

FOL 3972



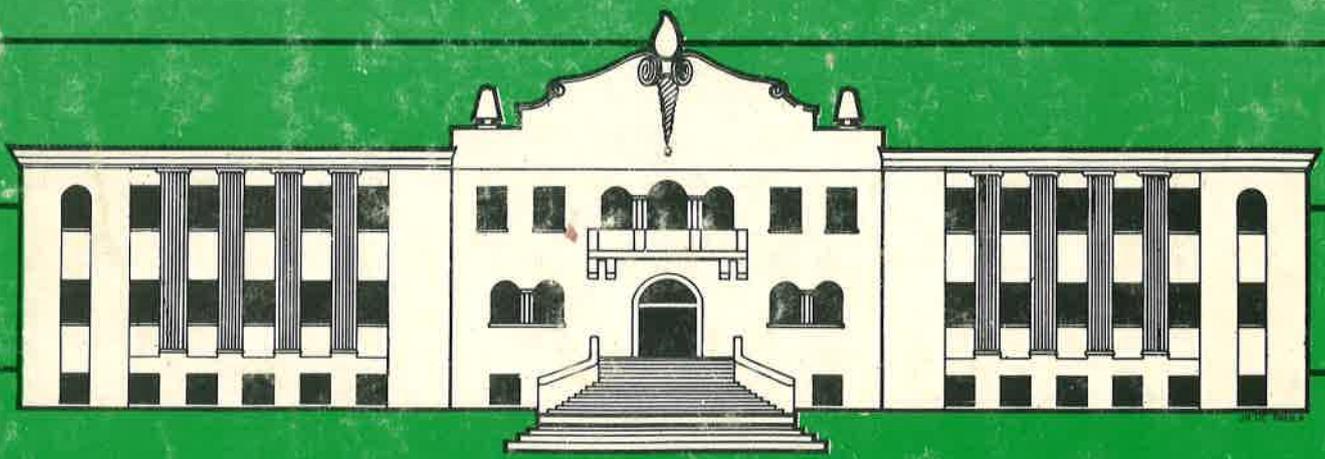
**EXPERIÊNCIA SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE
Euphorbia heterophylla NO BRASIL**

Dionísio Luiz Pisa Gazziero
José Tadashi Yokoyori

Experiencia sobre controle
1993 FL - 3972



2005-1



JABOTICABAL

FOL
3972

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Câmpus de Jaboticabal

CURSO INTERNACIONAL SOBRE
CONTROLE BIOLÓGICO DE PLANTAS DANINHAS
05 a 07 de outubro de 1993

Comissão Organizadora:

Julio Cezar Durigan (Coordenador)
Pedro Luiz C. A. Alves
Robinson Antonio Pitelli

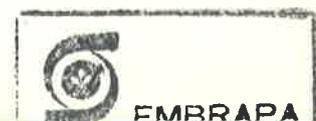
Professores:

Raghavan Charudattan
C. Jack Deloach
Eliana Gouveia Fontes
José Tadashi Yorinori
Dionísio Luiz P. Gazziero
James DeValerio

Promoção:

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- UNESP
Departamento Biologia Aplicada à Agropecuária
Departamento de Defesa Fitossanitária
Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas

FCAVJ/UNESP
Jaboticabal
1993



EXPERIÊNCIA SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE Euphorbia heterophylla NO BRASIL.

Dionísio Luiz Pisa Gazziero¹

José Tadashi Yorinori¹

INTRODUÇÃO

Euphorbia heterophylla, conhecida como amendoim-bravo ou leiteiro, é uma planta anual que infesta principalmente culturas de verão como soja, milho e outras. Reproduz-se por sementes, que se mantêm viáveis por vários anos e emergem de profundidades superiores a 10 cm. Sua expansão ocorreu principalmente na cultura da soja por ser de difícil controle. É uma planta suscetível a várias doenças que a infectam naturalmente, como o mosaico (Euphorbia Mosaic - EMV), a ferrugem (Uromyces euphorbiae CKe. et PK), a verrugose (Sphaceloma krugii), a mancha foliar de Helminthosporium (Helminthosporium euphorbiae), o cancro de Alternaria (Alternaria sp), a podridão branca (Sclerotinia sclerotiorum) e o oídio (Microsphaeria euphorbiae).

