

DAVI MESQUITA DE MACEDO

MICROBIOTA ASSOCIADA A *Schinus terebinthifolius*, *Tradescantia fluminensis*
E *Rottboellia cochinchinensis* COMO POTENCIAIS AGENTES DE
CONTROLE BIOLÓGICO

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Fitopatologia, para
obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

M141m
2010

Macedo, Davi Mesquita de, 1977-
Micobiota associada a *Schinus terebinthifolius*,
Tradescantia fluminensis e *Rottboellia cochinchinensis*
como potenciais agentes de controle biológico /
Davi Mesquita de Macedo. – Viçosa, MG, 2010.
xii, 148f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Texto em português e inglês.

Orientador: Robert Weingart Barreto.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Controle biológico. 2. Plantas invasoras. 3. Micologia.
 4. Fungos fitopatogênicos - Identificação. 5. Biologia -
Classificação. 6. *Schinus terebinthifolius*.
 7. *Tradescantia fluminensis*. 8. *Rottboellia cochinchinensis*.
- I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 632.96

DAVI MESQUITA DE MACEDO

MICROBIOTA ASSOCIADA A *Schinus terebinthifolius*, *Tradescantia fluminensis*
E *Rottboellia cochinchinensis* COMO FONTE DE POTENCIAIS AGENTES DE
CONTROLE BIOLÓGICO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 26 de Abril de 2010

Prof. Olinto Liparini Pereira
(Co-Orientador)

Prof. Leandro Grassi de Freitas
(Co-Orientador)

Dr. Harold Charles Evans

Prof. Bruno Sérgio Vieira

Prof. Robert Weingart Barreto
(Orientador)

A Deus

Aos meus pais Antonio e Vera

A Viviane por todos os momentos vividos

e ao mais novo integrante da família, Tomás

AGRADECIMENTOS

A Deus, a ele toda honra e glória

Aos meus pais, por todo incentivo, paciência e confiança

A minha esposa Viviane, a cumplicidade, carinho, confiança e muita paciência em todos os momentos

Ao meu filho Tomás, com o seu nascimento no momento mais oportuno

Ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade da realização do curso de Doutorado

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, pela concessão da bolsa de estudo de Doutorado

Ao USDA e o Instituto Landcare Research – Manaaki Whenua pelo suporte financeiro para a realização dos trabalhos

Ao Professor Robert Weingart Barreto, pela orientação, apoio, incentivo e amizade

Ao Professor Olinto Liparini Pereira, pelo apoio no desenvolvimento dos trabalhos e nos momentos de dúvida

Aos Professores do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos ampliando os meus conhecimentos

Aos colegas da Clínica de Doenças de Plantas, Henrique, Célio, José Orlando, Ponês, Sueli, Fabiano, Janaína, Eduardo, Lidiane, pelo convívio de eterna amizade

Ao Diogo e Tiago, sempre prontos nos momentos em que sempre necessitei da ajuda deles

Ao Professor Eduardo Mizubuti, Brás e Lidiane, quando houve necessidade do auxílio das ferramentas moleculares

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, Délio, Braz, Rita, Sara e, pela gentileza e educação com que sempre me trataram.

A todos aqueles que, direta e indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

DAVI MESQUITA DE MACEDO, filho de Antonio Lopes de Macedo Filho e Vera Lucia de Macedo, nasceu em 06 de Julho de 1977 em Santos, São Paulo.

Em Agosto de 2003, graduou-se como Engenheiro Agrônomo pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais.

Em Fevereiro de 2006, obteve, na mesma instituição, o título de Mestre em Fitopatologia.

Em Maio de 2006, ingressou, na mesma instituição, no curso de Doutorado em Fitopatologia

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	xi
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	5
ARTIGO 1.....	13
<i>Bipolaris chloridis</i> a new fungal pathogen of itchgrass (<i>Rottboellia cochinchinensis</i>) in <i>Brazil</i>	13
ABSTRACT.....	14
INTRODUCTION.....	15
MATERIAL AND METHODS.....	17
RESULTS AND DISCUSSION.....	19
ACKNOWLEDGMENTS.....	23
REFERENCES.....	24
ARTIGO 2.....	30
Micobiota fitopatogênica da planta invasora <i>Tradescantia fluminensis</i> no Brasil, com particular referência ao controle biológico clássico.....	30
RESUMO.....	31
INTRODUÇÃO.....	33
MATERIAL E MÉTODOS.....	37
AGRADECIMENTOS.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
ARTIGO 3.....	71
<i>Kordyana brasiliensis</i> sp. nov. (Ustilaginomycetes: Brachybasidiaceae): a potential classical biocontrol agent for the weed <i>Tradescantia fluminensis</i> from Brazil.....	71
ABSTRACT.....	72
INTRODUCTION.....	74
MATERIAL AND METHODS.....	76
RESULTS.....	81
DISCUSSION.....	86
ACKNOWLEDGEMENTS.....	89
REFERENCES.....	90

ARTIGO 4.....	107
Black mildew fungi (Meliolaceae) associated with <i>Schinus terebinthifolius</i> (Brazilian pepper tree) in Brazil.....	107
ABSTRACT.....	108
INTRODUCTION.....	109
MATERIALS AND METHODS.....	110
RESULTS AND DISCUSSION.....	111
ACKNOWLEDGEMENTS.....	117
REFERENCES.....	118
ARTIGO 5.....	126
<i>Corynespora cassicola</i> f. sp. <i>schinii</i> , um novo patótipo identificado no Brasil com potencial para o uso no controle biológico de aroeira (<i>Schinus terebinthifolius</i>).....	126
ABSTRACT.....	127
INTRODUÇÃO.....	129
MATERIAL E MÉTODOS.....	131
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	133
AGRADECIMENTOS.....	138
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	139
CONCLUSÕES GERAIS.....	146

RESUMO

MACEDO, Davi Mesquita de, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2010. **Micobiota associada a *Schinus terebinthifolius*, *Tradescantia fluminensis* e *Rottboellia cochinchinensis* como potenciais agentes de controle biológico.** Orientador: Robert Weingart Barreto. Co-Orientadores: Olinto Liparini Pereira e Leandro Grassi de Freitas.

A invasão de plantas exóticas representa uma das maiores ameaças para a biodiversidade do planeta. Muitos países enfrentam situações graves com invasões biológicas promovidas por plantas nativas do Brasil que, depois de introduzidas a partir de seu centro de origem, livres de seus inimigos naturais, passaram a invadir ecossistemas naturais ameaçando a sua integridade e processos ecológicos fundamentais. A utilização das medidas de controle convencionais, utilizadas na agricultura é, nesses casos, contraindicada ou inviável. O controle biológico clássico pela introdução de inimigos naturais específicos provenientes do centro de origem da planta é a única opção que apresenta exemplos de sucesso duradouro e é reconhecidamente sustentável. Fungos associados a três espécies de plantas invasoras (*Rottboellia cochinchinensis* – capim-camalote, *Tradescantia fluminensis* – trapoeraba branca e *Schinus terebinthifolius* – aroeira) foram estudados no contexto do controle biológico clássico com o propósito de contribuir para a mitigação de invasões nos EUA e Nova Zelândia e os resultados são aqui apresentados. Um hifomiceto foi descoberto atacando *R. cochinchinensis* no Brasil e sua identidade foi esclarecida como sendo *Bipolaris chloridis*. Este fungo nunca havia sido antes relatado no Brasil e nem sobre este hospedeiro. Ele se mostrou capaz de atacar outras gramíneas além de *R. cochinchinensis*, milho e capim de Rhodes (seu hospedeiro originalmente conhecido). As implicações desta descoberta para o controle biológico foram discutidas. Sobre

T. fluminensis foram encontrados nove espécies de fungos durante o levantamento: *Cercospora apii*, *Ceratobasidium tradescantiae* sp. nov., *Colletotrichum falcatum*, *Kordyana brasiliensis* sp.nov., *Mycosphaerella tradescantiae* sp. nov., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Septoria paranaensis* sp. nov. e *Uromyces commelinae*. A taxonomia da nova espécie *Kordyana brasiliensis* foi esclarecida por exames morfológicos e estudos moleculares (com a utilização dos primers NL1 e NL4) e o fungo se mostrou promissor como agente de biocontrole, sendo específico para *T. fluminensis* (entre 69 espécies testadas de 32 famílias botânicas) e capaz de causar uma doença severa sobre este hospedeiro. Sob condições de infecção natural o fungo apresentou uma incidência de doença na ordem de 70% e causou severidade média de 42% em 200 folhas avaliadas. Os levantamentos da micobiota de *S. terebinthifolius*, revelaram uma grande diversidade de fungos potencialmente fitopatogênicos. Dentre estes, no presente trabalho, examinou-se com atenção os fungos coletados reconhecidos como pertencentes à família Meliolaceae e também, considerando-se o seu aparente potencial para o controle biológico, um isolado de *Corynespora cassiicola* causador de doença severa sobre *S. terebinthifolius*. Três espécies de fungos causadores de míldio negro (uma doença de pequeno impacto sobre *S. terebinthifolius*) foram encontradas colonizando *S. terebinthifolius* em várias regiões do Brasil: *Irenopsis schini-terebenthifolii* sp. nov, *Meliola chilensis* e *Meliola rhois* var. *africana*. A primeira espécie foi reconhecida como nova e descrita enquanto que as duas demais foram reconhecidas como representando novas associações patógeno-hospedeiro, pois os fungos não eram conhecidos ainda sobre *S. terebinthifolius*. A morfologia de um hifomiceto associado a manchas e queimas foliares de *S. terebinthifolius* foi reconhecida como equivalente à dos

fungos da espécie *C. cassicola* e confirmada por métodos moleculares envolvendo a utilização dos primers ITS1 e ITS4. Além disso, foi realizado um teste de especificidade envolvendo 23 espécies de plantas de diferentes famílias botânicas, inclusive Anacardiaceae, e o patotipo se mostrou específico a *S. terebinthifolius*, sendo proposto o seu reconhecimento como *C. cassicola* f. sp. *schinii* e também o seu potencial para utilização como agente de controle biológico para infestações de *S. terebinthifolius* na Flórida e Haváí (EUA).

ABSTRACT

MACEDO, Davi Mesquita de, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, April of 2010. **Mycobiota of *Schinus terebinthifolius*, *Tradescantia fluminensis* and *Rottboellia cochinchinensis* as potential biological control agents.** Adviser: Robert Weingart Barreto. Advisers: Olinto Liparini Pereira and Leandro Grassi de Freitas.

