,82 b	1 4,72 b	1 ,07 b	0, 0150 b	0, 0278 d	1 0,47 b	4 ,20 bc
POST-EMERGENCY (25 DAS) – 3 to 4 leaves							
TA1	7 ,38 b	1 9,12 b	1 ,28 b	0, 0107 b	0, 0521 bcd	1 0,40 b	4 ,80 ab
EA3	7 ,67 b	1 8,21 b	1 ,42 b	0, 0103 b	0, 0516 bcd	1 2,41 b	4 ,70 b
CV%	3 7,28	2 5,66	2 6,54	9 3,31	4 1,88	3 3,81	1 3,93

PH: plant height (cm); RL: root length (cm); SD: stem diameter (cm); DRM (g): dry root mass; DAPM (g): dry aerial part mass; Chlorophyll A: Chlorophyll A; NL: number of leaves. CONTROL: control group; TS1: teliospores in soil; ES3: sporidia in soil; TRE1: teliospores in newly emerged plants;

ERE3: sporidia in newly emerged plants; TA1: teliospores in aerial part; EA3: sporidia in aerial part.
*Means followed by the same letter do not differ statistically from each other by Tukey's test at 5% probability.

The treatment with sporidia in newly emerged plants resulted in the lowest plant height, with 65% inhibition as compared to the control. Root length was similarly affected in all treatments where the pathogen was inoculated in all phenological stages. Root length in treatment ERE3 was 40.9% lower compared to the control. As for stem diam, except for the treatment with teliospores inoculated in the soil, all other treatments exhibited smaller stem diams, indicating that the fungus was able to infect the sourgrass plants in all three phenological stages tested, resulting in less vigorous plants.

Similarly, the dry root mass weight was reduced in all treatments as compared to the control. The post-emergence treatments (25 DAS) EA3 and TA1 resulted in reductions of root mass of 86.9% and 86.4%, respectively, as compared to the control, representing the lowest dry root mass weights. Although the other treatments did not differ significantly from each other, the treatments on newly emerged plants showed lower inhibition percentages, ERE3 and TRE1, with reductions of 80.9% and 78.7%, respectively, with higher dry root mass weights. The dry aerial part mass (DAPM) showed the highest variability among treatments. Inoculation of sporidia and teliospores on newly emerged plants (ERE3 and TRE1) resulted in reductions of 80.6% and 73.5%, respectively, as compared to the control. This was not significantly different from treatments EA3 and TA1, inoculated at post-emergence (25 DAS), which showed reductions of 64.1% and 63.7%, respectively. TS1 was the treatment that produced the smaller reduction in dry weight of the aerial part of sourgrass (47.5%).

Significant changes were observed in the chlorophyll A index in sourgrass plants treated with sporidia and teliospores in the three phenological stages included in the test. The lowest chlorophyll A index was observed in the pre-emergence treatment TS1, showing a reduction of 73.6% compared to the control. The other treatments (ES3, TRE1, ERE3, TA1, and EA3) did not differ significantly from each other regarding this variable; however, the chlorophyll A index decreased by 54.4%, 53.8%, 56.7%, 56.9%, and 48.6% as compared to the control, respectively. The number of leaves per plant was higher in plants where teliospores were inoculated into the soil (5.35 leaves/plant), not differing from ES3 and TA1 and being higher than the control (Table 3). The treatment with the lowest number of leaves was TRE1 (3.95 leaves/plant).

The simple visual observation of the plants involved in the study showed evident inhibition in the development of the aerial part of *D. insularis* plants in treatments TRE1, ERE3,

and EA3 (Fig. 5), demonstrating that the two fungal structures were capable of infecting plants at different phenological development stages. The infectivity of the two types of *A. panici leucophaei* inocula was confirmed by re-isolating the fungus from pieces of stunted inoculated plants.



Figure 5. *D. insularis* plants 37 days after sowing. Control on the left followed by examples of plants inoculated with *Anthracoystis panici-leucophaei* on the right. Inoculated plants as follows: teliospores in the soil (TS1), sporidia in the soil (ES3), teliospores on 3-4 leaves plants (TA1), sporidia on 3-4 leaves plants (EA3), teliospores on newly emerged plants (TRE1), sporidia on newly emerged plants (ERE3).

3.4.2 Effect of post-emergence inoculation of sporidia and teliospores of *Anthracoystis panici-leucophaei* on *Digitaria insularis*

102 days after sowing (DAS), the panicles had appeared on plants in all treatments. It then was found that the spraying of sporidia from isolate BSV2 produced the most significant reduction in the height of sourrass plants, with an average 40.3% reduction as compared to the control. This was also the only treatment that led to sori formation on inflorescences (Table 4). The other treatments (TRE, BSV1, and BSV1+BSV2) did not differ statistically from the control and did not lead to sori being produced on plants; however, some reduction in plants height was also observed for those.

Table 4 – Effect of *A. panici-leucophaei* sporidia and teliospores on *D. insularis* inoculated in newly emerged plants (2-3 leaves) and evaluated at 102 DAS

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

PH: Plant height (m); RL: Root length (m); SD: Stem diam (cm); NP: Number of tillers; NI: Number of inflorescences; NPC: Number of tillers with smut (sori); DRM (g): dry root mass; DAPM (g): dry aerial part mass; NF: Number of leaves. TEST: Control; TRE: Teliospores on newly emerged plants; BSV1: Sporidia of isolate BSV1 on newly emerged plants; BSV2: Sporidia of isolate BSV2 on newly emerged plants; and BSV1+BSV2: Sporidia from the mixture of the two isolates on newly emerged plants. *Means followed by the same letter do not differ statistically by Tukey's test at 5% probability.

Those results suggest that the isolate BSV2 has better potential for biocontrol of *D. insularis* than BS1 and that their combined use is inadequate.