A ocorrência destas doenças geralmente se dá a partir de meados de janeiro, após o estabelecimento da cultura e quando os danos oriundos da convivência com a soja já foram causados.

O nível de infecção pode abreviar o ciclo, mas nem sempre ocasiona a morte das plantas, razão pela qual, pode causar problemas na colheita.

A excessão de Helminthosporium euphorbiae (Sinonímia Bipolares euphorbiae), um fungo de fácil multiplicação em laboratório, os demais patógenos, mesmo quando passível de produção, tem desenvolvimento restrito e só poderão ser utilizados desde que solucionado o problema de produção e multiplicação.

O isolado de Helminthosporium desta pesquisa foi encontrado no Rio Grande do Sul em 1981. Inicialmente era muito pobre em esporulação, porém, após sucessivas multiplicações em laboratório, foi obtida uma cepa com alta capacidade de esporulação e virulência. O efeito micoherbicida se dá pela ação de uma toxina produzida no processo de infecção e os sintomas se manifestam através de necroses nas folhas e caules. Dependendo do grau de infecção, poderá ocorrer redução no crescimento, desfolhamento total ou parcial e até morte da planta.

A multiplicação é feita em laboratório através da cultura e produção de conídios em meio artificial contendo tomate, sorgo, abóbora ou agar-batata. O processo consiste na repicagem do fungo da cultura em tubos de ensaio, para meio sólido em placas de petri, ou da mistura de uma suspensão de conídios e micélios colocada em marmitec de alumínio com tampa. Após seis a oito dias de incubação sob condição ambiente de laboratório, os conídios são extraídos por pincelagem ou coleta do sobrenadante e misturados com caolin ou lactose. Após secar a sombra a massa de conídios é transformada em pó passando por uma peneira fina de 0,125 mm.

¹Eng^o Agr^o Pesquisador da EMBRAPA-CNPSo. Caixa Postal 1061. 86001-970 - Londrina - PR.

LINHAS DE PESQUISA

Experimentos de laboratório, casa de vegetação e campo têm sido conduzidos sobre a ótica da ciência das plantas daninhas, visando determinar quais fatores podem interferir na eficiência do fungo para o controle biológico.

1) Longevidade dos Esporos

Mesmo sendo um produto biológico composto por organismos vivos, um microherbicida deve apresentar possibilidades de armazenamento por longos períodos. Conídios de *Helminthosporium*, puros ou em mistura com lactose, foram submetidos a diferentes condições de armazenamento. Os resultados mostraram haver viabilidade da manutenção da germinação por longos períodos (Tabela 1).

TABELA 1. Germinação de *Helminthosporium euphorbia* armazenado por 6 meses (formulado em Lactose) e por 14 meses (esporos puros), sob condições de temperatura ambiente e em geladeira ($10 \pm 1^\circ\text{C}$). EMBRAPA-CNPSo, Londrina - PR, 1986.

Duração e Condição de Armazenamento		Incubação - Horas									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	24
Esporo	A ²	0 ¹	0	0	1,4	5	5	20	28	35	83
Puro	B	0	0	0	0,2	16	16	21	35	35	78
Esporo	A	0	0	49	71	93	94	96	94	95	99
Formulado	B	0	0	70	85	95	97	97	97	94	98

¹ Porcentagem de germinação. Média de cinco contagens de 100 esporos (considerados germinado quando o tubo germinativo tinha 2 vezes ou mais o comprimento do esporo).

² Condição de armazenamento A: Temperatura ambiente; B: $10^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

2) Hora de aplicação.