Invasions of natural ecosystems by exotic plants represent one of the greatest threats to biodiversity. Many countries face serious problems with such biological invasions involving plants that are native from Brazil. After its having been introduced from their center of origin and free from their natural enemies they invade natural ecosystems and threaten the integrity of ecological processes. The conventional control measures used in agriculture, in such cases, are not viable nor recommended. The classical biological control involving the introduction of specific natural enemies from the center of origin of the plant is the only option that provides examples of success and is widely recognized as the sole sustainable alternative. Fungi associated with three weed species (*Rottboellia cochinchinensis* - Itchgrass, *Tradescantia fluminensis* - wandering jew and *Schinus terebinthifolius* - brazilian pepper tree) were studied in the context of biological control with the aim of contributing to the mitigation of invasions in the U.S., New Zealand and Brazil and the results are presented herein. A hyphomycete was discovered attacking *R. cochinchinensis* and identified as *Bipolaris chloridis*. This fungus has never been reported before from Brazil nor on this host. This fungus was able to attack other grasses besides *R. cochinchinensis*, namely corn and rhodes grass (its original host). The implications of these findings for biological control were discussed. In *T. fluminensis*, nine species of fungi were collected during the survey: *Cercospora apii*, *Ceratobasidium tradescantiae* sp. nov., *Colletotrichum*

falcatum, *Kordyana brasiliensis* sp. nov., *Mycosphaerella tradescantiae* sp. nov., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Septoria paranaensis* sp. nov. and *Uromyces commelinae*. The taxonomy of the new species *Kordyana brasiliensis* was clarified by examinations of morphological characters and molecular studies (using the primers NL1 and NL4). This fungus was regarded as showing a high potential for use in biocontrol agent. It was specific to *T. fluminensis* (among 69 species tested from 32 botanical families) and capable of causing severe disease on this host. Under conditions of natural infection by this fungus an incidence of 70% and a level of 42% of disease severity was reached. Surveys of the mycoflora *S. terebinthifolius* showed a great diversity of potentially pathogenic fungi among which are fungi belonging to a poorly known group of ascomycetes causing black mildews, the Meliolaceae. Three species were found on this host: *Irenopsis schini-terebinthifolii* sp. nov., *Meliola chilensis* and *Meliola rhois* var. *africana*. The first species was described as new whereas the other two were new host-pathogen associations. The potential for practical application in biological control of an isolate of *Corynespora cassiicola* found causing a severe disease on *S. terebinthifolius*. was investigated. Its identity was confirmed as *C. cassiicola* by a combination of morphology studies and molecular methods involving the use of primers ITS1 and ITS4. In addition, we performed a specificity test involving 23 species of plants of different botanical families, including several Anacardiaceae. The isolate from *S. terebinthifolius* was shown to be host-specific and the new forma specialis *C. cassiicola* f. sp. *schinii* was proposed. Its potential for use as biological control agent for infestations of *S. terebinthifolius* in Florida and Hawaii (USA) was regarded as high.

INTRODUÇÃO GERAL

Há registros de mais de 300 espécies de plantas comportando-se como invasoras em ambientes exóticos (McGeoch et al., 2010). Estas são consideradas uma grande ameaça para a biodiversidade global em função de sua amplitude e magnitude (Hulme, 2009) contribuindo para uma dramática redução na riqueza das espécies nativas nos ambientes onde foram introduzidas (Ellison, 2005; Gaertener et al., 2009). Além disso, essas invasões biológicas promovidas por plantas exóticas contribuem para a alteração em processos nos ecossistemas tais como a ciclagem de nutrientes (Raizada et al., 2008). A redução das espécies nativas ocorre por diversos fatores, como, competição com as espécies de plantas nativas e efeitos indiretos advindos da eliminação de espécies na base de teias alimentares (Gaertner et al., 2009), mudanças na estrutura da comunidade (Hedja et al., 2009) e na diversidade genética (McGeoch et al., 2010). Na tentativa de mitigar os problemas causados pelas plantas invasoras exóticas sem prejudicar ainda mais a biodiversidade, o controle biológico se apresenta como a única medida de controle adequada para minimizar os problemas e favorecer o retorno a uma condição de equilíbrio ambiental, havendo diversos e notórios exemplos de sucesso (Charudattan, 2001). O início do controle biológico de plantas invasoras se deu no primeiro quarto do século XX, com a liberação de insetos para o controle de plantas invasoras, (McFadyen, 1998), mas foi somente no início da década de 70 que implementou-se o controle clássico com a introdução de fungos fitopatogênicos (Hasan, 1980, Bruzzese & Field, 1985, Barreto & Evans, 1988, Morris, 1997). Na história do controle biológico de

plantas invasoras diversas revisões foram publicadas com uma abordagem completa sobre o assunto (Hasan, 1974; Huffaker, 1976; Hasan, 1980; Templeton, 1982; Wapshere, 1982; Te Beest, 1984; Templeton, 1984; Evans, 1987; Adams, 1988; Ayres & Paul, 1990; Evans & Ellison, 1990; Charudattan, 1991; Watson, 1991; Te Beest *et al.*, 1992; Julien & White, 1997; Hallett, 2005; Morin *et al.*, 2009; Palmer *et al.*, 2010). Há vários exemplos recentes de trabalhos de controle biológico de plantas daninhas envolvendo fungos fitopatogênicos que alcançaram sucesso (Barton *et al.*, 2007; Dhileepan, 2007; Fischer *et al.*, 2007; Kiss, 2007; Ellison *et al.*, 2008).

O controle biológico de plantas invasoras com a utilização de fitopatógenos envolve duas principais estratégias: o método clássico ou inoculativo (envolvendo a introdução de um patógeno inimigo natural de uma “planta-alvo” desde o seu centro de origem até a nova área de distribuição da planta, onde esta livre então de seus inimigos naturais tornou-se agressiva, visando restabelecer o equilíbrio) e o método de mico-herbicida ou inundativo; tipicamente envolvendo o uso de fungos fitopatogênicos endêmicos, já associados à planta-alvo, que são produzidos em massa, formulados e aplicados de modo semelhante a um herbicida químico onde a população da planta daninha está estabelecida (Evans, 2001). O presente trabalho contempla a estratégia clássica ou inoculativa.

No controle biológico clássico, a descoberta e escolha do agente são passos fundamentais para o sucesso na utilização da estratégia. Neste caso, os organismos escolhidos como potenciais agentes de biocontrole não podem representar uma ameaça para as plantas não-alvo (sejam elas plantas nativas ou plantas exóticas cultivadas na área onde se pretende introduzir o agente).

Para tal, o agente deve ser, em geral, altamente específico. Estes requisitos são fundamentais para que a introdução de organismos seja permitida pelos órgãos oficiais responsáveis da permissão da importação do organismo e pelo público local (Morin et al., 2006). Nos últimos 40 anos, a utilização de fitopatógenos no controle biológico de plantas invasoras tem se disseminado (Charudattan, 2001). Dentre os fitopatógenos utilizados como agente de biocontrole, os fungos fitopatogênicos tem sido os mais bem aceitos, devido a ausência da necessidade de vetores para a sua introdução e muitos deles possuem especificidade de hospedeiro (Charudattan, 2001). Isso é particularmente acentuado para os fungos biotróficos, que tem sido o grupo de fungos mais usados como agentes de biocontrole de plantas invasoras. Fungos como os agentes etiológicos de ferrugens e carvões além de comumente muito específicos, causam danos severos sobre as plantas-alvo, apresentam elevada capacidade de dispersão e facilidade de se perpetuarem no ambiente quando as condições ambientais são favoráveis (Frank, 1992). O exemplo pioneiro de controle biológico clássico de plantas invasoras com fungos fitopatogênicos também é um exemplo notório de sucesso da estratégia. Ele envolveu o uso de um fungo biotrófico, a ferrugem *Puccinia chondrillina* Bubák, para o controle de *Chondrilla juncea* L. na Austrália (Adams, 1988; Hasan, 1980). Vários outros exemplos bem sucedidos do uso de ferrugens se seguiram tais como os projetos visando o controle biológico de: *Acacia saligna* (Lab.) Wend., (Morris, 1997), *Carduus theomeri* (Tourn) (Bruckart & Dowler, 1986), *Cryptostegia grandiflora* R. Br. (Tomley & Evans, 2004), *Rubus* spp. (Bruzzese & Field, 1985). Além das ferrugens, os carvões brancos têm várias das características favoráveis enumeradas para fungos patogênicos biotróficos como as das ferrugens. Existe ainda apenas um exemplo de fungo deste grupo utilizado em

programa de biocontrole: *Entyloma ageratinae* R. W. Barreto & H. C. Evans utilizado com grande sucesso para o controle de *Ageratina riparia* (Regel) R.M. King & H. Rob. no Havaí e na Nova Zelândia (Barton et al., 2007). O Brasil é o maior país neotropical, e os neotrópicos são o centro de origem de muitas plantas invasoras de grande importância no mundo. Alguns grupos de pesquisa têm atuado no sentido de levantar e estudar artrópodes e fungos para o controle biológico de plantas daninhas nativas do Brasil (Barreto, 2008). Trabalhos voltados ao controle biológico de plantas invasoras com fungos fitopatogênicos coletados no Brasil tem sido desenvolvidos ativamente desde a década de 90 no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, já tendo culminado nas duas únicas introduções de fungos fitopatogênicos brasileiros com esta finalidade respectivamente de *Miconia calvescens* DC. - no Havaí (Barreto et al., 2001b) e *Lantana camara* L. - na Austrália (Barreto et al., 2001a). Os fungos, causadores respectivamente da antracnose em miconia e ferrugem em *Lantana*, se estabeleceram com sucesso nas regiões do globo onde foram introduzidos. Seu impacto sobre as populações das plantas alvo já estão sendo notados.

Nessa tese apresentam-se os resultados de pesquisas envolvendo levantamento e estudo de especificidade de fungos fitopatogênicos associados a três espécies de plantas invasoras de grande importância. Duas são nativas do Brasil, *Tradescantia fluminensis* Vell. e *Schinus terebinthifolius* Radd., e a terceira é exótica: *Rottboellia cochinchinensis* (Lour.) W. D. Clayton.

Referências Bibliográficas

Adams, EB (1988) Fungi in classical biocontrol of weeds: In: M. N. Burge (ed.) Fungi in Biological Control Systems. Manchester: Manchester University Press. pp. 111-124.

Ayres P, Paul N (1990) Weeding with fungi. New Scientist 1732: 36-39.

Barreto RW, Evans HC (1988) Taxonomy of a fungus introduced into Hawaii for biological control of *Ageratina riparia* (Eupatorieae; Compositae), with observations on related weed pathogens. Transaction of the British Mycological Society 91: 81- 97.

Barreto RW, Pereira JM, Ellison C, Thomas S (2001a) Controvérsia e fundamentação científica para a introdução da ferrugem *Prospodium tuberculatum* como agente de controle biológico para *Lantana camara* na Austrália In: 7 Simpósio de Controle Biológico, 2001, Poços de Caldas. VII Simpósio de Controle Biológico: Livro de Resumos. p.148 – 148.

Barreto RW, Seixas CDS, Killgore E (2001b) *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *miconiae*: o primeiro fungo fitopatogênico brasileiro a ser introduzido no exterior para o controle biológico clássico de uma planta invasoras (*Miconia calvescens*) In: 7 Simpósio de Controle Biológico, 2001b, Poços de Caldas. VII Simpósio de Controle Biológico. Livro de Resumos. p.109.

Barreto RW (2008) Latin American weed biological control science at the crossroads. In: XII International Symposium on Biological Control of Weeds, 2008, La Grande Motte. eds: Julien MH, Sforza R, Bon MC, Evans HC, Hatcher PE, Hinz HL, Rector BG. Proceedings of the XII International Symposium on Biological Control of Weeds. Wallingford: CAB International, p. 109 - 121.