Either teliospores or sporidia of BSV2 or sporidia of BSV1 reduced the root length of *D. insularis*. with inhibitions of 21.5%, 21.9%, and 23.6% as compared to the control in the TRE, BSV1, and BSV2 treatments, respectively. Only the combined use of BSV1 and BSV2 did not produce a reduction in root length, being significantly similar to the control (Table 4).

Plants in the BSV2 and TRE treatments exhibited the greatest reductions in stem diam, 15.8% and 14.7%, respectively. The BSV1 and BSV1+BSV2 treatments yielded reduced stem diam by 14.0% and 10.2%, respectively.

The number of tillers in the BSV2 treatment was higher than all others, including the control. For the TRE, BSV1, and BSV1+BSV2 treatments, the number of tillers was lowerered by 21.3%, 9.3%, and 8.0%, respectively as compared to average number of tillers in the control. All treatments exhibited a significantly lower number of tillers bearing inflorescence as compared with the control. The treatment involving teliospore applications led to a reduced the number of fertile tillers (78.6% reduction), followed by the BSV2 (64.3% reduction), BSV1

(35.7% reduction) and BSV1+BSV2 35.7% (reduction). It was observed that only plants treated with BSV2 had panicles bearing sori. For those, approximately 68% of the plants had typical active, *A. panici-leucophaei* sori. Such results are interpreted here as an excellent indication of biocontrol potential for BSV2 against sourgrass.

BSV2 treatments reduced the dry root mass of sourgrass plants by 65.8% as compared to the control. On the other hand TRE, BSV1, and BSV1+BSV2 treatments reduced root dry biomass respectively by 41.9%, 31.5%, and 34.5%. Similarly, a significant decrease in the dry aerial part mass of sourgrass plants was observed for all treatments. For BSV2, TRE, BSV1+BSV2, and BSV1 reductions of dry aerial biomass of sourgrass were, respectively of: 51.3%, 44.4%, 43.0%, and 37.2%. BSV2 application produced the greatest reductions of root and aerial dry biomass and also of number of leaves per plant (reduction of 30.6%) as compared to the control.

3.4.3 Comparative virulence of 16 *A. panici-leucophaei* isolates on *Digitaria insularis*

Ninety days after inoculation, all 16 isolates of *A. panici-leucophaei* included in the study had produced sori on at least one of the plants included in the test. Whip-like sori replaced the inflorescences of infected plants. Panicles became covered by a powdery mass of dark teliospores, confirming that all 16 isolates are capable of producing systemic infections on *D. insularis* triggered by sporidial inoculations.

The comparison performed here indicated that isolate 46 was the most virulent under the conditions under which the test was performed. It reduced plants height in 45% as compared to the control (Table 5). Isolates 31, BSV2, and 37-1 also produced significative reductions in plant growth, reducing their average height by 23%, 42%, and 24%, respectively.

Table 5 - Comparative virulence of 16 isolates of *A. panici-leucophaei* to newly emerged plants of *Digitaria insularis*

Treatment	PH	RL	SD	NF	NP
	cm		mm	Leaves plant ⁻¹	tillers planta ⁻¹
3-1	45,13 b*	30,95 c	2,32 b	8.30 a	1.52 b
11-1	41,11 b	30,77 c	1,75 b	4.94 a	0.52 a
15-1	40,62 b	24,96 b	2,01 b	10.60 b	12.52 b

16-1	55,24 c	30,45 c	2,08 b	10,22 b	1,94 b
30	45,29 b	23,35 b	1,76 b	7,00 a	1,08 a
31	34,09 a	25,75 b	¹ 1,1 5 a	7,26 a	0,56 a
36-1	37,86 b	27,94 c	1,90 b	8,52 a	1,92 b
37-1	34,36 a	22,10 b	¹ 1,4 2 a	7,52 a	0,54 a
46	24,72 a	¹ 11,3 6 a	¹ 1,2 1 a	5,12 a	1,72 b
47	40,55 b	29,81 c	1,56 a	8,62 a	1,30 a
49	41,01 b	22,25 b	¹ 1,1 4 a	9,62 b	1,34 a
57	44,29 b	23,43 b	1,84 b	7,34 a	0,84 a
64	39,11 b	29,66 c	1,68 a	7,56 a	1,46 b
65	45,57 b	33,03 c	2,18 b	8,46 a	1,90 b
BSV1	59,61 c	24,41 b	2,21 b	¹ 12,6 6 b	2,28 b
BSV2	26,01 a	29,04 c	1,56 a	6,50 a	1,14 a
Control ¹	44,58 b	29,02 c	2,26 b	6,78 a	1,14 a
CV (%)	26,11	18,21	21,4 7	25,76	45,60
Normality ²	0,99 ^{ns}	0,98 ^{ns}	0,99 ns	0,99 ^{ns}	0,97 ^{ns}
Homogeneity ³	19,55 ns	20,83 ns	0,82 ns	23,92 ns	16,50 ns

* Means followed by different letters in the column differ according to the Scott-Knott grouping test (p <0.05). ¹Treatment differs from the control by the Dunnett test (p <0.05). ²W value of the Normality test of the residuals by the Shapiro-Wilk test (p <0.05). ³Chi-square value of the homogeneity test of variances by the Bartlett test (p <0.05). 4Probability of the homogeneity test of variances by the Levene test for median (p <0.05). ns Not significant. PH - Plant height; RL - Root length; SD - stem diam; NF - number of leaves; NP - number of tillers.

Treatment with isolate 46 reduced the length the roots of *D. insularis* by 61% as compared to the control. Conversely, treatment with isolates 11-1, 16-1, 3-1, 36-1, 65, 64, 47, and BSV2 did not produce significant reductions in root development.

