



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo.
ISBN 978-85-7029-135-6

PATOGENICIDADE DA MICOBIOTA DE *Ipomoea* spp. PARA PROSPECÇÃO DE MICO-HERBICIDA

Thaís Helena Ferreira dos **Santos**¹; Bernardo de Almeida **Halfeld-Vieira**²; Marta Camargo de **Assis**³; Kátia de Lima **Nechet**⁴

Nº 16411

RESUMO - Esse trabalho teve como objetivo identificar isolados patogênicos da micobiota associada à *Ipomoea* spp. para prospecção de um mico-herbicida para o controle das principais espécies invasoras de corda-de-violão no Brasil. Plantas naturalmente infectadas foram coletadas em áreas de ocorrência da invasora no estado de São Paulo. As espécies botânicas e os gêneros fúngicos associados aos sintomas observados foram identificados através de chaves taxonômicas específicas. A obtenção de colônias dos fungos identificados foi feita por isolamento em meio de cultura. Os isolados obtidos foram inoculados na concentração de 2×10^5 conídios/ml em *Ipomoea* nil, *I. grandifolia*, *I. hederifolia* e *I. quamoclit* e mantidos em casa-de-vegetação para avaliação de incidência de doença por 30 dias. Doze isolados foram obtidos, sendo seis pertencentes ao gênero *Cercospora*, três ao gênero *Bipolaris*, dois ao gênero *Alternaria* e um ao gênero *Colletotrichum*. Observou-se uma variação no resultado do teste de patogenicidade dos isolados nas diferentes espécies de *Ipomoea* spp. Nenhum isolado de *Bipolaris* sp. foi patogênico às espécies testadas. O isolado de *Colletotrichum* sp. foi patogênico apenas à *I. nil*. Um isolado de *Alternaria* sp., patogênico a *I. nil*, *I. hederifolia* e *I. quamoclit*, e três isolados de *Cercospora* sp., patogênicos a *I. nil*, *I. hederifolia* e *I. grandifolia*, foram selecionados como promissores para estudos de desenvolvimento de um mico-herbicida. Os principais sintomas observados nas plantas inoculadas foram amarelecimento de folhas causado por *Alternaria* sp. e manchas foliares seguida de amarelecimento e desfolha causada por *Cercospora* sp.

Palavras-chaves: Planta daninha, corda-de-violão, controle biológico, fungos fitopatogênicos.

¹ Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Engenharia Ambiental e Sanitária, PUCC, Campinas-SP; thais.helenna@gmail.com

² Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; bernardo.halfeld@embrapa.br

³ Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; marta.assis@embrapa.br

⁴ Orientador: Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; katia.nechet@embrapa.com



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo.
ISBN 978-85-7029-135-6

ABSTRACT- *The aim of this work was to identify pathogenic isolates from Ipomoea spp. mycobiota in order to prospect a mycoherbicide to control the most significant species of invasive morning glories in Brazil. Naturally infected plants were collected in areas of occurrence of this weed in São Paulo. The botanical species and genera of fungi associated to symptomatic plants were identified through the use of specific taxonomic keys. The colonies of all identified fungi were obtained by isolation procedures on culture media. The isolates were inoculated at an inoculum concentration of 2×10^5 conidia/ml on Ipomoea nil, I. grandifolia, I. hederifolia and I. quamoclit. After that, the plants were kept under greenhouse conditions and evaluation of disease incidence was carried out on a weekly basis for 30 days. Twelve fungi isolates were obtained, six of them were identified as Cercospora sp., three as Bipolaris sp., two as Alternaria sp. and one as Colletotrichum sp.. There was a great variation on the pathogenicity of fungi isolates on Ipomoea species. The Bipolaris sp. isolates were not pathogenic to the Ipomoea species tested. The Colletotrichum sp. isolate was pathogenic only to I. nil. One isolate of Alternaria sp., pathogenic to I. nil, I. hederifolia and I. quamoclit, and three isolates of Cercospora sp., pathogenic to I. nil, I. hederifolia and I. grandifolia, were selected as potential to a mycoherbicide development studies. The main symptoms observed on inoculated plants were yellowing leaves caused by Alternaria sp. and leaf spots turning yellow followed by defoliation caused by Cercospora sp.*

Key-words: weed, morning glory, biological control, phytopathogenic fungi.