Considerando-se que há diferenças na temperatura e umidade relativa do ar durante as horas do dia, foram conduzidos experimentos visando determinar a influência destas variações sobre o grau de infecção, desfolhamento e peso da matéria seca das plantas de amendoim-bravo. Mesmo sabendo-se que as pulverizações próximas às

12 horas não são as mais convenientes, concluiu-se que o fungo pode ser aplicado durante todo o dia, desde que a temperatura e umidade relativa do ar não sejam extremas (Tabela 2). Deve-se considerar que a presença de orvalho é fundamental para a germinação dos esporos. Experimento conduzido para verificar os efeitos de luminosidade no comportamento do fungo, mostrou que os esporos mantidos no escuro apresentam germinação superior e mais rápida do que aqueles mantidos no claro ou do que aqueles submetidos à alternância de períodos claros e escuros (Tabela 3).

TABELA 2. Avaliações da influência da hora de aplicação do fungo *Helminthosporium euphorbia* sobre plantas de amendoim bravo *Euphorbia heterophylla*. EMBRAPA-CNPSo. Londrina - PR, 1986.

EXPERIMENTO A (07/11/86)				
Hora de Pulverização	Temperatura (°C)	Umidade Relativa do Ar (%)	Infecção da Folha ¹	
08:30	21,	76	3,5 ²	
14:30	31,1	50	2,5	
19:30	29,4	54	3,5	
EXPERIMENTO B (06/02/87)				
Hora de Pulverização	Temperatura (°C)	Umidade Relativa do Ar (%)	Peso ³ Matéria Verde (g/m ²)	Desfolhamento ³ (%)
09:30	24	82	1718	87
16:30	25	75	1752	85
Testemunha	-	-	2120	0

¹ Avaliação realizada 17 dias após aplicação. Média de 4 repetições.

² Escala 1 a 10, sendo 1 = 1 a 10% infecção... 10 = 90 a 100%

³ Avaliação realizada 7 dias após aplicação.

TABELA 3. Efeitos da luminosidade na germinação de *Helminthosporium euphorbiae*. EMBRAPA-CNPSo, Londrina, PR. 1989.

Tratamentos	Germinação (%) ^{1/}		
	2:00 h	4:00 h	5:00 h
2 horas luz + 4 horas escuro	0	71	70
2 horas escuro + 4 horas luz	3	70	80
6 horas escuro	3	96	99
6 horas claro	0	80	87

^{1/} Média de 4 repetições.

3) Concentração de Inóculos

No início do desenvolvimento do micoherbicida, estabeleceu-se a concentração padrão como 2×10^5 esporos/ml. Vários experimentos foram conduzidos visando estudar a concentração ideal, que variou de 2×10^3 até 2×10^6 esporos/ml.

Na safra 87/88, experimento de campo comparando a dose de 2×10^5 com uma testemunha, mostrou redução de 44,9% no peso da matéria seca das plantas de amendoim-bravo tratadas, aos 8 dias da aplicação e, em 55%, aos 17 dias.

No mesmo ano, em outro experimento, comparando-se variações de doses de 2×10^5 a 2×10^6 , verificou-se não haver diferenças marcantes entre elas, nas avaliações de controle, infecção e desfolhamento. (Tab. 4)

TABELA 4. Avaliação de diferentes concentrações de *Helminthosporium euphorbiae* no controle de amendoim bravo (*Euphorbia heterophylla*). EMBRAPA-CNPSo, Londrina, PR. 1988.

Concentração de esporos	Controle ¹ (%)	Infecção ¹	Desfolhamento ¹ (%)
2×10^5	73	7,1	68
1×10^6	80	6,5	73
2×10^6	76	6,8	70

¹ Avaliação realizada 21 dias após a aplicação. A nota de infecção corresponde a escala de 0 a 10 onde 0 é sem infecção e 10 infecção total.

Na safra 88/89, trabalhando com concentrações que variaram de 1×10^5 a 8×10^5 , verificou-se aumento no controle com o aumento na dose.