Application of isolates 46, 37-1, 31, and 49 on sourgrass led to the greatest reductions in stem diam: 47%, 38%, 51%, and 50%, respectively.

The number of leaves of sourgrass treated with the smut fungus was significantly reduced by applications of isolates 11-1 (27.13% reduction) and 46 (24.49% reduction) as compared with the control.

Number of tillers in for plants treated with 15-1 was significantly higher than for all other isolates, including the control.

Dry aerial part mass (DAPM) was equivalent to control for two isolates (BSV1 and 64) whereas applications of all other isolates led to reduction of the aerial biomass of sougrass at the following levels ranging from 81% for 46 to 51.42% for 36-1. (Table 6). Dry root biomass was also reduced by application of *A. panici-leucophaei* isolates. Reductions ranged from 57%, for 31 to 39% for isolate 46. Isolate 46 demonstrated the highest reduction in the dry aerial part compared to the control and treatment with isolate 31 showed the highest reduction in dry root mass.

Table 6 – Evaluation of dry aerial part mass (DAPM), dry root mass (DRM), panicles with smut (sori), and panicles with inflorescence on mature *Digitaria insularis* treated with 16 isolates of *Anthracoctis panici-leucophaei*

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

* Means followed by different letters in the column differ significantly according to the Scott-Knott grouping test ($p < 0.05$). ¹Treatment differs from the control by Dunnett's test ($p < 0.05$). ²W value of the Normality test of residuals by the Shapiro-Wilk test ($p < 0.05$). ³Chi-square value of the homogeneity test of variances by Bartlett's test ($p < 0.05$). ⁴Probability of the homogeneity test of variances by Levene's test for median. ns Not significant. DAPM = dry aerial part mass, DRM = dry root mass.

Isolates 49, 64, and 57 formed the largest number of sori per plant. That ability is of interest as it represents a “partial castration” of infected individuals which may lead to reduction in the quantity of sourgrass seeds produced in a field. On the other hand, plants treated with isolates BSV2, 31, 37-1, 46, 11-1, 36-1, 65, 49, and 46 produced fewer inflorescences per plant than non-inoculated plants. Reductions ranged from 64.70% to BSV2 to 14.51% for isolate 46.

Based on all evaluations performed in this work, it appears that isolate 46 is the most virulent among the 16 isolates under evaluation, considering the combination of all features that were evaluated and under the conditions under which the experiment was conducted (Fig. 6).

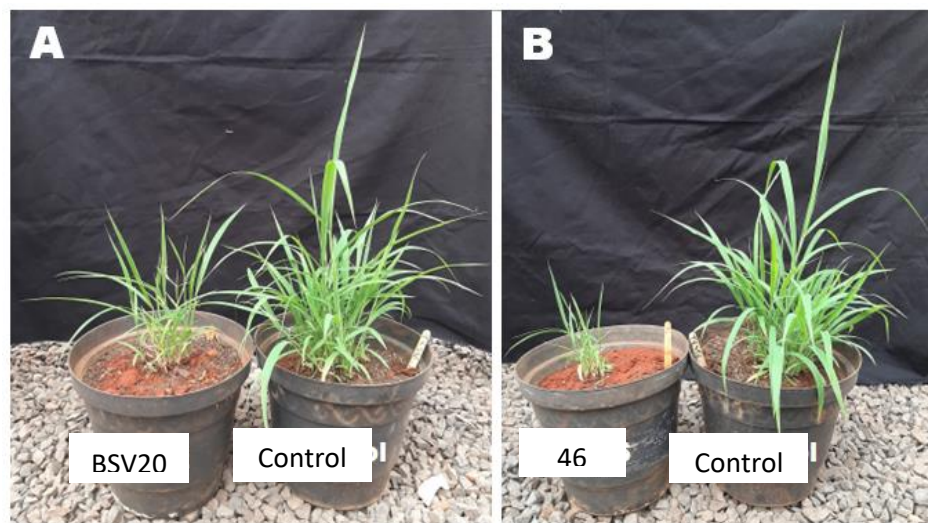


Figure 6. Examples of impact of isolates of *A. panici-leucophaei* on sourgrass growth 90 days after sowing 80 days after inoculation with sporidial suspension on one pair of leaves-plants (A) Sourgrass plants inoculated with isolate BSV2; (B) Sourgrass plants inoculated with isolate 46.

3.4.4 Preliminary evaluation of specificity of *A. panici-leucophaei* to sourgrass

None of the 21 species of the Poaceae family developed disease symptoms after inoculated with one representative isolate of *A. panici-leucophaei* (BSV2) (Fig. 7). Thus, *A. panici-leucophaei* has preliminarily shown to be host-specific and limited to infect and complete its cycle on *D. insularis*. which is a relevant characteristic in a biocontrol agent, as it demonstrates its ability to control only the target specie without affecting other crops.