1 INTRODUÇÃO

As plantas daninhas interferem negativamente nos sistemas agrícolas, causando prejuízos à produção das culturas em função da competição por água, luz, nutrientes e espaço com as culturas e em alguns casos são hospedeiras de pragas e doenças que atacam as plantas cultivadas (Lorenzi, 2000). O principal método de controle utilizado no seu manejo em grandes culturas é o uso de herbicidas químicos. No Brasil, o volume comercializado de herbicidas em 2013 foi em torno de 303 mil toneladas, o que representou 61% de todo o volume de ingredientes ativos de defensivos agrícolas comercializado no país (Ibama, 2013).

Apesar do sucesso da aplicação deste método de manejo em áreas extensas do Brasil e do mundo, o controle químico de plantas daninhas enfrenta problemas e limitações em várias frentes. A evolução da população de plantas daninhas resistentes aos herbicidas é um problema crescente



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo.
ISBN 978-85-7029-135-6

(Vencill et al., 2012). Além disso, há uma pressão pela redução do impacto ambiental e social da atividade agrícola em toda a cadeia produtiva.

Um exemplo desta tendência é observado na agroindústria canavieira paulista. A queimada em canaviais no estado de São Paulo está sendo proibida com restrições legais e progressivas até 2021 para áreas com possibilidade de mecanização e até 2031 para todas as demais áreas (Decreto no 47.700 de 11/3/2003, que regulamenta a Lei no 11.241 de 19/9/2002) (Timossi e Durigan, 2006). Assim em áreas sem queima prévia (cana-crua) permanece uma camada de palha no solo que favorece a seleção de espécies com sementes grandes e capacidade de germinar sob a camada de palha, com destaque para espécies *Ipomoea hederifolia*, *I. quamoclit* e *I. grandifolia* (Monquero et al., 2008; Monquero et al., 2011).

Essas plantas tem hábito de crescimento trepador e apresentam ciclo biológico longo, o que as torna importante não só pela competição imposta no início da cultura, mas também durante a colheita, pois seus ramos se fixam aos colmos (Lorenzi, 2000). A palha, presente em áreas com manejo sem queimada, diminui a eficácia de herbicidas pré-emergentes (Monquero *et al.*, 2009; Silva e Monquero, 2013) e os herbicidas pós-emergentes apresentam baixa eficácia, pois nem sempre é possível atingir todas as plântulas nos estádios recomendados em função do fluxo de emergência em diferentes períodos (Pizzo et al., 2010). Mesmo em condição de baixo escape, os indivíduos sobreviventes podem ser suficientes para causar danos expressivos na colheita (Correia e Kronka, 2010). As cordas-de-viola são particularmente problemáticas nestas condições, e qualquer que seja a técnica ou conjunto de técnicas empregadas no seu manejo, é de se considerar que se trata de uma espécie de difícil controle e reconhecida como um alvo potencial para novas formas de manejo.

Dentre as possibilidades a serem exploradas, destaca-se o controle biológico pelo método inundativo ou de mico-herbicida, que envolve o uso de fungos fitopatogênicos endêmicos que possam ser produzidos em massa, formulados e aplicados de modo semelhante a um herbicida químico onde a população da planta invasora está estabelecida (Auld, 1997). Vários trabalhos na literatura demonstram a potencialidade de fitopatógenos como mico-herbicidas (Hallett, 2005), porém não há nenhum estudo anterior de trabalho investigativo sobre o controle alternativo de plantas do “complexo cordas-de-viola” (*Ipomoea* spp.).

O primeiro passo no desenvolvimento de um mico-herbicida envolve a descoberta e identificação de fungos fitopatogênicos associados a cada planta-alvo, seguido de uma avaliação do potencial de cada espécie de fungo como agente de controle biológico (Ash, 2010). Assim, o



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo.
ISBN 978-85-7029-135-6

objetivo desse trabalho foi identificar isolados patogênicos da microbiota associada à *Ipomoea* spp. para prospecção de um mico-herbicida para o controle das principais espécies invasoras de corda-de-violão no Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Plantas de *Ipomoea* spp. naturalmente infectadas, foram coletadas em áreas de ocorrência da invasora no estado de São Paulo, durante os anos de 2014 e 2015. As exsiccatas de *Ipomoea* spp. foram identificadas e o material sintomático coletado foi observado em microscópio estereoscópico e ótico para identificação dos gêneros fúngicos através de chaves taxonômicas específicas (Carmichael et al., 1980; Sutton, 1980).