Barton J, Fowler SV, Gianotti AF, Winks CJ, de Beurs M, Arnold GC, Forrester G (2007) Successful biological control of mist flower (*Ageratina riparia*) in New Zealand: Agent establishment, impact and benefits to the native flora. *Biological Control* 40, 370-385.

Bruckart WL, Dowler WM (1986) Evaluation of exotic rust fungi in the United States for classical biological control of weeds. *Weed Science* 34: 11 – 14.

Bruzzese E, Field RP (1985) Occurrence and spread of *Phragmidium violaceum* on blackberry (*Rubus fruticosus*) in Victoria, Australia. In: Delfosse, E. S. (ed.), Proceeding VI International Symposium Biological Control of Weeds. Vancouver, Canadá, Agriculture Canada pp. 609 - 612.

Charudattan R (1991) The mycoherbicide approach with plant pathogens. In: TeBeest, D.O. (Ed.). Microbial control of weeds. New York, Chapman & Hall. pp. 24-57. Charudattan R (2001) Biological control of weeds by means of plant pathogens: significance for integrated weed management in modern agroecology. *Biocontrol* 46: 229–260.

Dhileepan K (2007) Biological control of *Parthenium (Parthenium hysterophorus)* in Australia rangeland translates to improved grass production. *Weed Science* 55(5): 497 – 501.

Ellison AM, Bank MS, Clinton BD, Colburn EA, Elliott K, Ford CR, Foster DR, Kloeppel BD, Knoepp JD, Lovett GM, Mohan J, Orwig DA, Rodenhouse NL, Sobczak WV, Stinson KA, Stone JK, Swan CM, Thompson J, Von Holle B, Webster JR (2005) Loss of foundation species: consequences for the structure and dynamics of forested ecosystems. *Frontiers in Ecology and the Environment* 3: 479 – 486.

Ellison CA, Evans HC, Djeddour DH, Thomas SE (2008) Biology and host range of the rusts fungus *Puccinia spegazzini* A new classical biological control agent for the invasive, alien weed *Mikania micrantha* in Asia. *Biological Control* 45(1): 133 – 145.

Evans HC (1987) Fungal pathogens of some subtropical and tropical weeds and the possibilities for the biological control. *Biocontrol News and Information* 8: 7-30.

Evans HC, Ellison CA (1990) Classical biological control of weeds with microorganisms: past, present, prospects. *Aspects of Applied Biology* 24: 39-49.

Evans HC, Frohlich J, Shamoun SF (2001) Biological Control of Weeds. In: *Bio-exploitation of Filamentous Fungi* (eds. S.B. Pointing and K.D. Hyde). Fungal Diversity Research Series 6, Fungal Diversity Press, Hong Kong, pp. 349-401.

Fischer AJ, Woods DM, Smith L, Bruckart WL (2007) Development of an optimal release strategy for the rust fungus *Puccinia janceae* var. *solstitialis* for biological control of *Centaurea solstitialis* (yellow starthistle). *Biological Control* 42(2): 161 – 171.

Frank SA (1992) Models of plant pathogen evolution. *Trends in Genetics* 8: 213–219.

Gaertner M, Den Bree A, Hui C, Richardson DM (2009) Impacts of alien plant invasions on species richness in mediterranean-type ecosystems: a meta-analysis. *Progress in Physical Geography* 33: 319 – 338.

Hallett SG (2005) Where are the bioherbicides? *Weed Science* 53: 404-415.

Hasan S (1974) Recent advances in the use of plant pathogens as biocontrol agents of weeds. *Pest Articles and News Summaries* 20: 437-443.

Hasan S. (1980) Plant pathogens and biological control of weeds. *Review of Plant Pathology* 59: 349-355.

Hedja M, Pysek P, Jaroisk V (2009) Impact of invasive plant on the species richness, diversity and composition of invaded communities. *Journal of Ecology* 97: 393 – 403.

Huffaker CB (1976) An overview of biological control, with particular commentary on biological weed control. *Proceedings of the 4th International Symposium on Biological Control of Weeds*. Gainesville: University of Florida. pp. 3-10.

Hulme PE (2009) Trade, transport and trouble: managing invasives species pathways in an era of globalization. *Journal of Applied Ecology* 46: 10 – 18.

Julien M, White G (1997) *Biological Control of Weeds: theory and practical application*. ACIAR Monograph 49: 1-192.

Kiss L (2007) Is *Puccinia xanthii* a suitable biological control agent of *Ambrosia artemisiifolia*? *Biocontrol Science and Technology* 17(5-6): 535 - 539

McFadyen REC (1998) Biological Control of Weeds. *Annual Review of Entomology* 43: 369-393.

McGeoch MA, Butchart SH, Spear D, Marais E, Kleynhans EJ, Symes A, Chancson J, Hoffman M (2010) Global indicator of biological invasion: species numbers, biodiversity impact and policy responses. *Diversity and Distributions* 16: 95 – 108.

Morin J, Evans KJ, Sheppard AW (2006) Selection of pathogens agents in weed biological control: critical issues and peculiarities in relation to arthropod agent. *Australian Journal of Entomology* 48: 349 – 365.

Morin L, Reid AM, Sims-Chilton NM, Buckley YM, Dhileepan K, Hastwell GT (2009) Review of approaches to evaluate the effectiveness of weed biological control agents. *Biological Control* 51: 1- 15.

Morris MJ (1997) Impact of the gall-forming rust fungus *Uromycladium tepperianum* on the invasive tree *Acacia saligna* in South Africa. *Biological Control* 10: 76-82.

Palmer WA, Heard TA, Sheppard AW (2010) A review of Australian classical biological control of weeds programs and research activities over the past 12 years. *Biological Control* 52: 271 – 287.

Raizada P, Raghubanshi AS, Singh JS (2008) Impact of invasive alien plant species on soil processes: a review. *Proceedings of the National Academy of Sciences Indian Section B, Biological Sciences*: 78. 288 – 298.

Tebeest DO (1984) Biological control of weeds with microbial herbicides. *Fitopatologia Brasileira* 9: 443-453.

Tebeest DO, Yang XB, Cisar CR (1992) The status of biological control of weeds with fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 30: 637-657.

Templeton GE (1982) Status of weed control with plant pathogens. In: Charudattan, R. & Walker, H.L. (Eds.) *Biological Control of Weeds with Plant Pathogens*. New York: John Wiley & Sons. pp. 29-44.

Templeton GE (1984) Biological control of weeds with fungal pathogens. *Tropical Pest Management* 30: 333-338.

Tomley AJ, Evans HC (2004) Establishment of, and preliminary impact studies on, the rust, *Maravalia cryptostegiae*, of the invasive alien weed, *Cryptostegia grandiflora* in Queensland, Australia. *Plant Pathology* 53(4): 475-484.

Wapshere, AJ (1982) Biological control of weeds. In: Holzner, W. & Numata, M. (Eds). *Biology and Ecology of Weeds*. The Hague: Dr. Junk Publishers. pp. 47-56.

Watson, AK (1991) The classical approach with plant pathogens. In: TeBeest, D.O. (Ed.). *Microbial Control of Weeds*. New York: Chapman and Hall. pp. 3-23.

ARTIGO 1

***Bipolaris chloridis* a new fungal pathogen of itchgrass (*Rottboellia cochinchinensis*) in Brazil**

***Bipolaris chloridis* a new fungal pathogen of itchgrass (*Rottboellia cochinchinensis*) in Brazil**

Macedo DM¹, Lelis T¹, & Barreto RW¹

1 – Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

Abstract

Bipolaris chloridis was found causing severe leaf spots on *Rottboellia cochinchinensis* which is an exotic weed of growing importance in Brazil. Although this is ranked as one of the world's worst weeds and subjected to surveys for natural enemies in Africa and Asia where species of *Bipolaris* and related genera were collected, this is the first time that *B. chloridis* was found attacking this host. It is also the first time this fungal species is recorded in Brazil. The knowledge of the mycota on this plant in Brazil is of great relevance for classical biological control. If classical introductions of fungi from the centre of origin are considered in the future, this information would be of critical importance to allow avoiding superfluous introduction of fungi that are already present in Brazil without producing any significant impact on weed populations. A preliminary host-range test was performed involving inoculations of *B. chloridis* on *R. cochinchinensis* on the graminicolous species *Chloris gayana*, *Pennisetum purpureum*, *R. cochinchinensis*, *Sorghum bicolor*, *Saccharum officinarum*, *Triticum aestivum* and *Zea mays* and it infected *C. gayana*, and *Z. mays* besides *R. cochinchinensis*.

Introduction

Rottboellia cochinchinensis (Lour) W. D. Clayton. (itch grass) is an annual grass that is native to Africa or Asia, belongs to the family Poaceae and is regarded as one of the world's worst weeds, particularly of graminaceous crops (Holm et al., 1977). In Brazil, where its introduction appears to have occurred relatively recently, it is known as capim-camalote and rabo-de-lagarto (Lorenzi, 2008). It is more commonly found in the north of the country, but is becoming more common and increasing in importance in southeastern Brazilian states such as in São Paulo where it is becoming an aggressive invader of sugarcane (Kissman, 1997). Its historical recognition as a major weed in sugarcane, and the great difficulty of controlling it in this kind of crop raises its importance for Brazil which relies on it for sugar and biofuel production (Millhollon, 1992, Freitas et al., 2004). In maize, itchgrass infestations can lead to productivity reductions of approximately 40% (Strahan et al., 2000). Chemical control is one of the main control measures used against itchgrass, but besides the difficulty of using herbicides to control a grass weed infesting a closely related crop, there are now reports of biotypes resistant to ACCase inhibitors (Valverde, 2007). Besides the problems such as skin irritations caused to workers by itchgrass generates an additional problem for its management (Lorenzi, 2008). This combination of problems highlights the need to resuscitating a biocontrol programme that was conducted by CABI in the 1990s involving the exploration of plant pathogens (Evans et al., 2001). This project involved a combination of two strategies: bioherbicide and classical biocontrol (Ellison and Evans, 1989; Ellison and Evans, 1995). Barreto (2008) suggested that the conclusion of the classical biocontrol programme against *R. cochinchinensis* in Costa Rica which

was interrupted in the late 1990s at its final stages would not only benefit Costa Rica, where crop losses of 45–64% have been recorded in maize infested with itchgrass (Rojas *et al.* 1994) but other Latin American countries, including Brazil. The programme against this weed relied on an Afro-Asian co-evolved, host-specific head smut fungus, *Sporisorium ophiuri* (P. Henn.) Vanky causing systemic infection and capable of transforming the seed heads into columns of powdery black spores which are shed into the soil to infect the next generation of seedlings (Ellison and Evans 1995). Reeder and Ellison (1999) proposed the introduction of the smut into Costa Rica but this project was interrupted because of political/administrative/funding problems without the fungus ever having been released into Costa Rica. The knowledge of the mycobiota on this plant in Brazil is of great relevance for classical biological control. If a classical introduction of fungi from the centre of origin is reconsidered in the future, this information would be of critical importance to allow avoiding superfluous introduction of fungi that are already present in Brazil without producing any significant impact on weed populations. There is no report of a fungal pathogen attacking *R. cochinchinensis* in Brazil (Mendes & Urban, 2010) and this paper includes the first record of a fungus on this host in Brazil. Additionally pathogenicity and a summarized evaluation of host-specificity were performed.