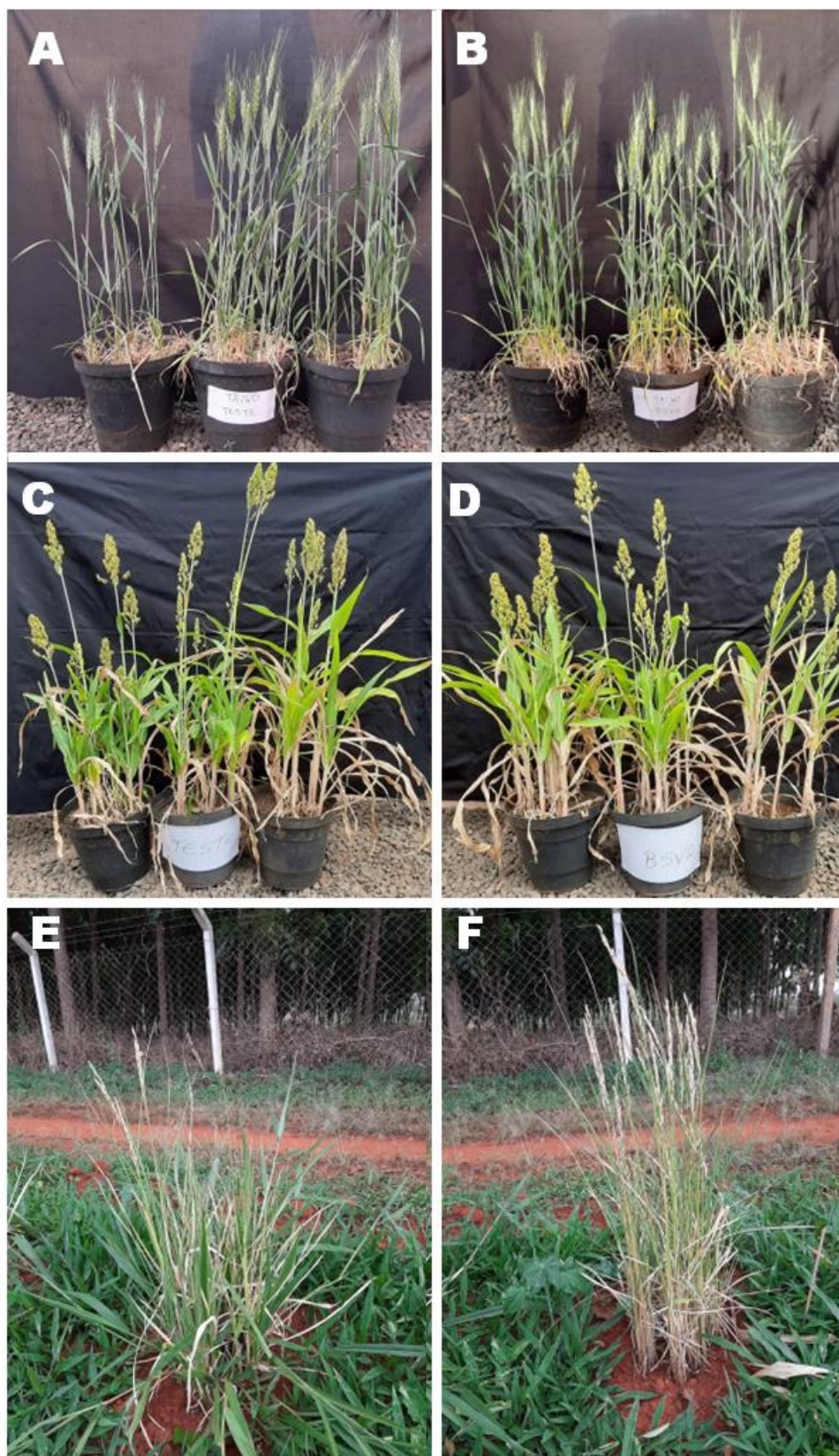


Figura 7 - Host-specificity evaluation of *A. panici-leucophaei*. Treated plants appearance 90 days-old, 60 days after inoculation. (A) Non-inoculated (control) wheat; (B) Wheat plants inoculated with the smut fungus; (C) Sorghum - control; (D) Sorghum inocu

4. Discussion

The adaptation of sourgrass to various environmental conditions and the increasing occurrence of weed populations that are resistant to glyphosate and ACCase-inhibitor herbicides in different agricultural areas in Brazil is a major cause of concern for farmers (Lopes-Ovejero et al., 2017). As this plant has rapid seed and rhizome production, it is recommended that its management should be carried out within 35 days after emergence (Correia; Durigan, 2009; Machado et al., 2006).

Anthracocystis panici-leucophaei (= *Ustilago panici-leucophaei*) was described in *Digitaria insularis* (= *Panicum leucophaeum*), in Rio de Janeiro, Brazil, by Brefeld in 1895. Recently, RWB briefly attempted to recollect material from Rio de Janeiro, but without success. The continuation of the search for material from Rio de Janeiro is justifiable since a neotype still needs to be designated since Brefeld's type material no longer exists in the Hamburg herbarium (HBG).

The morphological features of isolates BSV1 and BSV2, chosen as examples of the population of the smut fungus on sourgrass in the state of Minas Gerais, were very close to those described for *Anthracocystis panici-leucophaei* by Vánky (2004), Cunningham et al. (2005), and Piatek (2006). *Anthracocystis panici-leucophaei* was reported as a pathogen of *Digitaria ammophila*, *D. breviglumis*, and *D. brownii* in Australia, in *D. insularis* in Cuba and Brazil, *Echinochloa polystachya* in Argentina, *Oplismenopsis najada* in Paraguay, *Paspalum saccharoides* in Colombia, *Triachne californica* in Cuba and the United States, *Triachne insularis* in Cuba, the Dominican Republic, and the United States, and *Trichachne insularis* in Brazil and Colombia (Farr and Rossman, 2022).

The genus *Anthracocystis* has undergone numerous changes over the years. Many species previously belonging to other genera have been included in the group, as a result of imprecise or developing taxonomy for smut-causing fungi. Many revisions have been made in an attempt to clarify the phylogenetic position of these fungi (Cunnington et al., 2005; McTaggart et al., 2012; Piatek et al., 2015; Stoll et al. 2003). Interestingly, McTaggart et al. (2012) when promoting the recombination of *Sporisorium panici-leucophaei* to *A. panici-leucophaei* did not include isolates from the type locality in their phylogenetic analysis. Despite this, our isolates collected in Brazil grouped with the others, corroborating the results that *S. panici-leucophaei* indeed fits well in *Anthracocystis*.