2.1 Isolamento da microbiota

A partir do material com sintoma associado à doença fúngica foi feito o isolamento direto e indireto para obtenção de culturas puras. O isolamento direto consistiu na transferência da estrutura do fungo para placas de Petri contendo meio de cultura de Batata dextrose agar (BDA). No isolamento indireto, fragmentos de lesão foram imersos em uma solução de álcool 75% por 1 minuto, transferidos para hipoclorito de sódio 2% por 3 minutos, lavados em água destilada esterilizada e secos em papel de filtro esterilizado. Após esse processo, os fragmentos foram depositados em placas de Petri contendo meio BDA. As placas de ambos os tipos de isolamento foram mantidas em incubadora com fotoperíodo de 12 horas, a 25°C até a visualização de crescimento micelial. As colônias com características do fungo associado foram preservadas pelo método Castellani (Castellani, 1967).

2.2 Produção de inóculo

A produção de inóculo dos fungos identificados foi feita em crescimento em meio agarizado e através da técnica de fermentação difásica adaptada de Walker (1980) que envolve a etapa de fermentação líquida seguida de crescimento em meio agarizado. Na etapa de fermentação líquida os isolados foram depositados em erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido de extrato de malte e levedura (YM) e colocados em incubadora tipo Shaker com velocidade de 150 rpm a 25°C. Após 10 dias o micélio obtido foi triturado, utilizando um homogeneizador de tecidos celulares, e em seguida a suspensão de micélio triturado foi vertida em placas de Petri contendo



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo.
ISBN 978-85-7029-135-6

meio agarizado YMA. As placas foram mantidas em incubadora com fotoperíodo de 12 horas, a 25°C por 10 dias. Para produção de inóculo diretamente em meio agarizado, as colônias fúngicas foram repicadas para placas de Petri contendo meio YMA e mantidas por 15 dias na condições de incubação descrita previamente. Em ambas as técnicas, 10 mL de água destilada foi adicionado às placas e a suspensão obtida filtrada em gaze. A quantificação de conídios foi feita em câmara de Neubauer.

2. 3 Teste de patogenicidade

Todos os isolados obtidos de cada espécie fúngica identificada foram inoculados nas espécies *Ipomoea nil*, *I. grandifolia*, *I. hederifolia* e *I. quamoclit*. As plantas foram inoculadas com uma suspensão de 10^5 conídios/mL + Tween 20 0,05 % (polioxietileno monolaurático) e mantidas em câmara úmida por 24 horas. Após esse período as plantas foram mantidas nas condições de casa-de-vegetação por 30 dias. As avaliações de incidência das doenças foram realizadas semanalmente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total foram obtidos 12 isolados fúngicos, sendo seis pertencentes ao gênero *Cercospora*, três ao gênero *Bipolaris*, dois ao gênero *Alternaria* e um ao gênero *Colletotrichum*. Os isolados foram obtidos das espécies *Ipomoea nil*, *I. cairica*, *I. quamoclit*, *I. grandifolia*, *I. indivisa* e *I. triloba* (Tabela 1).

Tabela 1. Local de coleta, espécie botânica de origem dos isolamentos e identificação dos gêneros fúngicos da micobiota de *Ipomoea* spp.

Isolado	Local de coleta	Espécie botânica	Gênero Fúngico
1	Jaguariúna	<i>Ipomoea nil</i>	<i>Bipolaris</i> sp.
2	Jaguariúna	<i>I. quamoclit</i>	<i>Bipolaris</i> sp.
3	Jaguariúna	<i>I. nil</i>	<i>Bipolaris</i> sp.
4	Jaguariúna	<i>I. nil</i>	<i>Cercospora</i> sp.
5	Holambra	<i>I. nil</i>	<i>Cercospora</i> sp.
6	Artur Nogueira	<i>I. cairica</i>	<i>Colletotrichum</i> sp.
7	Artur Nogueira	<i>I. cairica</i>	<i>Alternaria</i> sp.
8	Jaguariúna	<i>I. triloba</i>	<i>Cercospora</i> sp.



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo.
ISBN 978-85-7029-135-6

9	Limeira	<i>I. quamoclit</i>	<i>Alternaria</i> sp.
10	Iracemápolis	<i>I. indivisa</i>	<i>Cercospora</i> sp.
11	Jaguariúna	<i>I. grandifolia</i>	<i>Cercospora</i> sp.
12	Jaguariúna	<i>I. nil</i>	<i>Cercospora</i> sp.