Na safra 89/90, as concentrações variaram de 2×10^3 até 4×10^5 , observando-se a mesma tendência de controle. Neste experimento foram feitas determinações sobre a deposição de esporos/cm² nas folhas, a germinação (%/cm²), a deposição em gerbox (esporos/cm²) colocados nas entrelinhas da soja, a concentração de esporos na solução (ml) e a presença de esporos em folha de rebrotas. O material coletado foi analisado em laboratório e explica a resposta do controle a concentração utilizada. A campo foram realizadas avaliações de controle, infecção e desfolhamento (Tab. 5) além da contagem (m²) e peso (g) das plantas. Convém observar que, nas folhas de rebrotas, a presença de esporos foi baixa, o que justifica a necessidade de inundação para se obter o efeito herbicida. No entanto, verificam-se problemas na distribuição do fungo devido, principalmente, à precipitação do produto formulado e entupimento dos bicos de pulverização.

TABELA 5. Avaliação de diferentes concentrações do fungo *Helminthosporium euphorbiae* no controle do amendoim bravo (*Euphorbia heterophylla*). EMBRAPA-CNPSo, Londrina, PR. 1990.

Concentração esporos/ml	Controle ¹ (%)	Infecção ¹	Desfolhamento ¹	Peso seco ² g/m ²
2×10^3	45	7,7	45	67
2×10^4	57	9,0	61	73
4×10^4	70	9,0	70	39
1×10^5	81	9,5	78	51
2×10^5	87	9,0	91,7	22
4×10^5	98	10,0	99	21
Testemunha	-	-	-	70

¹ Avaliação realizada 13 dias após a aplicação. Nota de infecção corresponde a escala de 0 a 10, onde 0 é sem infecção e 10, infecção total.

² Avaliação realizada 35 dias após a aplicação.

A avaliação conjunta dos resultados, considerando-se todos os fatores estudados até o momento, inclusive viabilidade de produção, mostra que a concentração ideal deve variar de 2×10^5 a 4×10^5 , no máximo.

4) Compatibilidade com outros produtos

As plantas daninhas normalmente vivem em comunidades. Como o controle biológico preconiza especificidade e, portanto, controla apenas uma espécie, há que se pensar em como controlar esta comunidade.

Assim, a compatibilidade do fungo com herbicidas e óleos minerais e naturais torna-se necessária, tanto para se obter aumento no espectro de controle como para obter maior porcentagem de controle. Além disso, a compatibilidade com inseticidas pode ser útil para a economia no número de aplicações.

Vários experimentos foram conduzidos nesta linha de pesquisa. A avaliação da porcentagem de germinação do fungo com produtos químicos, mostra que o patógeno geralmente não é afetado (Tabelas 6 e 7). Os danos de fomesafen e energic não foram confirmados em outros experimentos. Avaliação complementar realizada em 1993, em placa de Petri, após 24 horas de exposição do fungo às doses do ingrediente ativo (equivalentes em kilogramas por hectare) de lactofen (0,15kg/l); imazetapyr (250 g/kg); chlorimuron (0,015 kg/l); energic (0,2%), mostrara germinação de 80%, 86%, 84% e 71%, respectivamente. Com energic observa-se grande variação nas repetições analisadas. Os efeitos da mistura sobre o controle pode ser inócuo ou aditivo, dependendo das condições em que se trabalha.

TABELA 6. Germinação de *Helminthosporium euphorbia* suspensos em solução de herbicida, misturada e surfactante. EMBRAPA-CNPSO, Londrina, PR. 1986.

Produtos	Dose g ou l/ha	<i>Helminthosporium</i> ¹ germinação (%)
Bentazon	0,72	93,8
Bentazon + Assist	0,72 + 1,5	93,2
Sethoxydin + Assist	0,72 + 1,5	91,8
Assist	1,5	87,8
Fomesafen + Energic	0,25 + 0,2%	1,6
Fomesafen	0,25	49,6
Bacillus thuringiensis	0,5(=8x10 ⁹ l.U)	93,8
Baculovirus anticarsia	50LE ²	68,6
Carbaril	0,19	95,6
Testemunha (soma)	-	96,8

¹ Esporo considerado germinado quando o tubo germinativo tinha 2 vezes o tamanho do esporo.

² Equivalente a 50 lagartas/ha

* Observar estudos complementares - 1993.

TABELA 7. Germinação dos esporos de *Helminthosporium euphorbia* quando em mistura com agentes surfactantes.