Material and Methods

Specimens of *B. chloridis* were collected and examined while still fresh in the lab and later dried in a plant press. A representative specimen was deposited in the local herbarium (Herbarium of the Universidade Federal de Viçosa). All lesions were associated with structures of a dematiaceous hyphomycete. Slides were mounted in lactophenol and observed under a light microscope Olympus BX 50[®] equipped with a digital camera "Olympus[®] Evolt E-330". A pure culture of the fungus was obtained by transfer of conidia, with a sterile fine pointed needle, from lesions onto Petri plates containing VBA (vegetable broth-agar) according to Pereira et al. (2003). Sample of individuals of *R. cochinchinensis* were collected and dried in a plant press. Slide cultures were prepared in order to better allow observation of conidial germination, and septal formation in conidia.

A pathogenicity/host-range test was performed. Besides plants *R. cochinchinensis*, the following test-plants were utilized: *Chloris gayana* Kunth, *Pennisetum purpureum* Schumach., *Sorghum bicolor* L.(Moench), *Saccharum officinarum* L., *Triticum aestivum* L. and *Zea mays* L. These were selected because of being the original host on which the fungus was described (*C. gayana*) or because their relevance as graminaceous crops. . Inoculum consisted of a 1.0×10^5 conidia / mL conidial suspension. Conidia were obtained by cultivating the fungus in Petri dishes containing 10 ml of VBA for seven days in a growth chamber adjusted to $25 \pm 2^\circ$ C under a light regime of 12 h. Five mycelial plugs were than taken from the margin of these cultures and added to 250 mL flasks containing 150 ml of PCB (potato-carrot-broth, 200 g /L) as described in Lustosa (2004). These flasks were left in an orbital shaker at

150 rpm for five days. An aliquot of 30 mL of a concentrated suspension of the mycelial mass hence obtained was spread on 150 mL plates containing each 40 mL of PCA (potato-carrot-agar, 200g/L). After seven days, 50 mL of sterile water was poured on the surface of each plate and the surface of the sporulating cultures was scraped with a rubber spatula and the suspension was filtered through cheesecloth. The concentration was adjusted to the required concentration and sprayed onto test plants until runoff. Inoculated plants were left in a moist chamber for 48 hours and taken to a greenhouse.

Additionally a test was performed in order to verify whether seeds from infected *R. cochinchinensis* brought from the field carried the fungal pathogen. A blotter test (Machado, 1988) was performed in order to verify this possibility. In the test 50 seeds of diseased plants were placed separately inside plastic boxes lined with sterile humid filter paper and kept in a growth chamber adjusted to $25 \pm 2^\circ$ C under a light regime of 12 h and observed daily for possible growth of the fungal pathogen.

Results and Discussion

The fungus had the typical morphology, for fungi in the genus *Bipolaris* (Sivanesan, 1987) including fusiform conidia, bipolar germination with germ tubes following the conidial axis, hila thickened externally and truncate and sequence of septal formation as described for *Bipolaris*. Furthermore, the combination of morphological features placed it in the species *Bipolaris chloridis* Alcorn as described in Sivanensan (1987) and as given below:

Bipolaris chloridis Alcorn, Mycotaxon 16(3): 373.1983. (Figs 2A-C)

Lesions initially appearing as reddish brown dots, becoming circular to elliptical, pale brown with a reddish brown halo, older lesions were reddish centrally, lesions coalesced and led to the blight of extensive portions of leaves. *External mycelium* absent. *Internal mycelium* inter and intracellular, 3.0-5.0 μm diam, branched, septate, pale brown. *Conidiophores* solitary or in small groups, simple or occasionally branched, cylindrical, straight or flexuous, swollen at base, geniculate, 51-198.0 \times 5.0-9.0 μm diam, 6-9 septate, yellowish brown, smooth; conidiogenous cells terminal, integrated, subcylindrical, 11.0-63.5 \times 4.0-7.5 μm , brown, geniculate, smooth to verruculose. *Conidiogenous loci* conspicuous, 1.5-3.5 μm , darkened, thickened, external. *Conidia* subcylindrical to straight, 34.0-101.5 \times 11.0-21.5 μm , hilum 1.0-3.0 μm wide, 3-9 (commonly 4-8) distoseptate, pale brown to olivaceous, smooth; germ tube oriented along the main conidia axis.

Material examined: BRAZIL, Minas Gerais, Viçosa, Cristais on living leaves of *Rottboellia cochinchinensis*, 06 July 2009, R. W. Barreto (VIC 31266)

This is the first time that *B. chloridis* was found attacking *R. cochinchinensis*. It is also the first time this fungal species is recorded in Brazil. The knowledge of the mycobiota on this plant in Brazil is of great relevance for classical biological control. If classical introductions of fungi from the centre of origin are considered in the future for Brazil, this information would be of critical importance to allow avoiding superfluous introduction of fungi that are already present in Brazil without producing enough impact on weed populations. A biocontrol programme was funded by ODA (presently DFID) UK aimed at surveying fungi to be used as biological control agents against this weed in Costa Rica (Sánchez-Garita & Zúñiga, 1999). The initial tests involved many isolates from different countries in Asia. Two fungal species appeared to have good potential: *Colletotrichum* sp. and *Sporisorium ophiuri* (Henn.) & Vánky. Three *Colletotrichum* sp. isolates (two from Thailand and one from Sri Lanka), had a high level of specificity and virulence and appeared adequate for mycoherbicide development. However, these isolates were not virulent to all *R. cochinchinensis* biotypes. In *S. ophiuri*, the pathogenicity test showed that teliospores of the pathogen formed on seedheads, provoke systemic infections of itchgrass and potentially can render individual plants sterile. Nevertheless a high concentration of teliospores is necessary for infection to occur and the natural spread of teliospores is difficult for long distances (Ellison and Evans, 1995). Recently, a *Exserohilum prolatum* K.J. Leonards & Suggs isolate, was studied in Malaysia for bioherbicide development. Unfortunately high concentrations of inoculum are necessary and

three successive application are needed to achieve satisfactory control levels (Alloub et al., 2009).

Pathogenicity of *B. chloridis* to *R. conchinchinensis* was proven. Initial leaf spot symptoms appeared on itchgrass only two days after inoculation. Additionally disease symptoms appeared on corn and Rhodes grass. Symptoms in Rhodes grass were observed 10 to straw-colored spots days after inoculation as circular chlorotic gray punctuations e 1.0 cm of diam. Which increased no further in siz or number. In corn, the symptom (chlorotic to straw elliptical lesions) appeared after r one week but, as in Rhodes grass did not develop further (Table 1) s. Isolations from necrotic tissues confirmed that *B. chloridis* was colonizing the diseased tissues.

Only three species of *Bipolaris* have been recorded on *Rottboellia* spp.: *B. maydis* (Y. Nisik. & C. Miyake) Shoemaker, *B. peregianensis* Alcorn and *B. peroditis* Alcorn (Farr et al., 2010; Sivanesan, 1987).

Bipolaris chloridis appeared preliminarily to be relavively host-specific fungus, particularly when compared to many other grass pathogenic species in this genus. *Chloris gayana* was its only known host until now (Sivanesan, 1987; Farr and Rossman, 2010). Records were from Australia, India, Kenya, Malawi, Tanzania and Zambia (Sivanesan, 1987; Farr et al., 2010). It is, nevertheless also capable of attacking itchgrass and corn. Additional tests involving other grass species are needed in order to clarify this. This fungus was not known to occur in Brazil and it may either have been introduced with *R. conchinchinensis* or with *C. gayana* seeds. This possibility was strengthened by the results of the blotter test which yielded a 100% of infestation by *B. chloridis* collected in the field on diseased plants after 4 days. (Fig 2D).

Table 1. Preliminary host-range evaluation

TEST-PLANTS	DISEASE
¹ Chloris gayana	+
Pennisetum purpureum	-
² Rottboellia cochinchinensis	+
Sorghum bicolor	-
Saccharum officinarum	-
Triticum aestivum	-
Zea mays	+

1 – original host of *B. chloridis*

2 – new host

Acknowledgments

The authors thank FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) and USDA (United States Department of Agriculture) for financial support.

References

Alloub, H, Juraimi AS, Kadir J, Sastroutomo S, Begum M (2009) Field efficacy of *Exserohilum prolatum* – A potencial mycoherbicide for biological control of itchgrass (*Rottboellia cochinchinensis*). Journal of Biological Sciences 9(2): 119 – 127.

Barreto RW (2008) Latin American weed biological control science at the crossroads. In: XII International Symposium on Biological Control of Weeds, 2008, La Grande Motte. eds: Julien MH, Sforza R, Bon MC, Evans HC, Hatcher PE, Hinz HL, Rector BG. Proceedings of the XII International Symposium on Biological Control of Weeds. Wallingford : CAB International, p. 109 - 121.

Ellison, CA, Evans HC (1989) Preliminary assessment of fungal pathogens as biological control agents for *Rottboellia cochinchinensis*. Proceedings of the VII Symposium on Biological Control of Weeds, Mar. 6- 11, Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale, Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste, Rome, Italy DSIR/CSIRO, pp. 477 – 482.

Ellison CA, Evans HC (1995) Present status of biological control programme for the gramineaceous weed *Rottboellia cochinchinensis*. Proceedings of the VIII SympósiuM on Biological Control of Weeds, Feb. 2- 7, Lincoln University, Canterbury, New Zealand, DSIR/CSIRO, Melbourne, Australia, pp. 57 – 58.

Evans HC, Frohlich J, Shamoun, SF (2001) Biological Control of Weeds. Bio-Exploitation of Filamentous Fungi 6: 349-401.

Farr DF, Rossman AY (2010) Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Available at: <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/> [Verified 22 February 2010]

Freitas SP, Oliveira AR, Freitas SJ, Soares LMS (2004) Controle químico de *Rottboellia exaltata* em cana-de-açúcar. Planta Daninha 22(3): 461 – 469.

Holm LG, Plucknett DL, Pancho JV, Herberger JP (1977) The World's Worst Weeds, Distribution, and Biology. Honolulu, HI: University Press of Hawaii. 609 pp.

Kissmann CG (1997) Plantas infestantes e nocivas. t.I – Plantas inferiores; monocotiledôneas - 2ª. ed. São Paulo: BASF. 825pp.

Lorenzi H (2008) Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 4ª. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum.608pp.

Machado JC (1988) Patologia de sementes: fundamentos e aplicações. Lavras: UFLA/FAEPE. 106 pp.

Lustosa DC (2004) *Corynespora cassicola* e *Cercospora sp.* como mico-herbicida para o controle biológico de *Commelina benghalensis*. Tese de Mestrado. Viçosa-MG. Universidade Federal de Viçosa. 91 pp.

Mendes MAS, Urben AF (2010) Fungos relatados em plantas no Brasil, Laboratório de Quarentena Vegetal. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Available at: <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/fgbanco01.asp> [Verified 22 February 2010]

Millhollon RW (1992) Effects of itchgrass (*Rottboellia cochinchinensis*) interference in growth and yield of sugarcane (*Saccharum sp.*) hybrids. *Weed Science* 40: 48 – 53.