Em condição natural de infecção os sintomas observados foram manchas foliares associadas aos fungos *Bipolaris*, *Colletotrichum* e *Cercospora* (Figuras 1 A, B, C). Os sintomas associados ao gênero *Alternaria* foram amarelecimento e queima do ápice das folhas (Figura 1D).



Figura 1. Ocorrência natural de sintomas observados em plantas de *Ipomoea* spp.: Manchas foliares causadas por *Bipolaris* sp. em *I. nil* (A), *Colletotrichum* sp. em *I. cairica* (B), *Cercospora* sp. em *I. grandifolia* (C) e amarelecimento de folhas em *I. quamoclit* causada por *Alternaria* sp. (D).

Observou-se uma variação no resultado do teste de patogenicidade dos isolados fúngicos nas diferentes espécies de *Ipomoea* spp. (Tabela 2).

Tabela 2. Resultado do teste de patogenicidade da microbiota de *Ipomoea* spp. nas espécies *I. Nil*, *I. grandifolia*, *I. hederifolia* e *I. quamoclit*.

Isolado	<i>I. nil</i>	<i>I. grandifolia</i>	<i>I. hederifolia</i>	<i>I. quamoclit</i>
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	+	-	-	-
5	+	-	-	-
6	+	-	-	-
7	+	-	+	+
8	+	-	+	-
9	+	-	-	-
10	+	+	+	-
11	+	+	+	-



12	+	+	+	-
----	---	---	---	---

+ teste de patogenicidade positivo; - teste de patogenicidade negativo.

Apenas os isolados pertencentes ao gênero *Bipolaris* sp. (isolados 1, 2 e 3) apresentaram teste de patogenicidade negativo para todas as espécies de *Ipomoea* testadas. O gênero *Colletotrichum* sp. (isolado 6) foi patogênico apenas à *I. nil*. Os isolados pertencentes ao gênero *Alternaria* sp. apresentaram resultado diferenciado no ensaio. O isolado 7 foi patogênico às espécies *I. nil*, *I. hederifolia* e *I. quamoclit*, enquanto o isolado 9 foi patogênico apenas à *I. nil*. Os seis isolados do gênero *Cercospora* sp. também apresentam resultado diferenciado. Os isolados 4 e 5 foram patogênicos apenas à *I. nil*. O isolado 8 foi patogênico a *I. nil* e *I. hederifolia*. Os isolados 10, 11 e 12 foram patogênicos a *I. nil*, *I. hederifolia* e *I. grandifolia* (Tabela 2).

Na figura 2 são apresentados os principais sintomas observados nas plantas inoculadas em condições de casa-de-vegetação, destacando-se o amarelecimento de folhas (Figura 2A) em *I. quamoclit* causada pelo isolado 7 de *Alternaria* sp. e manchas foliares em *I. nil* causada pelo isolado 10 de *Cercospora* sp. O isolado de *Cercospora* sp. causou inicialmente pequenas manchas de formato irregular nas folhas (Figura 2B) que posteriormente coalesceram e causaram amarelecimento das folhas (Figura 2C).



Figura 2. Sintomas observados após inoculação do isolado 7 de *Alternaria* sp. em *I. quamoclit* (A) e do isolado 10 de *Cercospora* sp. em *I. nil* (B e C).

Nesse estudo demonstrou-se que existe uma micobiota associada às espécies de cordas-de-viola pertencente aos gêneros fúngicos *Alternaria* sp., *Bipolaris* sp., *Cercospora* sp. e *Colletotrichum* sp. Algumas associações encontradas nesse trabalho já haviam sido relatadas em estudos anteriores (Nechet e Halfeld-Vieira, 2012, 2014). O resultado obtido complementa as informações sobre essa micobiota e permite selecionar isolados fúngicos patogênicos a *I. quamoclit*, *I. hederifolia* e *I. grandifolia*, consideradas invasoras de crescente importância na cultura da cana-de-açúcar (Monquero et al., 2011). Os isolados promissores para continuidade dos



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo.
ISBN 978-85-7029-135-6

estudos de controle biológico das cordas-de-viola identificados foram: isolado 7, único patogênico à *I. quamoclit* e os isolados 10, 11 e 12, patogênicos a *I. nil*, *I. hederifolia* e *I. grandifolia* e que causaram mancha foliar que progrediu para amarelecimento e posterior desfolha das plantas.