Information about the life cycle of this fungus is lacking. Therefore, issues of great practical relevance for its use as a biocontrol agent were unknown. Issues such as the

requirement of different mating types and heterokaryosis before infection, susceptible host stage among others are only now being elucidated. Its resemblance to *Sporisorium scitamineum*, would suggest an equivalent biology. The sugarcane smut fungus presents three different morphological phases, namely, yeast-like haploid sporidia, dicaryotic hyphae, and diploid teliospores (Benevenuto et al., 2016). Under optimal environmental conditions, teliospores germinate, undergo meiosis, and produce haploid sporidia that grow in culture medium like yeast cells. According to Alexandre and Srinivasan (1966), infection in the host occurs when there is a combination of two haploid sporidia of opposite mating types, forming infective dicaryotic hyphae. In the present work, both inoculations with the mixture of isolates BSV1 and BSV2 and inoculations with isolates separately resulted in systemic infection in *D. insularis* plants, resulting in plants forming sori with teliospores. It appears that *A. panici-leucophaei* is homothallic or has a form of mating-type system that allows single sporidial colonies to remain infective. This renders its manipulation and use simpler under the biocontrol perspective.

The potential for infection of teliospores and sporidia of smut-causing fungi studied for use in biological control has been studied for various target-weeds worldwide. Some notable examples are *Sporisorium ophiuri* for the control of *Rottboellia cochinchinensis* (Smith et al., 1997); *Sphacelotheca holci* for the control of *Sorghum halepense* (Massio and Lindow, 1986); *Sporisorium cruentum* for the control of *Sorghum halepense* (Millhollon, 2000; Gassó et al., 2017).

Millhollon (2000) evaluated the effect of inoculating teliospores of *Sporisorium cruentum* injected into *Sorghum halepense* seedlings from 14 to 21 days after sowing (DAS), in contrast with teliospore spraying on plants 45 to 90 cm tall, at the initial flowering stage, along with the interference of the weed on the yield of *Saccharum* sp. hybrids. *S. halepense* seedlings injected with *S. cruentum* teliospores showed 98% disease incidence in the first year of cropping and cane production was of 57,000 kg ha⁻¹, whereas cane production in areas infested with *S. halepense* but not treated with the smut was of 37,000 kg ha⁻¹. The average of infected *S. halepense* plants in areas sprayed with teliospore suspension was of only 54%, with a smaller gain in cane production (yield of approximately 52,000 kg ha⁻¹).

Systemic infection of *A. panici-leucophaei* in sourgrass was shown here to drastically inhibit physiological growth parameters of this weed. Particularly when the pathogen is inoculated in newly emerged plants. This potentially provides a competitive advantage for the plantations in field conditions. In a real-field condition, spraying sourgrass with *A. panici-*

leucophaei sporidia in post-emergence between crop rows aiming at reducing the vigor of sourgrass individuals may be sufficient to contain the damage caused by this troublesome weed.

Additionally, *A. panici-leucophaei* infection considerably reduces the formation of panicles in sourgrass plants and may substitute the reproductive structures of infected plants with sori, partly castrating such plants. It is evident that *A. panici-leucophaei* infection reduces seed production in previously inoculated sourgrass plants. *Digitaria insularis* has a high seed production covered in dense pilosity with high germination power which can be dispersed over long distances by wind, practically year-round. Sourgrass is very prolific, as under normal conditions it produces up to 40,000 seeds/plant/year (Takano et al., 2020). Additionally, these seeds can germinate over a wide range of temperature and light intensity, significantly increasing species dissemination (Mendonça et al., 2014). The reduction in seed production is highly desirable for any method of weed control, particularly in the case of *D. insularis*. It can be conjectured that repeated applications of *A. panici-leucophaei* in an infested area will progressively decrease the sourgrass seed bank in the medium to long run.

A significant reduction in the aerial part of sourgrass plants was obtained after the inoculation of *A. panici-leucophaei* sporidia in newly emerged plants, including percentages of aerial plant inhibition greater than that obtained with applications of chemical herbicides (Coradin et al., 2019). For example, inoculation of sporidia in newly emerged sourgrass plants resulted in an over 80% reduction in dry aerial part mass compared to non-inoculated plants. Coradin et al. (2019), evaluated the dry mass of aerial part sourgrass plants subjected to pre-emergence herbicide application and found that the herbicide diclosulam, at the recommended dose reduced the dry aerial part mass of plants by 58.3% compared to the control, in plants evaluated at 28 days after emergence (DAE). We acknowledge that the comparison between the fungus and the chemical herbicide is tenuous. Nevertheless, it preliminary indicates that *A. panici-leucophaei* may become a viable active ingredient for a mycoherbicide in the future.

In the present study, root length in the ERE3 treatment (direct application of a mixed sporidial suspension (BSV1 + BSV2) on one pair of leaves-plants (newly emerged sourgrass plants) was over 40.0% less than in the control, indicating that sporidia were infective to the aerial part of sourgrass plants and that the inoculation targeting the aboveground plant parts have an indirect impact on below ground plant parts, inhibiting root development.

Massion and Lindow (1986) showed that one of the effects of *Sphacelotheca holci* infection on the morphology of the weed plant *Sorghum halepense* was a reduction in aerial part and rhizome length by 28.8% and 44.5%, respectively. Gassó et al. (2017) showed that there was a 50% reduction in the dry mass of *S. halepense* rhizomes from plants inoculated with

S. cruentum teliospores, while for sporidia the reduction was 43.6% for rhizome dry mass weight.

Johnson and Baudoin (1997) conducted greenhouse experiments to evaluate the potential of the fungus *Ustilago syntherismae* as a biological control agent for *Digitaria ciliaris*. It was evaluated the incidence of infected plants, sown 1 cm deep, inoculated with *U. syntherismae* teliospores, sown between 0 to 22 days before application (DAA). The highest percentage of infected plants occurred when inoculation was performed on the same day as sowing, at three inoculum concentrations (3.6×10^7 , 7.0×10^6 , and 1.8×10^6 teliospores mL⁻¹), approximately 86%, 81.5%, and 57% incidence, respectively. When *D. ciliaris* sowing was made between 7 to 22 DAA, there was a reduction in the number of infected plants. This reveals that the phenological stage of the plants can interfere with the fungus's infection capacity in the target plant.