Pereira JM, Barreto RW, Ellison CA, Maffia, LA (2003) *Corynespora cassicola* f. sp *lantanae*: a potential biocontrol agent from Brazil for *Lantana camara*. *Biological Control* 26(1): 21-31.

Reeder RH, Ellison CA (1999) Biological control of *Rottboellia cochinchinensis* with smut *Sporisorium ophiuri*. Potential and risks. In: *Controle Biológico de Rottboellia cochinchinensis* CATIE, Crita, V. S. (ed.). Costa Rica. Pp. 101 – 135.

Rojas CE, de LA Cruz R, Merayo A (1994) La profundidad y duración en el suelo de la semilla de caminadora (*Rottboellia cochinchinensis* (Lour.) Clayton) y su efecto sobre la viabilidad y persistencia en el trópico seco. Manejo Integrado de Plaga 32:25-29.

Sánchez-Garita V, Zúñiga C (1999) Patógenos nativos de América Latina con potencial como agentes de control biológico de malezas con énfasis en *Rottboellia cochinchinensis* (native pathogens with potential as biological control agents of weeds with particular reference to *Rottboellia cochinchinensis*). In: Sánchez-Garita V (Ed) Control Biológico de *Rottboellia cochinchinensis*, pp. 157-187. CATIE, Costa Rica.

Sivanesan A (1987) Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Exserohilum* and their teleomorphs. Mycological Papers: 158. 261p.

Straham RE, Griffin JL, Reynolds DB, Miller DK (2000) Interference between *Rottboellia cochinchinensis* and *Zea mays*. Weed Science 48: 205 – 211.

Valverde BE (2007) Status and management of grass-weed herbicide resistance in Latin America. Weed Science 21: 310 – 323.

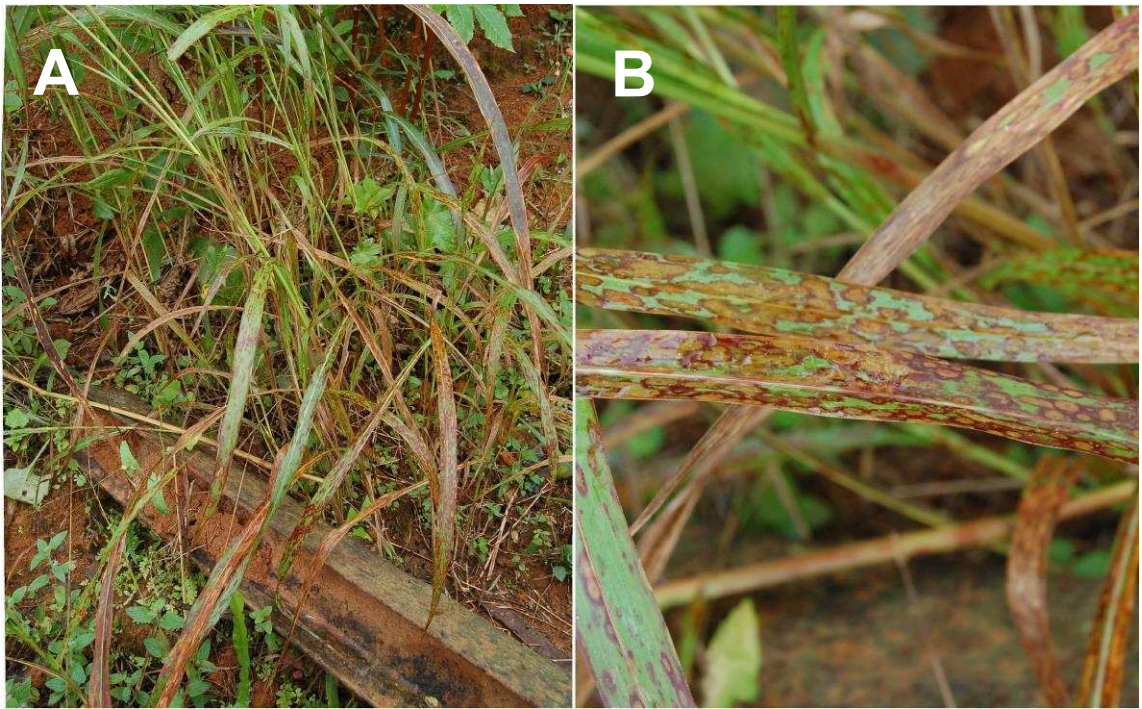


FIG1. A *Rottboelia cochinchinensis* infected by *Bipolaris chloridis* in the field.**B** Close-up of leaves of *R. cochinchinensis* infected by *B. chloridis* showing coalescence of lesions and necrosis of wide areas of the foliges

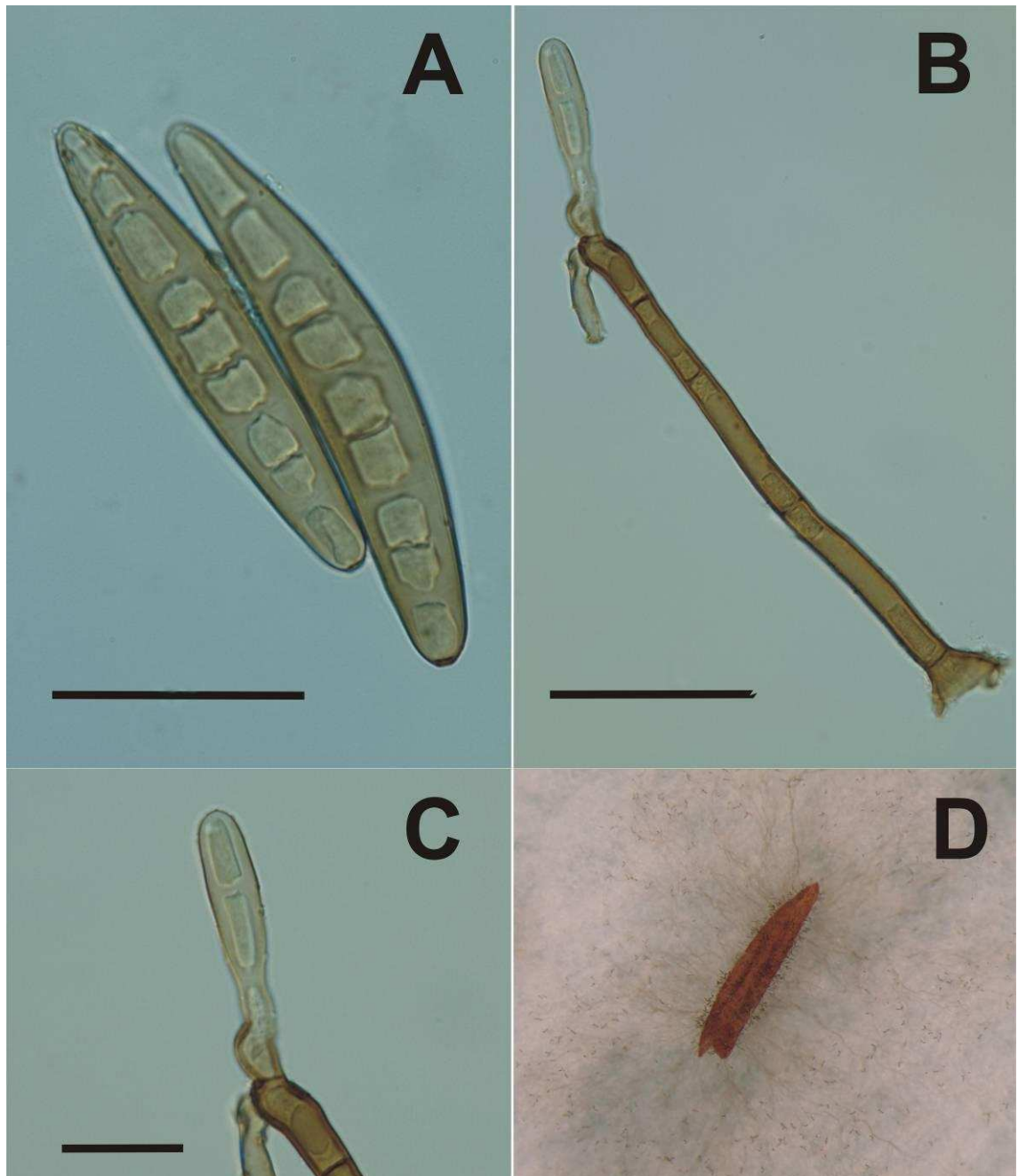


FIG 2. *Bipolaris chloridis* from *Rottboellia cochinchinensis* (a) conidia (bar = 40 μm); (b) conidiophore bearing immature conidium (bar = 45 μm); (c) close-up of the conidiogenous cell (bar = 20 μm); (d) colony of *B. chloridis* formed on seed collected in the field from infected plant and used in a blotter test.

ARTIGO 2

Micobiota fitopatogênica da planta invasora *Tradescantia fluminensis* no Brasil, com particular referência ao controle biológico clássico

Short Title: *Tradescantia fluminensis* (Commelinaceae)

Micobiota fitopatogênica da planta invasora *Tradescantia fluminensis* no Brasil, com particular referência ao controle biológico clássico

Davi Mesquita de Macedo

Olinto Liparini Pereira

Robert Weingart Barreto¹

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

RESUMO

Tradescantia fluminensis (trapoeraba branca) é uma planta herbácea da família Commelinaceae eventualmente utilizada como ornamental. Após sua introdução para essa finalidade na Nova Zelândia e outras regiões do mundo ela se tornou uma invasora agressiva nos ecossistemas naturais, provocando graves desequilíbrios ambientais, como perdas na biodiversidade. Esta espécie tem sido alvo de um programa de controle biológico em andamento há alguns anos envolvendo o levantamento e avaliação do potencial de insetos e patógenos coletados no Brasil. Os resultados obtidos nos levantamentos efetuados ao longo dos últimos cinco anos revelaram a ocorrência de nove fungos fitopatogênicos em associação com *T. fluminensis* e espécies afins incluindo três espécies aqui descritas como novas para a ciência:

Ceratobasidium sparsum, *Mycosphaerella tradescantiae* (mancha foliar) e *Septoria paranaensis* sp. nov (mancha foliar). Uma espécie nova pertencente

ao gênero *Kordyana*, (carvão branco) foi descrita e avaliada e os resultados do estudo estão sendo apresentados separadamente. Além destas espécies, foram também coletadas sobre este hospedeiro: *Cercospora apii* (mancha foliar), *Colletotrichum falcatum* (antracnose), *Rhizoctonia solani* (requeima), *Sclerotium rolfsii* (podridão) e *Uromyces commelinae* (ferrugem). Os fungos causadores de ferrugem e carvão branco parecem ter mais potencial para a utilização como agentes de controle biológico clássico.

Palavra-chave: Controle biológico clássico, espécies novas, fitopatógeno, invasão biológica, taxonomia.