4 CONCLUSÃO

Há fungos fitopatogênicos que compõem a micobiota associada à *Ipomoea* spp. que apresentam patogenicidade diferenciada às principais espécies invasoras de *Ipomoea* no Brasil. Nesse trabalho, isolados fúngicos pertencentes aos gêneros *Alternaria* e *Cercospora* foram selecionados, com base na gama de hospedeiro e no sintoma em plantas, como promissores para estudos de desenvolvimento de um mico-herbicida.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq-PIBIC pela concessão da bolsa ao primeiro autor.

6 REFERÊNCIAS

- ASH, G.J. The science, art and business of successful bioherbicides. **Biological Control**, v.52, p. 230-240, 2010.
- AULD, B. A. Bioherbicides. In: JULIEN, M.; WHITE, G. (Eds). **Biological Control of Weeds: theory and practical application**. Australia: ACIAR, n. 49, pp.129-134, 1997.
- CARMICHAEL, J.W.; KENDRICK, W.B.; CONNERS, I.L.; SIGLER, L. **Genera of Hyphomycetes**. Alberta: The University of Alberta Press, 1980. 387 p.
- CASTELLANI, A. A Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water: further researches. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v.70, p. 181-184, 1967.
- CORREIA, N.M.; KRONKA JR., B. Controle químico de plantas dos gêneros *Ipomoea* e *Merremia* em cana-soca. **Planta Daninha**,v.28, p.1143-1152, 2010.
- HALLET, S.G. Where are the bioherbicides?. **Weed Science**, v.53, p. 404-415, 2005.
- IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Relatórios de Comercialização de Agrotóxicos - Boletim Anual de Produção, Importação, Exportação e Vendas de**



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo.
ISBN 978-85-7029-135-6

Agrotóxicos no Brasil. Boletim 2013. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3>>. Acesso em: Maio 2015.

LORENZI, H. **Plantas Daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas.** Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000. 608 p.

MONQUERO, P.A.; AMARAL, L. R.; BINHA, D. P.; SILVA, P.V.; SILVA, A. C.; MARTINS, F.R.A. Mapas de infestações de plantas daninhas em diferentes sistemas de colheita da cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, v.26, n.1, p.47-55, 2008.

MONQUERO, P. A.; AMARAL, L. R.; SILVA, A. C.; BINHA, D. P.; SILVA, P. V. Eficácia de herbicidas em diferentes quantidades de palha de cana-de-açúcar no controle de *Ipomoea grandifolia*. **Bragantia**, v.68, n.2, p. 367-372, 2009.

MONQUERO, P.A.; SILVA, P.V.; HIRATA, A.C.S.; MARTINS, F.R.A. Monitoramento do banco de sementes de plantas daninhas em áreas com cana-de-açúcar colhida mecanicamente. **Planta Daninha**, v. 29, n.1, p. 107-119, 2011.

NECHET, K.L; HALFELD-VIEIRA, B.A. Fungos associados a três espécies da invasora corda-de-viola (*Ipomoea* spp.). **Tropical Plant Pathology**, v. 37, p. 225, 2012.

NECHET, K.L; HALFELD-VIEIRA, B.A. Seleção de fungos para o controle biológico da invasora corda-de-viola (*Ipomoea nil*). **Tropical Plant Pathology**, v. 39 (Supl.), 2014.

PIZZO, I.V.; AZANIA, C.A.M.; AZANIA, A.A.P.M.; SCHIAVETTO, A.R. seletividade e eficácia de controle de plantas daninhas pela associação entre óleo fúsel e herbicidas em cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, v. 28, n. 2, p. 347-357, 2010.

Silva, P.V.; Monquero, P.A. Influência da palha no controle químico de plantas daninhas no sistema de cana crua. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.12, n.1, p.94-103, 2013.

SUTTON, B.C. **The Coelomycetes.** Fungi imperfect with picnidia acervuli and stromata. Glasgow: Commonwealth Mycological Institute, 1980. 696p.

TIMOSSI, P. C.; DURIGAN, J. C. Manejo de convolvuláceas em dois cultivares de soja semeada diretamente sob palha residual de cana crua. **Planta Daninha**, v. 24, n. 1, p. 91-98, 2006.

VENCILL, W.K.; NICHOLS, R.L.; WEBSTER, T.M.; SOTERES, J.K.; MALLORY-SMITH, C.; BURGOS, N.R.; JOHNSON, W.G.; McCLELLAND, M.R. Herbicide resistance: Toward an understanding of resistance development and the impact of herbicide-resistant crops. **Weed Science**, v. 20, p.2-30, 2012.

WALKER, L. Production of spores for field studies. **Advances in Agricultural Technology**, v. 12, p. 1-15, 1980.