Massion and Lindow (1986) evaluated the effect of *Sphacelotheca holci* infection on the morphology and competitiveness of *Sorghum halepense*. They found that smut infection reduced the aerial dry biomass as well as root, and rhizome length by 28.8%, 49.0%, and 44.5%, respectively, compared to non-inoculated plants. Non-infected plants were noticeably more vigorous. When in direct competition with corn smut infected target-weeds had their development diminished dramatically. Aerial dry biomass suffered a reduction of 68.3%, root length was 76.5% lower than control and rhizome length was reduced by 81.9%.

Millhollon (2000) evaluated the potential of teliospores and sporidia of *Sporisorium cruentum* for the biocontrol of *Sorghum halepense*, demonstrating infection superior to 90% of plants over a period of three years in pot experiments and with greater variability in the field experiment, in the periods of 1997 and 1998, 40% and 88%, respectively, for teliospores and 62% and 71%, respectively, for sporidia.

Gassó et al. (2017) evaluated the effect of inoculating a suspension of teliospores and sporidia of the fungus *Sporisorium cruentum*, in *Sorghum halepense* rhizomes, and found a reduction in the dry matter of the aerial part of the plants by 69.2% and 67.3%, respectively. The same authors observed a reduction in the height of *Sorghum halepense* plants infected by *Sporisorium cruentum*, compared to the control, which subsequently resulted in a lower aboveground dry matter weight. It is surprising that such results did not lead to the development of a commercial product, considering that the target-weed, *Sorghum halepense*, is often listed as one of the world's worst weeds.

Field tests such as that described by Massion and Lindow (1986) are still pending for the pathosystem under investigation here, but it is expected that the performance of *A. panic-*

leucophaei as a biocontrol of sourgrass will be significantly improved in a crop-competition situation.

Management methods that decrease the initial development of weeds contribute to postponing future post-emergence herbicide applications, as well as promoting more favorable conditions for economically important crops such as soybeans and corn to close the canopy which can reduce losses in productivity due to weed competition. The discovery of potential control agents and the development of herbicides based on natural products are of socially and environmentally desirable (Gomes et al., 2013). Mycoherbicides have been on-hold for several decades but now, stimulated by the increasing agronomic interest for alternatives which may allow controlling weeds resistant to chemical herbicides while reducing the environmental impact of such pesticides, the tide may be changing (Galon et al., 2016).

It can be inferred that isolates of *A. panici-leucophaei* have high inhibition potential and the infection of this fungus in newly emerged seedlings interfering negatively with the growth of sourgrass plants.

Timing of inoculation may be critical for the establishment of smut infections. Publications such as Fischer and Holton (1957), focused on smuts as crop problems have emphasized the importance of inoculation of crop plants, during experiments on smut diseases, being performed in the early phenological stages of the plants (particularly cereals), since this is commonly the period when they are susceptible to infection by smut fungi. Our smut fungus *A. panici-leucophaei* is seemingly easier to manipulate. Both teliospores and sporidia can act as infective units, mainly in newly emerged sourgrass plants). In another pathosystem Johnson and Baudoin (1997), had a high incidence of smut, caused by the fungus *Ustilago syntherismae*, on *Digitaria ciliaris* only when the period between sowing of the weed and inoculation did not exceed four days and the planting depth was not more than 1.0 cm. Further studies are still needed to better clarify the limitations of *A. panici-leucophaei* as a biocontrol agent against sourgrass, but, under our controlled conditions experiments such limitations are yet to appear.

Another physiological parameter evaluated in the present work was the number of tillers in sourgrass plants. For example, the number of tillers in the treatment with the BSV2 was higher than in all other treatments, including in control. The production of multiple tillers, 32 days after inoculation, may characterize an abnormality caused by the infection of *A. panici-leucophaei*, which subsequently resulted in small panicles with sori. Fungi causing smut symptoms can induce, in addition to the presence of sori, dwarfing of plants, excessive tillering, and, more rarely, plant death (Kimati et al., 1997). Gassó et al. (2017) showed that *Sorghum halepense* plants in the reproductive phase, 18 to 25 days after inoculation with *Sporisorium*

cruentum, produced multiple tillers (between 3 to 7 tillers) originating from a common node, which gave rise to small infected or sterile panicles, a typical abnormality of *S. cruentum* infection. Such additional tillers are not in itself a negative result for future management of sourgrass in the field, particularly if the overall size of the plants is reduced while the plant spends its reserves producing supplementary tillers. We can envisage such plants as being less competitive with the invaded crop reducing the losses caused by the weed.

Studies leading to the development of mycoherbicides commonly include, as one of the stages, the selection of fungal isolates with high aggressiveness (Auld, 1997), and the selected isolate should lead to high disease severity in most, if not all, population of target weed plants. Thus, the search for isolates with a higher virulence level is very important. High virulence is a fundamental characteristic of an effective biological control agent (Charudattan, 2010; Zhang and Watson, 1997). Isolate 46 of *A. panici-leucophaei* was the most aggressive among the isolates tested. New trials should be conducted in field conditions and in micro-plots involving a formulated mycoherbicide prototype containing sporidia of *A. panici-leucophaei* (isolate 46) to verify whether the promising impact results on *D. insularis*, obtained under controlled conditions, are confirmed.