Introdução

Há registros de mais de 300 espécies de plantas comportando-se como invasoras em ambientes exóticos (McGeoch et al., 2010). Estas são consideradas uma grande ameaça para a biodiversidade global em função de sua amplitude e magnitude (Hulme, 2009) contribuindo para uma dramática redução na riqueza das espécies nativas nos ambientes onde foram introduzidas (Ellison, 2005; Gaertener et al., 2009). Além disso, essas invasões biológicas promovidas por plantas exóticas contribuem para a alteração em processos nos ecossistemas tais como a ciclagem de nutrientes (Raizada et al., 2008). A redução das espécies nativas ocorre por diversos fatores, como, competição com as espécies de plantas nativas e efeitos indiretos advindos da eliminação de espécies na base de teias alimentares (Gaertner et al., 2009), mudanças na estrutura da comunidade (Hedja et al., 2009) e na diversidade genética (McGeoch et al., 2010). Na tentativa de mitigar os problemas causados pelas plantas invasoras exóticas sem prejudicar ainda mais a biodiversidade, o controle biológico se apresenta como a única medida de controle adequada para minimizar os problemas e favorecer o retorno a uma condição de equilíbrio ambiental, havendo diversos e notórios exemplos de sucesso (Charudattan, 2001). O início do controle biológico de plantas invasoras se deu na metade do século XX, com a liberação de insetos para o controle de plantas invasoras, (McFadyen, 1998), mas foi somente no início da década de 70 que implementou-se o controle clássico com a introdução de fungos fitopatogênicos (Hasan, 1980, Bruzzese & Field, 1985, Barreto & Evans, 1988, Morris, 1997). Na história do controle biológico de plantas invasoras diversas revisões foram publicadas com uma abordagem completa sobre o assunto (Hasan, 1974; Huffaker, 1976; Hasan, 1980; Templeton, 1982;

Wapshere, 1982; Te Beest, 1984; Templeton, 1984; Evans, 1987; Adams, 1988; Ayres & Paul, 1990; Evans & Ellison, 1990; Charudattan, 1991; Watson, 1991; Te Beest *et al.*, 1992; Julien & White, 1997; Hallett, 2005; Morin *et al.*, 2009; Palmer *et al.*, 2010). Há vários exemplos recentes de trabalhos de controle biológico de plantas daninhas envolvendo fungos fitopatogênicos que alcançaram sucesso (Barton *et al.*, 2007; Dhileepan, 2007; Fischer *et al.*, 2007; Kiss, 2007; Ellison *et al.*, 2008).

O controle biológico de plantas invasoras com a utilização de fitopatógenos envolve duas principais estratégias: o método clássico ou inoculativo (envolvendo a introdução de um patógeno inimigo natural de uma “planta-alvo” desde o seu centro de origem até a nova área de distribuição da planta, onde esta livre então de seus inimigos naturais tornou-se agressiva, visando restabelecer o equilíbrio) e o método de mico-herbicida ou inundativo; tipicamente envolvendo o uso de fungos fitopatogênicos endêmicos, já associados à planta-alvo, que são produzidos em massa, formulados e aplicados de modo semelhante a um herbicida químico onde a população da planta daninha está estabelecida (Evans, 2001). O presente trabalho contempla a estratégia clássica ou inoculativa.

No controle biológico clássico, a descoberta e escolha do agente são passos fundamentais para o sucesso na utilização da estratégia. Neste caso, os organismos escolhidos como potenciais agentes de biocontrole não podem representar uma ameaça para as plantas não-alvo (sejam elas plantas nativas ou plantas exóticas cultivadas na área onde se pretende introduzir o agente). Para tal, o agente deve ser, em geral, altamente específico. Estes requisitos são fundamentais para que a introdução do organismos seja permitida pelos

órgãos oficiais responsáveis da permissão da importação do organismo e pelo público local (Morin et al., 2006). Nos últimos 40 anos, a utilização de fitopatógenos no controle biológico de plantas invasoras tem se disseminado (Charudattan, 2001). Dentre os fitopatógenos utilizados como agente de biocontrole, os fungos fitopatogênicos tem sido os mais bem aceitos, devido a ausência da necessidade de vetores para a sua introdução e muitos deles possuem especificidade de hospedeiro (Charudattan, 2001). Isso é particularmente acentuado para os fungos biotróficos, que tem sido o grupo de fungos mais usados como agentes de biocontrole de plantas invasoras. Fungos como os agentes etiológicos de ferrugens e carvões além de comumente muito específicos, causam danos severos sobre as plantas-alvo, apresentam elevada capacidade de dispersão e facilidade de se perpetuarem no ambiente quando as condições ambientais são favoráveis (Frank, 1992). O exemplo pioneiro de controle biológico clássico de plantas invasoras com fungos fitopatogênicos também é um exemplo notório de sucesso da estratégia. Ele envolveu o uso de um fungo biotrófico, a ferrugem *Puccinia chondrillina* Bubák, para o controle de *Chondrilla juncea* L. na Austrália (Adams, 1988; Hasan, 1980). Vários outros exemplos bem sucedidos do uso de ferrugens se seguiram tais como os projetos visando o controle biológico de: *Acacia saligna* (Lab.) Wend., (Morris, 1997), *Carduus theomeri* (Tourn) (Bruckart & Dowler, 1986), *Cryptostegia grandiflora* R. Br. (Tomley & Evans, 2004), *Rubus* spp. (Bruzzese & Field, 1985). Além das ferrugens, os carvões brancos têm várias das características favoráveis enumeradas para fungos patogênicos biotróficos como as das ferrugens. Existe ainda apenas um exemplo de fungo deste grupo utilizado em programa de biocontrole: *Entyloma ageratinae* R. W. Barreto & H. C. Evans utilizado com grande sucesso para o controle de *Ageratina riparia* (Regel) R.M.

King & H. Rob. no Havaí e na Nova Zelândia (Barton et al., 2007). O Brasil é o maior país neotropical, e os neotrópicos são o centro de origem de muitas plantas invasoras de grande importância no mundo. Alguns grupos de pesquisa têm atuado no sentido de levantar e estudar artrópodes e fungos para o controle biológico de plantas daninhas nativas do Brasil (Barreto, 2008). Trabalhos voltados ao controle biológico de plantas invasoras com fungos fitopatogênicos coletados no Brasil tem sido desenvolvidos ativamente desde a década de 90 no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, já tendo culminado nas duas únicas introduções de fungos fitopatogênicos brasileiros com esta finalidade respectivamente de *Miconia calvescens* DC. no Havaí (Barreto et al., 2001b) e *Lantana camara* L. na Austrália (Barreto et al., 2001a). Os fungos, causadores respectivamente da antracnose em miconia e ferrugem em *Lantana*, se estabeleceram com sucesso nas regiões do globo onde foram introduzidos. Seu impacto sobre as populações das plantas alvo já estão sendo notados.

Nessa tese apresenta os resultados de pesquisas envolvendo levantamento e estudo de especificidade de fungos fitopatogênicos associados a três espécies de plantas invasoras de grande importância. Duas são nativas do Brasil, *Tradescantia fluminensis* Vell. e *Schinus terebinthifolius* Radd., e a terceira é exótica *Rottboellia cochinchinensis* (Lour.) W. D. Clayton.

Material e métodos

O levantamento realizado entre 2005-2009 foi antecedido por uma busca na literatura e nos arquivos dos principais herbários das regiões do sul e sudeste do país, para verificar registros de ocorrência de *T. fluminensis* pelo país de modo a orientar os trabalhos de levantamento no campo. Foram levantados registros nos seguintes herbários: Instituto de Botânica de São Paulo e os Herbários da Unicamp, Jardim botânico, Museu Botânico Municipal de Curitiba e o Nacional do Rio de Janeiro. Os procedimentos para a coleta e conservação do material durante o levantamento foram semelhantes aos descritos por Barreto e Evans (1994). As expedições de coleta foram concentradas nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande Sul, mas coletas também foram feitas nos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais. Quando necessárias plantas infectadas por patógenos, sobretudo os suspeitos de serem biotróficos, tiveram mudas retiradas do campo e trazidas para uma área no campus da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, Minas Gerais) onde foram cultivadas e mantidas sob telado ou sob condições controladas, dependendo das circunstâncias. No caso de fungos necrotróficos, realizou-se o isolamento em cultura pura pela transferência de estruturas fúngicas com estiletes esterilizados para placas de Petri contendo CVA (Caldo de Vegetais–Agar) (Pereira et al, 2003). Depois de obtidas as culturas puras, estas foram preservadas em sílica-gel seguindo-se o método descrito em Dhingra & Sinclair (1997).

Após a obtenção da cultura pura, foi realizada a descrição de cultura em 3 meios diferentes : CVA (caldo de vegetais Agar); BDA (Batata Dextrose Agar) e EMA 2% (Extrato de Malte Agar). Para a descrição, foram utilizados placas de

petri de plástico (90 mm). Foram utilizados dois tratamentos de fotoperíodo: fotoperíodo de 12h e no escuro. As placas foram acondicionadas em uma câmara de crescimento a 25 °C por 10 dias. Neste teste foram utilizados três repetições para cada meio e regime de luz (1 repetição = 1 placa de petri). Na descrição de cultura foi avaliado o crescimento, topografia, textura e a coloração da colônia. Cores foram identificadas conforme Rayner (1970).

A morfologia dos fungos foi examinada após a preparação de lâminas contendo as estruturas dos fungos montadas em água, lactofenol ou lactofucsina. Quando necessário foram preparadas seções de estruturas fúngicas com o auxílio de Criostato "MICROM[®] HM 520". Exames e mensurações foram feitas sob um microscópio de luz "Olympus BX 51" equipado com uma câmera fotográfica digital Olympus[®] e-volt 330.

Para um dos fungos (posteriormente identificado como *R. solani*), após a obtenção de cultura pura foram preparadas microculturas e as hifas crescidas sobre a lâmina foram coradas com SYBR[®] green como descrito em Pereira et al. (2005) para verificação do número de núcleos por célula da hifa. Foi feito o registro fotográfico da condição cariológica do micélio com um microscópio de luz Olympus BX 50 com sistema de inflorescência e uma câmera digital "Olympus E300" acoplada. A captação das imagens foi realizada com o programa Image ProPlus (versão 4.5.0.29). Amostras representativas foram depositadas no herbário da Universidade Federal de Viçosa (Herbário VIC).

***Cercospora apii* Fresen. emend. (s. lat)** (Fig 1)

Lesões em folhas vivas necróticas, negras com aspecto encharcado em ambas as faces da folha, quando sob condições úmidas e marrons aczentadas quando secas, 1,0-3,0 cm. *Conidióforos* fasciculados com poucos a muitos conidioforos, sub-cilíndricos retos, 350,0–115.0 x 4,0–5,0 μm , 6–8 septos, não ramificados, marrom escuros, lisos; *Células conidiogênicas* terminais, integradas, cilíndricas a subcilíndricas, 60,0–20,0 x 5,0–4,0 μm , cinza claro, *Loci conidiogênicos* 4,0–3,0 μm , espessados e negros; Conídios isolados, cilíndricos a filiformes, retos a sigmóides, 150,0-400,0x 3,0–4,0 μm μm , 16-34septos; cicatriz conidial espessada e escurecida, hialinos e lisos.