Agente	Concentração	Germinação (%) ¹
Óleo Vegetal	Puro	20
	1,0	80
	5,0	20
Assist	Puro	30
	1%	98
Energic	Puro	0
	0,2%	98
	0,5%	0
OPAA	Puro	94
Testemunha	-	97

¹ Germinação 3 horas após aplicação.

5) Bicos de Pulverização

Quando o esporo do fungo é pulverizado, submete-se a pressões e bicos aspersores, que teoricamente podem interferir na sua estrutura. Para determinar a influência destes fatores e os bicos de pulverização mais apropriados, foram conduzidos experimentos utilizando-se pontas de jatos plano e cônico. Na Tabela 8, pelos resultados da safra 91/92, observa-se não haver diferenças entre eles na avaliação da porcentagem de germinação do fungo, quatro horas após a pulverização.

TABELA 8. Porcentagem de germinação de esporos de *Helminthosporium euphorbia* e contagem quando aplicados com diferentes tipos de bicos. EMBRAPA-CNPSo. Londrina, PR. 1992.

Tipo de Bico	Experimento ¹	Experimento ²		
	Germinação (%)	Germinação (%) Placa - Folha		Esporos (cm ²)
Raindrop	92	95	58	30
Cone	87	92	44	14
Leque	93	92	36	10
TK	92	86	50	10

Experimento 1 - Realizado em Placas de Petri, com leitura 4 horas após a aplicação.

Experimento 2 - Realizado a campo, com leitura na placa de petri 1 hora após a aplicação e na folha 53 horas após.

Outros experimentos conduzidos na safra 90/91, mostraram que a deposição nas folhas do ápice é bem feita com bicos do tipo leque (80.02 e 80.03), sugerindo que o uso deste bico é apropriado ao trabalho com micoherbicida. Verificou-se também que em algumas aplicações a deposição com bicos raindrop foi maior que os demais, porém mais desuniforme, o que foi considerado um inconveniente.

6) Mistura com antievaporante

Sabe-se que o fungo necessita de umidade para germinar. Considerando-se que as condições climáticas nem sempre são as mais adequadas, foram conduzidos vários experimentos com o objetivo de avaliar os efeitos da mistura dos esporos com produtos de ação antievaporante, que teoricamente tem condições de criar um micro-ambiente úmido e favorável ao fungo. Foram testados os produtos Unitol, Deremin e óleo mineral.

A germinação analisada em placas de petri, não foi afetada quando se utilizaram doses de 0,5 a 1,5%, mas o foi quando em contato com os produtos concentrados (100%). Os experimentos foram conduzidos com aplicações nas folhas de amendoim-bravo e não puderam ser avaliados convenientemente razão pela qual deverão ser repetidos.

7) Horas de molhamento

Foram instalados três ensaios para observar o número de horas de molhamento necessárias para a germinação dos esporos. As aplicações foram feitas em laboratório (em gerbox e papel filtro) e a campo, em vasos semeados com plantas de amendoim bravo submetidas a orvalho natural. Observou-se que 7 horas de umidade em laboratório foram insuficientes para uma boa germinação (Tabela 9), mas que 14 e 21 horas de molhamento, com períodos intercalados, proporcionaram boa germinação nas folhas da invasora (Tabela 10).

TABELA 9. Porcentagem de germinação de *Helminthosporium euphorbia* em função das horas de molhamento provocadas artificialmente em gerbox. EMBRAPA-CNPSo. Londrina, PR. 1992.

Horas de Molhamento	% de germinação
7 (contínuas)	19
7 + 7 ¹	72
14 (contínuas)	61
24 (contínuas)	83
7 + 7 + 7 ²	85

¹ Com 1 intervalo de 16 horas sem molhamento.

² Com 2 intervalos de 16 horas sem molhamento.

TABELA 10. Porcentagem de germinação do fungo *Helminthosporium euphorbia*, em folhas de *Euphorbia heterophylla* em função do número de horas de orvalho. EMBRAPA-CNPSo. Londrina, PR. 1992.