Smut-causing fungi are generally regarded as examples of pathogens having high levels of host-specificity, similarly to the Pucciniales (rust fungi) (Kimati et al., 1997). In addition to the performance of *A. panici-leucophaei* in the field, it is essential to further evaluate its specificity. Johnson and Baudoin (1997) emphasized that before a pathogen is used as a biological control agent, the range of hosts must be investigated in detail to determine the risk to non-target plants. None of the 21 species of the Poaceae, included in our study became diseased after being inoculated with *A. panici-leucophaei*. Only sourgrass became infected after inoculated with *A. panici-leucophaei*. Millhollon (2000), in his studies on the host range of *Sporisorium cruentum*, inoculated teliospores into various *Sorghum bicolor* genotypes to check if they were susceptible to the smut fungus under evaluation for the biocontrol of *S. halepense*. Seventeen sorghum genotypes tested were not susceptible, and two genotypes were susceptible. The closeness of *S. halepense* to cultivated species of sorghum complicated this particular study, a matter of less relevance for the case of *D. insularis*. In the case of our study, there is little room for conflicts of interest, even if it is proven that *A. panici-leucophaei* infects other species of *Digitaria*. The fungus is a native from Brazil and occurs freely in nature and there are no issues related to its introduction as an exotic biocontrol agent. Impact on some other weedy species of *Digitaria* spp., in case it occurs, would be a bonus for weed management. There is a need to further expand the study involving mainly other grasses and also conducting

indirect isolations to verify any internal colonization of tissues from other plants, even if without damage to the host plant.

The experiments conducted so far have demonstrated that *A. panici-leucophaei* has potential as a biological control agent for *D. insularis*. Definitions of commercial doses, spray volume, adjuvants, prototype formulation, fungus performance under field conditions, compatibility with chemical herbicides, mass production of the fungus, and shelf-life tests should be conducted to confirm the real potential of *A. panici-leucophaei* as a biocontrol agent for sourgrass.

5. Conclusions

The smut fungus found in the field attacking *D. insularis* was taxonomically identified as *Anthracoctystis panici-leucophaei*.

Both teliospores and sporidia of *A. panici-leucophaei* are infective to *D. insularis*.

Infection by *A. panici-leucophaei* inhibit the growth of sourgrass.

The phenological stage of *D. insularis* influences its sensitivity to the fungus, as known for other smut diseases. Newly emerged plants, with one pair of leaves, are more sensitive to *Anthracoctystis panici-leucophaei*.

The fungus reduces physiological growth parameters of sourgrass plants up to 102 days after sowing.

The fungus produces systematic infection of sourgrass plants and may induce the formation of sori in a significant proportion of the plant panicles, partly castrating those plants - significantly reducing the seed production.

Isolate 46 was the most virulent and inhibited the growth of sourgrass plants and seems to have good potential as a biological control agent to be deployed against sourgrass.

The fungus *A. panici-leucophaei* was preliminarily demonstrated to be specific to *D. insularis*.

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

Ethical declarations

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Author contributions

A.P. Souza: Conceptualization; Data curation; Investigation; Methodology; Validation; Writing - original draft; and Writing - review & editing. **J.F. Alves:** Conceptualization; Data curation; Investigation; Methodology; Validation; Writing - original draft; and Writing - review & editing. **E.M. Inokuti:** Conceptualization; Data curation; Investigation; Methodology; Roles/Writing - original draft; and Writing - review & editing. **F. Garcia:** Methodology; Validation; Investigation; and Writing - review & editing. **B.W. Ferreira:** Conceptualization, Methodology; Investigation; Roles/Writing - original draft; and Writing - review & editing. **T.F. Nobrega:** Conceptualization; Investigation; Roles/Writing - original draft; and Writing - review & editing. **C.C. Moreira:** Roles/Writing - original draft; and Writing - review & editing. **R.W. Barreto:** Funding acquisition; Supervision; and Writing - review & editing. **B.S. Vieira:** Funding acquisition; Project administration; Supervision; Roles/Writing - original draft; and Writing - review & editing

6. References

- Alexander, K.; Srinivasan, K. Sexuality in *Ustilago scitaminea* Syd. **Current Science**, v. 35, n. 23, p. 603-604, 1966 *apud* BENEVENUTO, Juliana et al. Molecular variability and genetic relationship among Brazilian strains of the sugarcane smut fungus. **Microbiology Letters**, v. 363, n. 24, p. fnw277, 2016. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw277>
- Auld, B.A., 1997. Bioherbicides. In: M. Julien and G. White (ed.), Biological Control of Weeds: Theory and Practical Application. ACIAR Monograph no. 49, Australia. pp. 129–134.
- Banuett, F.; Herskowitz, I. Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 15, p. 5878-5882, 1989. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.86.15.5878>
- Benevenuto, J., Longatto, D. P., Reis, G. V., Mielnichuk, N., Palhares, A. C., Carvalho, G., Saito, S., Quecine, M. C., Sanguino, A., Vieira, M. L. C., Camargo, L. E. A., Creste, S., Vitorello, C. B. M. Molecular variability and genetic relationship among Brazilian strains of the sugarcane smut fungus. **Microbiology Letters**, v. 363, n. 24, p. fnw277, 2016. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw277>
- Brefeld, O. 1895. Hemibasidii. Brandpilze III. Cultur der Brandpilzen in Nährlösungen. Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie. 12:99-236

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

Charudattan, R.. Biological control of weeds by means of plant pathogens: significance for integrated weed management in modern agro-ecology. **BioControl**, v. 46, n. 2, p. 229-260, 2001. <https://doi.org/10.1023/A:1011477531101>

Cimmino, A. Masi, M., Evidente, M., Superchi, S. Evidente, A. Fungal phytotoxins with potential herbicidal activity: chemical and biological characterization. **Natural product reports**, v. 32, n. 12, p. 1629-1653, 2015. <https://doi.org/10.1039/C5NP00081E>

Coradin, J., Braz, G. B. P., Machado, F. G., Silva, A. G., Sousa, J. V. A. Herbicidas aplicados em pré-emergência para o Controle de milho voluntário e capim-amargoso. **Revista Científica Rural**, v. 21, n. 3, p. 51-64, 2019. <https://doi.org/10.30945/rcr-v21i3.2785>

Correia N. M.; Durigan, J. C. Manejo químico de plantas adultas de *Digitaria insularis* com glyphosate isolado e em misturas com chlorimuronethyl ou quizalofop-p tefuril em área de plantio direto. *Bragantia*, v. 68, n. 3, p. 689-697, 2009.