Em cultura: O crescimento da colônia cultivado em CVA, a porção central da colônia apresentava micélio aéreo de coloração branca estendendo-se para a periferia com a coloração cinza; textura feltrosa e pigmentação vinácea nos bordos. O reverso, a colônia apresentava uma coloração negra esverdeada na parte central; evidências de zonação diurna; os bordos da colônia apresentavam uma coloração marrom aczentada com interferência da pigmentação. A colônia em CVA no escuro apresentava-se com micélio aéreo cinza na porção central da colônia, já na periferia, o micélio aéreo era branco sobre um micélio cinza escuro, colônia plana; textura flocosa; presença de zonação diurna na maioria das placas. O reverso, a colônia continha uma porção central negra seguida por uma área aczentada ou vinácea; com zonação diurna; pigmentação difusa no meio era escassa. Em EMA no claro, o micélio aéreo apresentava uma textura feltrosa na região central, a região periférica continha uma coloração irregular com uma porção aczentada levemente esverdeada seguida de pontuações vinácea (Cor 120). O reverso

apresentava uma coloração negra esverdeada na porção central da colônia e a periferia arroxeadada. A colônia cultivada no escuro, apresentava a região central branca com coloração marrom; a colônia apresentava uma elevação na região central e a periferia ondulada e cinza; textura cotonosa. O reverso da colônia apresentava uma coloração verde escuro passando a cinza esverdeada e a periferia da colônia apresentava um micélio branco; zonação diurna e a periferia branca. A colônia cultivada em BDA, apresentava uma colônia elevada branco a cinza claro (Cor 120), seguido de um anel cinza claro a escuro; liberação de pigmento vináceo difuso ao meio. O reverso apresentava uma coloração preta a marrom claro; micélio imerso vináceo; micélio difuso ralo. No escuro, a colônia apresentava uma coloração cinza claro seguido de um anel com micélio cotonoso branco; colônia continha uma declinação até a periferia de coloração cinza claro (Cor 125) e textura feltrosa. O reverso apresenta um centro marrom escuro ligeiramente acinzentado com a periferia marrom vináceo e sem a presença de zonação diurna.

Material examinado: BRAZIL, Minas Gerais, Quitandinhas-Bom Jardim de Minas, em folhas vivas de *Tradescantia fluminensis*, 18 November 2005, O. L. Pereira (VIC 31365); BRAZIL, São Paulo, Cajati (BR 101 – Km 521), em folhas vivas de *Tradescantia fluminensis*, 19 November 2005, O. L. Pereira (VIC 31364); BRAZIL, Paraná, Curitiba, em folhas vivas de *Tradescantia fluminensis*, 20 November 2005, O. L. Pereira (VIC 31363). BRAZIL, Santa Catarina, Serra do Rio do Rastro, em folhas vivas de *Tradescantia fluminensis*, 24 November 2005, O. L. Pereira (VIC 31362); BRAZIL, Minas Gerais, Viçosa, em folhas vivas de *Tradescantia fluminensis*, 05 February 2009, D. M. Macedo (VIC 31371)

Notas: Cercospora apii é um nome antigo e aplicado a um táxon que teve uma delimitação variada ao longo da história. Crous & Braun, (2003) discutiram os conceitos aplicados para esta espécie e os problemas decorrentes dos tratamentos diferentes dados ao taxon, propondo um tratamento abrangente para a espécie, considerando-a polífaga e variável morfológicamente. No caso do isolado encontrado em *T. fluminensis*, este apresenta características semelhantes de *C. apii* descritas por Crous & Braun (2003). Este é o primeiro relato de *C. apii* num representante da família Commelinaceae (Farr & Rossman, 2010; Mendes & Urban, 2010).

O isolado de *Cercospora* obtido neste levantamento não teria, em princípio, potencial para utilização como agente de biocontrole, pois seria um fungo polífago. No entanto, existe a necessidade de se avaliar a especificidade deste fungo conduzindo-se um teste centrífugo-filogenético (Wapshere, 1974), pois há autores que consideram o tratamento dado por Crous & Braun (2003) como sendo demasiadamente abrangente, terminando por englobar populações que são específicas e merecem reconhecimento como sendo espécies distintas (U. Braun, comunicação pessoal).

***Ceratobasidium tradescantiae* sp. nov. D. M. Macedo, R. W. Barreto & O. L.**

Pereira (Fig. 2)

Etimologia: folhas do hospedeiro do gênero *Tradescantia*

Holotipo: BRAZIL, Rio Grande do Sul, Vale dos Vinhedos – entrada de Santa Tereza, em folhas vivas de *Tradescantia fluminensis*, 23 April 2004, O. L.

Pereira (VIC 31342)

Colônias sobre folhas na forma de crescimento esparso e pulverulento na face abaxial, por vezes tomando quase toda a superfície das folhas mas não envolvendo alteração ou sintoma visível na superfície adaxial. *Micélio externo* formando um subículo de micélio ramificado, efuso, 4.0–7.0 μm de diam, sem grampo de conexão, parede espessa, septado, hialino, liso. *Basídio* geralmente esférico a elipsóides, 8.0–14.0 x 6.0–10.0 μm ; 2-4 esterigmas, 3.0-8.0 x 1.0-2.0 μm ; *Basidiósporos* elipsóides a subesféricos, apiculados basalmente, 7.0-9.0 x 5.0–7.0 μm , hialinos, lisos.

Material examinado: BRAZIL, Rio Grande do Sul, Vale dos Vinhedos – entrada de Santa Tereza, em folhas vivas de *Tradescantia fluminensis*, 23 Abril 2004, O. L. Pereira (VIC 31342); BRAZIL, Rio Grande do Sul, São Marcos (BR 116), em folhas vivas de *Tradescantia fluminensis*, 27 Novembro 2005, O. L. Pereira (VIC 31358); BRAZIL, Santa Catarina, Serra do Rio do Rastro, em folhas vivas de *Tradescantia fluminensis*, 24 Novembro 2004, O. L. Pereira (VIC 31359); BRAZIL, Santa Catarina, Rota do Sol, em folhas vivas de *Tradescantia fluminensis*, 24 Novembro 2005, O. L. Pereira (VIC 31360);

Notas: O gênero *Ceratobasidium* inclui fungos com hábitos variando de saprofiticos a simbiontes e incluindo algumas espécies fitopatogênicas. São comumente encontrados no solo, matéria orgânica e em em associação micorrizica com representantes de Orquidaceae (Garcia et. al., 2006). Este táxon foi reclassificado por Roberts (1999), que levou a aceitação atual de apenas 10 espécies: *C. calosporum* D.P. Rogers, *C. bicornis* J. Erikss. & Ryvardeen, *C. stridii* J. Erikss. & Ryvardeen, *C. anceps* (Bres. & Syd.) H.S. Jacks., *C. cornigerum* (Bourdot) D.P. Rogers, *C. pseudocornigerum* M.P. Christ., *C. noxium* (Donk) P. Roberts, *C. setariae* (Sawada) Oniki, Ogoshi & T. Araki, *C. globisporum* Warcup & P.H.B. Talbot e *C. sphaerosporum* Warcup & P.H.B. Talbot (Roberts, 1999). O agrupamento entre as espécies descritas de *Ceratobasium* levou em consideração a diferenciação da textura do himênio, morfologia dos basídios e dos basidiósporos. A espécie relatada neste trabalho tem similaridades com *C. cornigerum* e *C. setariae*, mas se diferencia destas duas espécies por apresentarem cordões miceliais e os basidiósporos serem menores que os encontrados nestas duas espécies. No Brasil, somente três espécies foram descritas, mas associadas a hospedeiros de outras famílias: *C. anceps* (em Euphorbiaceae), *C. lantana-camaruae* H.C. Evans, R.W. Barreto &

C.A. Ellison (Verbenaceae), *C.noxium* (Piperaceae) (Mendes & Urben, 2010).

Estas também possuem nítidas diferenças morfológicas em relação às relatada para o fungo descrito no presente trabalho. Este é primeiro fungo em *Ceratobasidium* a ser relatado numa planta da família Commelinaceae (Farr & Rossman, 2010). Repetidas tentativas de isolamento deste fungo fracassaram o que sugere que se trate de um organismo biotrófico. Considerando-se a virtual ausência de sintomas nas plantas, mesmo quando as colônias formadas sobre as folhas são abundantes, conclui-se que o status patológico desta espécie é dúbio e que ele não apresenta potencial para a utilização como agente de controle biológico.

***Colletotrichum falcatum* Went (Fig 3)**

Lesões em ambas as faces da folha, inicia-se, com queimas foliares marrom claro, posteriormente, as lesões apresentam uma porção central palha, bordas negras e halo marrom avermelhado, 0.9-1.5 x 0.6-2.0 mm; *Micélio interno* indistinto. *Conidiomas* acervulares, subcuticulares, isolados ou em grupos; *Conidióforos* subcilíndricos reduzidos à célula conidiogênica fialídica, 14.0–20.0 x 3.0–5.0 μm , subhialinos, lisos. *Conídios* falcados, 20.0–30.0 x 3.0–4.0 μm , asseptados, gutulados, hialinos e lisos. *Apressórios* ovalados a clavados, 6.0–11.0 x 4.0–6.0 μm , marrom claros.

Em cultura: em CVA micélio aéreo ralo, colônia imersa com zonação diurna; faixas densas irradiando no sentido do centro para a periferia com coloração escura e entremeio descolorido. No escuro, a colônia apresentava micélio imerso branco, crescimento externo ralo; área central da colônia apresentava micélio dendrítico com ausência de zonação diurna. O reverso da colônia que permaneceu no escuro apresentava as mesmas características da colônia que ficou no fotoperíodo. A colônia cultivada em BDA sob fotoperíodo apresentava uma colônia plana com zonação diurna tênue; micélio aéreo pouco denso; textura feltrosa e com a coloração cinza pálido púrpuro a cinza camundongo palha (cor 117). No reverso, a colônia apresentava coloração preta esverdeada e zonação diurna (cor 124). A colônia no escuro apresentava micélio aéreo esbranquiçado; zonação diurna ausente; a porção central da colônia havia presença de gotículas de água. O reverso apresentava as mesmas características do reverso da colônia que permaneceu sob fotoperíodo. As colônias que foram cultivadas em EMA, a colônia era plana predominantemente imersa; havia uma porção zonada e outra com crescimento dendrítico. O reverso apresentava as mesmas características foram descritas acima. No escuro, a colônia apresentava um micélio ralo, quase ausente, sobre uma colônia imersa (cor 124) dendrítica a denso com periferia radial. O reverso apresentava as mesmas características.

Material examinado: BRASIL, Rio Grande do Sul, São Marcos, em folhas vivas de *Tradescantia fluminensis*, 13 Julho 2008, O. L. Pereira (VIC 31366)

Notas: O gênero *Colletotrichum* inclui alguns dos exemplos mais conhecidos de utilização de fitopatógenos no controle biológico de plantas daninhas (Bailey & Jeger, 1992; Mordue, 1967). Dentre os principais exemplos de desenvolvimento de mico-herbicidas estão produtos envolvendo o uso de *Colletotrichum* como COLLEGO (Bowers, 1986) e BIOMAL (Mortensen & Mokowski, 1997) e para a estratégia clássica também há exemplos (Barreto et al., 2001). *Colletotrichum falcatum* é um fungo comumente encontrado associado a gramíneas e outras espécies de monocotiledôneas. Na família das Commelinaceae só há relato de *C. falcatum* associado a *Dichorisandra* sp. e *Zebrina pendula* Schinzl. na Flórida. Em *T. fluminensis*, verificou-se a somente a ocorrência de uma espécie indeterminada de *Colletotrichum* sp. na Flórida e no Texas (Farr & Rossman, 2010), mas o status patológico destas ocorrências é obscuro. O fungo encontrado sobre *T. fluminensis* tem morfologia semelhante à descrita para *C. falcatum* por Bailey & Jeger (1992). O fungo aqui descrito apresenta conídios ligeiramente menores, o que é aqui considerado insuficiente para uma distinção taxonômica num grupo de fungos com morfologia bastante variável.