Noites de Orvalho	% Germinação		
	24 ¹	48	72
0	0	0	1
1	18	53	56
2	-	78	82
3	-	-	72

¹ Horas após pulverização.

8) Etapas de Produção

No processo de produção, são estabelecidas quatro fases. Para avaliar cada etapa e determinar a possibilidade de dano ao fungo, foi conduzido um experimento e analisada a germinação dos esporos em meio agar-agar e em plantas de amendoim-bravo. Verificou-se que a germinação não foi prejudicada em cada uma destas fases, mas confirmou-se que os esporos germinam de forma mais lenta nas plantas do que no meio agar-agar. Apesar disto o processo de formulação deve ser reestudado. Atualmente, utiliza-se caolim na formulação, produto que concorre com o esporo por umidade. Acredita-se que parte dos problemas que se detectaram com o produto são devidos à formulação inadequada.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora o desenvolvimento do microherbicida esteja sendo feito com base no desenvolvimento de um herbicida químico, o controle biológico deve ser encarado de forma diferenciada do método químico.

Além dos trabalhos relatados, outros foram conduzidos sobre a ótica da fitopatologia. Sabe-se que existe um grande número de biotipos de Euphorbia e que um deles tem se mostrado resistente.

Alguns problemas, como por exemplo formulação e influência das condições do meio ambiente na germinação do fungo, ainda precisam ser melhor estudados. Não se pretende a solução de todos os problemas com este tipo de trabalho mas pelo menos indicar que medidas alternativas devem ser pesquisadas e integradas ao manejo das plantas daninhas. Atualmente existe uma tendência mundial de se trabalhar no controle biológico e nosso país teve a oportunidade de encontrar um agente que apresenta características favoráveis a um microherbicida. No entanto, são inegáveis as dificuldades para se desenvolver um produto desta natureza em uma empresa estatal. Por isto, se o objetivo for a produção comercial em larga escala, não se pode desconsiderar a necessidade de intercâmbio com a indústria, como forma de cooperação tecnológica e avanço nos resultados. Não se pode desprezar no entanto a produção semi-artesanal, viável para certas condições. Este documento não apresenta todos os experimentos conduzidos, mas procura dar uma idéia da experiência do Centro Nacional de Pesquisa de Soja no assunto.

CONCLUSÕES

Os resultados encontrados até o momento, permitem concluir que:

- a) Esporos de Helminthosporium euphorbia se mantêm viáveis por longos períodos desde que armazenados adequadamente;
- b) Se a temperatura e umidade relativa do ar não forem extremas e se houver orvalho durante a noite, pode-se pulverizar o micoherbicida em qualquer hora do dia;
- c) Amistura do fungo é compatível com a maioria dos herbicidas, inseticidas e surfactantes disponíveis no mercado;
- d) As concentrações mais eficientes estiveram entre 2×10^5 a no máximo 4×10^5 esporos/ml;
- e) Bico leque tem se mostrado viável para pulverização do micoherbicida;
- f) São necessárias 14 a 21 horas de molhamento (equivalente a duas ou três noites de orvalho) para se obter boas condições de germinação e infecção do fungo.
- g) Não observou-se danos aos esporos nas diferentes etapas de produção do micoherbicida.
- h) Os experimentos conduzidos ainda não permitem afirmar sobre a possibilidade do uso deste produto em escala comercial, mas criam expectativas positivas quanto à viabilidade no controle biológico de plantas daninhas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq e Procisur pelo incentivo ao desenvolvimento deste Projeto, aos estagiários Sílvia Sarlo, Adolfo Ulbrich, Paulo Calçavara, Lúcia E. Cação e aos colegas Elemar Voll e Décio Karam pela colaboração.

FIG. 1. Germinação de esporos *Helminthosporium euphorbiae* aplicado em diferentes horas do dia. EMBRAPA-CNPSó, Londrina, PR. 1989.