Cunnington, J. H.; Vánky, K.; Shivas, R. G. *Lundquistia* is a synonym of *Sporisorium* (Ustilaginomycetes). **Mycologia Balcanica**, v. 2, p. 95-100, 2005.

Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., Posada, D., jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature methods**, v. 9, n. 8, p. 772-772, 2012. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>

Farr, D.F., Rossman, A.Y. Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Retrieved January 4, 2022. Disponível em: <https://nt.ars-grin.gov/fungalDATABASES/>

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

Fischer, G. W., Holton, C. S. Biology and control of the smut fungi. **Biology and control of the smut fungi**, 1957 *apud* JOHNSON, D. A.; BAUDOUIN, A. B.. Mode of infection and factors affecting disease incidence of loose smut of crabgrass. **Biological Control**, v. 10, n. 2, p. 92-97, 1997. <https://doi.org/10.1006/bcon.1997.0555>

Galon, L., Mossi, A. J., Junior, F. W. R., Reik, G. G., Treichel, H., Forte, C. T. Biological weed management-a short review. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 15, n. 1, p. 116-125, 2016. <https://doi.org/10.7824/rbh.v15i1.452>

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

Gemelli, A., Junior, R. S. O., Constantin, J., Braz, G. B. P., Jumes, T. M. C., Neto, A. M. O. Dan, H. A. Biffe, D. F. Aspectos da biologia de *Digitaria insularis* resistente ao glyphosate e

implicações para o seu controle. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 11, n. 2, p. 231-240, 2012. <https://doi.org/10.7824/rbh.v11i2.186>

Gomes, F.M., Fortes, A. M. T., Silva, J., Bonamigo, T., Pinto, T. T. Efeito Alelopático da Fitomassa de *Lipinus angustifolius* (L.) sobre a germinação e o desenvolvimento inicial de *Zea mays* (L.) e *Bidens pilosa* (L.). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 8, n. 1, p. 48-56, 2013.

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

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>>.

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

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

Kimati, L.H. Filho, A. B., Camargo, L.E.A., Rezende, J. A. M (ed). **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995-1997, 1997. 2v., il.

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

Klaic, R., Kuhn, R. C., Foletto, E. L., Prá, V. D., Jacques, R. J. S., Guedes, J. V.C., Treichel, H., Mossi, A. J., Oliveira, D., Oliveira, J. V., Jahn, S. L., Mazutti, M. A. An overview regarding bioherbicide and their production methods by fermentation. **Fungal Biomolecules**. 1ed.: John Wiley & Sons, Ltda, p. 183-199, 2015. <https://doi.org/10.1002/9781118958308.ch14>

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular biology and evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547, 2018. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

Lopes-Ovejero, R. F. L., Takano, H. K., Nicolai, M., Ferreira, A. Melo, M. S. C., Cavenaghi, A. L., Christoffoleti, P. J., Oliveira, R. S. Frequency and dispersal of glyphosate-resistant sourgrass (*Digitaria insularis*) populations across Brazilian agricultural production areas. **Weed Science**, v. 65, n. 2, p. 285-294, 2017. <https://doi.org/10.1017/wsc.2016.31>

Machado, A.F.L., Ferreira, L.R., Ferreira, F. A., Fialho, C. M. T., Santos, L. D. T., Machado, M. S. Análise de crescimento de *Digitaria insularis*. **Planta Daninha**, v. 24, p. 641-647. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-83582006000400004>

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

Mctaggart, A. R., Shivas, R. G., Geering, A. D. W., Callaghan, B., Vánky, K., Scharaschkin, T. Soral synapomorphies are significant for the systematics of the Ustilago-Sporisorium-Macalpinomyces complex (Ustilaginaceae). **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 29, n. 1, p. 63-77, 2012. <https://doi.org/10.3767/003158512X660562>

Mendonça, G. S., 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. <https://doi.org/10.1590/S1806-66902014000400021>

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

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

Mondo, V. H. V., Carvalho, S. J. P., Dias, A. C. R., Filho, J. M. Efeitos da luz e temperatura na germinação de sementes de quatro espécies de plantas daninhas do gênero *Digitaria*. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, p. 131-137, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222010000100015>

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

Peterson, M. A., Collavo, A., Ovejero, R., Shivrain, V., Walsh, M. J. The challenge of herbicide resistance around the world: a current summary. **Pest management science**, v. 74, n. 10, p. 2246-2259, 2018. <https://doi.org/10.1002/ps.4821>

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

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

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

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

Santiago, R., Alarcón, B., Armas, R., Vicente, C., Legaz, M. E. Changes in cinnamyl alcohol dehydrogenase activities from sugarcane cultivars inoculated with *Sporisorium scitamineum*

sporidia. **Physiologia Plantarum**, v. 145, n. 2, p. 245-259, 2012.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01577.x>

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

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

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

Takano, H. K., Melo, M. S. C., Ovejero, R. F. L., Westra, P. H., Gaines, T. A., Dayan, F. E. Trp2027Cys mutation evolves in *Digitaria insularis* with cross-resistance to ACCase inhibitors. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 164, p. 1-6, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.12.011>

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

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

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

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