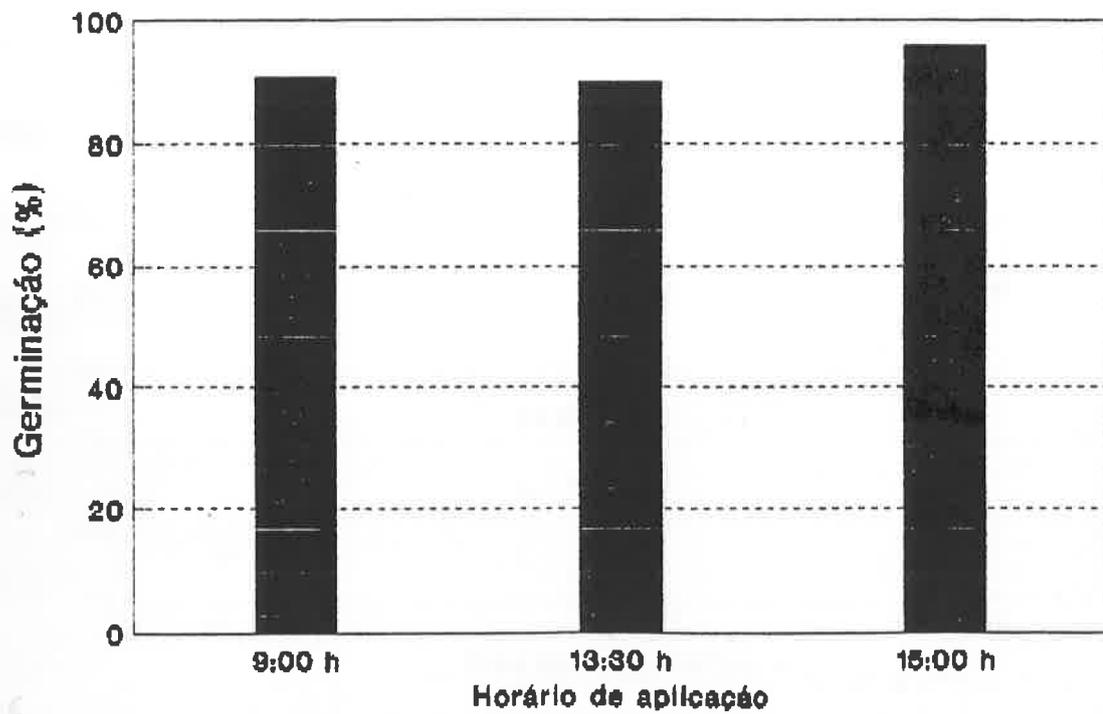


FIG. 2. Efeitos do fungo *Helminthosporium euphorbiae* pulverizado em plantas de amendoim-bravo (*E. heterophylla*). EMBRAPA-CNPSo. Londrina, PR. 1988.

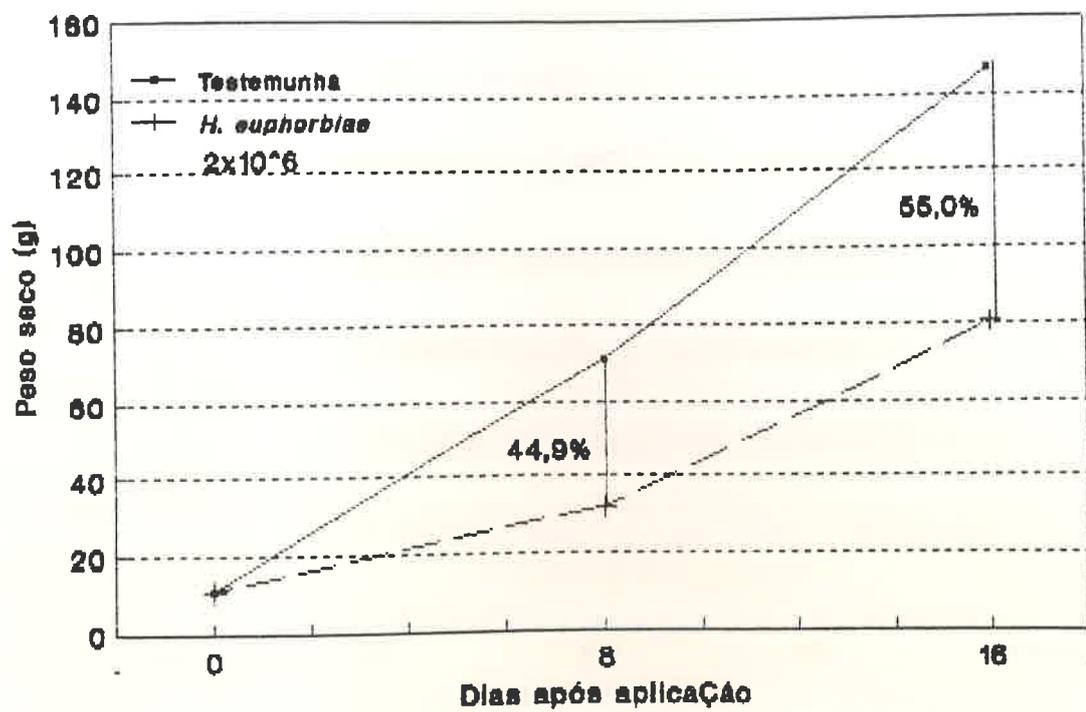


FIG. 3. Avaliação visual de controle de *E. heterophylla* pulverizado com diferentes concentrações de *H. euphorbiae*. EMBRAPA-CNPSO, Londrina, PR, 1989.

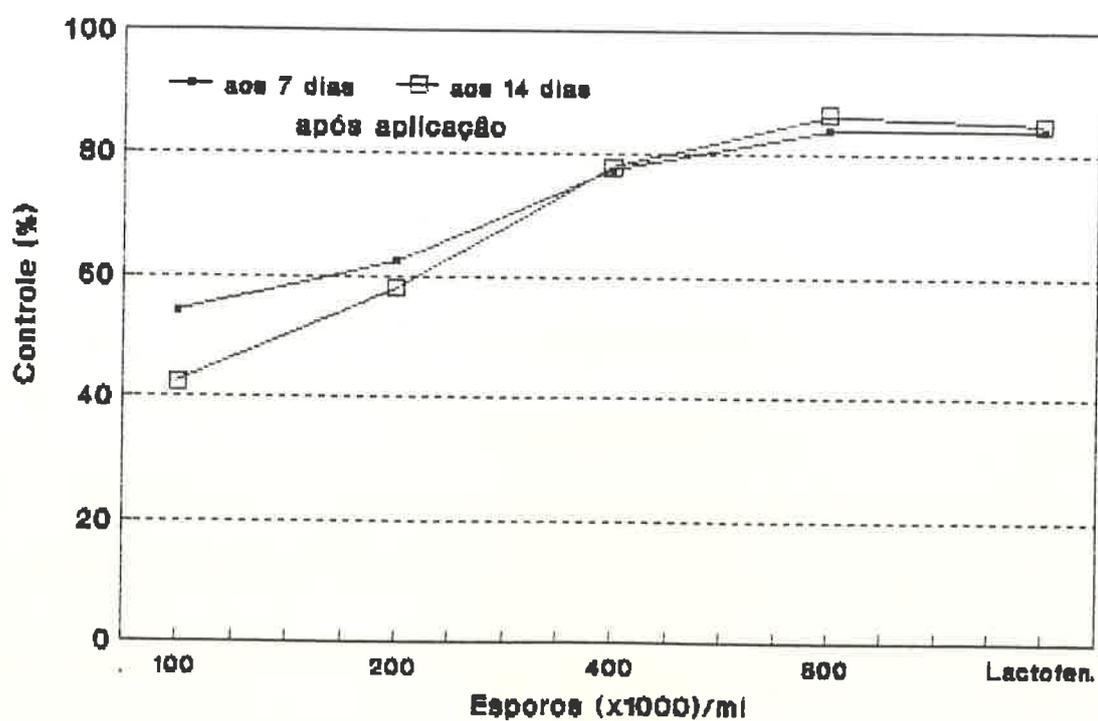


FIG. 4. Número de esporos de *Helminthosporium euphorbiae* na suspensão aplicada. EMBRAPA-CNPSO. Londrina, PR. 1989.