***Mycosphaerella tradescantiae* nov. sp. D. M. Macedo, O. L. Pereira & R. W.**

Barreto (Fig 4-5)

Mycobank: MB 518243

Etimologia: em referencia ao gênero do hospedeiro

Lesões em ambas as faces da folha, inicialmente, pontuações necróticas progredindo para lesões cilíndricas a subcilíndricas, halo negro na periferia, palha, 3.0–8.0 x 3.5–9.0 mm, na face adaxial da folha; *Micélio interno* intercelular e intracelular, 2.0–5.0 µm diam, ramificado, septado e hialino. *Pseudotécios* semi-imersos, globoso a subgloboso, 54.0-90.0 x 53.0-115.0 µm parede composta de textura angularis, 7.0–14.0 µm de espessura, marrom escuros, lisos; *Filamentos interteciais* ausentes; *Ascas* bitunicadas, arranjadas paralelamente, ovais a elipsóides, 35.0–50.0 x 8.0–13.0 µm, com 8 ascosporos; *Ascosporos* elípticos a fusiformes , 13.0–15.0 x 2.0–3.0 µm, 1 septo, hialinos, lisos.

Material examinado: BRASIL, Santa Catarina, Sombrio (BR 101), em folhas vivas de *Tradescantia fluminensis*, 25 Novembro 2005, O. L. Pereira (VIC 31361).

Nota: O gênero *Mycosphaerella* inclui atualmente, aproximadamente 3000 espécies e foi relatado em mais de 800 famílias botânicas (Aptroot, 2006). Espécies de *Mycosphaerella* fitopatogênicas, bem como seus anamorfos, estão comumente associadas a manchas foliares que podem reduzir a área

fotossintética das plantas, mas podem também estar associados a cancrios e machas nos frutos (Crous, 2009). O gênero é caracterizado morfológicamente o ascoma apresentarem células maiores como se fosse células parenquimatosas, ausência da formação de clipeo e filamentos intersticiais; ascas bitunicadas, periforme e cilíndricas a clavadas, 8 ascósporos; ascósporos hialinos, unisseptados, cuja posição pode ser mediana a supramediana (Aptroot, 2006). Fungos do gênero *Mycosphaerella* são, geralmente, considerados específicos em relação ao hospedeiro, mas há trabalhos demonstrando que algumas espécies possuem mais de um hospedeiro (Verkley et al., 2004). Na família Commelinaceae, um fungo do gênero *Mycosphaerella*, *Mycosphaerella tetraspora* Seaver, foi relatado em *Commelina elegans* Seaver & Chandón em Porto Rico (Farr & Rossman, 2010), mas recentemente foi recombinação como *Glomerella tetraspora* (Seavear) Aptroot (Aptroot, 2006). Conclui-se que este é o primeiro relato de uma espécie de *Mycosphaerella* em um membro da família das Commelinaceae (Farr & Rossman, 2010; Mendes & Urben, 2010; Aptroot, 2006).

Um estudo demonstrando a patogenicidade do isolado disponível para *T. fluminensis* e específico para esta espécie é ainda necessário para permitir uma avaliação do potencial desta espécie para uso como agente de biocontrole clássico para a trapoeraba branca.

Lesões necróticas irregulares negras. Após a confecção das lâminas, verificou-se a presença de hifas septadas com constrições nos pontos de ramificação. No caso de maiores detalhes da espécie encontra-se em González-García et al. (2006).

Material examinado: BRASIL, Rio de Janeiro, Nova Friburgo (Riograndina), em folhas vivas de *Tradescantia fluminensis*, 21 Novembro 2009, R. W. Barreto (VIC 31372).

Nota: Inicialmente, o gênero *Rhizoctonia*, era caracterizado morfológicamente apenas como um fungo formador de micélio estéril associado a escleródios de textura uniforme associado ao sistema radicular de plantas. Posteriormente, verificou-se que essas eram características insuficientes para a delimitação de *Rhizoctonia*. As seguintes características foram então adicionadas para a delimitação do gênero: hifa pigmentada (marrom), constrictões no ponto de ramificação, e ramificações usualmente em ângulo reto. Estes organismos são geralmente relacionados como organismos de solo, mas há relato de associação saprofítica e simbiote (González Garcia et al., 2006). *Rhizoctonia solani* é a forma assexuada de *Thanatephorus cucumeris* Frank (Donk), sendo um fitopatógeno extremamente polífago possuindo mais de 2500 hospedeiros conhecidos pelo mundo (Farr & Rossman, 2010). Quando presente no solo, o fungo causa tipicamente a doença conhecida como “damping-off” em plântulas, podendo haver também a formação de queimas foliares (Garibaldi et al., 2009a; 2009b). No caso de *T. fluminensis*, verificou-se que uma queima foliar encontrada em plantas crescendo em lugar aberto, e que se suspeitou inicialmente que poderiam estar sofrendo de queimaduras de sol estavam sendo atacadas por este fungo. A identidade do fungo foi confirmada com a observação suplementar de que as células das hifas eram multinucleadas (Fig 6 B-C). Esta é uma associação patógeno-hospedeiro nova para ciência. Considerando as características conhecidas de *R. solani* não há condições de que este fungo venha a ser utilizado como agente de biocontrole por ser um fitopatógeno polífago.

Sclerotium rolfsii Sacc. (Fig. 7)

Plantas de *T. fluminensis* condicionadas em estufa em vasos de plástico apresentavam indivíduos com sintomas de podridão com a presença de uma massa micelial associados a escleródios circulares, branco a marrom escuro e superfície lisa.

Em cultura: em BDA colônias brancas, com margem uniforme e micélio aéreo cotonoso; micélio primário hialino, 3.0 x 7.0 µm de diâmetro, septado e com grampo de conexão, micélio secundário surgindo logo abaixo do micélio primário, hialino, 2.5 µm diam e com células mais curtas que no micélio primário; micélio terciário crescendo entre as hifas primárias, ramificado, septado, sem grampo de conexão, 2.5 µm diam, hialino e liso; escleródios formados na superfície da colônia após 10 dias, inicialmente, brancos passando a marrons escuros quando maduros subcilíndricos a cilíndricos, com a presença de algumas perfurações e superfície lisa. Maiores detalhes da sua descrição podem ser encontradas em Mordue (1974).

Material examinado: BRASIL, Minas Gerais, Viçosa, em folhas vivas de *Tradescantia fluminensis*, 10 Janeiro 2009, D. M. Macedo (VIC 31381)

Notas: O gênero *Sclerotium* foi descrito a primeira vez associado a *Lycopersicum esculentus* L., mas após isto verificou-se que é um gênero de fungo comumente encontrado tanto em monocotiledôneas quanto em dicotiledôneas causando severos danos ao sistema radicular de muitas plantas (Punja, 1985). A espécie, *Sclerotium rolfsii*, caracteriza-se como a formação de escleródios circulares espalhados pelo micélio aéreo, quando maduros são escuros e sua dimensão é no máximo de 2mm de diâmetro. O que levou a concluir que os escleródios encontrados associados a este biótipo de

Tradescantia, tratavam-se de *S. rolfsii*. Além da presença dos escleródios, as características morfológicas – das hifas primárias, secundárias e terciárias confirmaram a identidade do fungo (Mordue, 1974).

Este isolado foi obtido da estufa onde era mantido um estoque de plantas do biótipos de *T. fluminensis* originários da Nova Zelândia para uso em experimentos. Os altos índices de umidade no interior da estufa e o uso de solo não esterilizado justificam a ocorrência desta doença que nunca foi observada no campo. Até o momento, *S. rolfsii*, só havia sido relatado nas seguintes comelináceas: *Dichorisandra* sp. – na Flórida e *Zebrina pendula* Schinzl – no Hawaii, USA (Farr & Rossman, 2010; Mendes & Urben, 2010).

***Septoria paranaensis* nov. sp. D. M. Macedo, O. L. Pereira & R. W. Barreto**

(Fig 8)

Mycobank: MB 518244

Etimologia: encontrado apenas no estado do Paraná

Lesões necróticas, circulares a elípticas, cinza palha, com anéis concêntricos negros, 2.8-7.0 x 4.0-10 mm, *Micélio interno* intercelular, 4.0–5.0 µm de diam, ramificado, septado e hialino a marrom claro. *Picnídios* semi-imersos, subcirculares, composição da parede 12.0–20.0 µm de espessura, marrom escuro, superfície lisa. *Conídios* isolados, aciculares, retos, ligeiramente curvos a sinuosos, 21.0–38.0 x 1.0 µm, 1–3 septos, cicatriz conidial não espessada, gutulados, hialinos, lisos.

Material examinado: BRASIL, Paraná, Ponta Grossa - Curitiba, em folhas vivas de *Tradescantia fluminensis*, 10 Dezembro 2007, R. W. Barreto (VIC 30578);

Notas: O gênero *Septoria* inclui somente duas espécies associadas a espécies de plantas da família Commelinacea: *S. commelinae* Canonaco descrito sobre *Commelina* sp. (Saccardo, 1892; Davis, 1931) e *S. tradescantiae* (Ellis & Kellerm) Davis descrito em associação com *T. virginicae* Walter (Canonaco, 1936). A espécie nova relatada nesta espécie de *T. aff. fluminensis* difere dessas duas espécies, pois os conídios têm 21.0-38.0 x 1.0 µm com 1 a 3 septos. Já em *S. commelinae*, os picnídios são encontrados em ambas as faces da folhas, os conídios são maiores 36.0-44.0 x 2.0-3.0 µm e geralmente tem 4-6 septos. No caso de *S. tradescantiae*, os conídios medem 65.0-80.0 x 4.0-5.0 µm e tem 4-6 septos. Trata-se claramente de uma espécie nova para o gênero.

Existem alguns casos de sucesso no uso de espécies de *Septoria* no controle biológico de plantas invasoras (Norman & Trujillo, 1995; Trujillo & Norman, 1995) mas, há dúvidas sobre a identidade do hospedeiro original deste fungo e não foram ainda realizados testes para confirmação da patogenicidade deste fungo para *T. fluminensis* (biótipo Nova Zelândia).

Uromyces commelinae Cooke (Fig 8)

Lesões em ambas as faces da folha, 0.50-4.5 x 0.7-3.0 mm, circulares a elípticas, inicialmente castanhas e quando maduras palha com bordo negro e coalescendo levando à desfolha da planta. *Urédias* 150–500 μm de diam, erupentes, agregadas. *Uredinosporos* esféricos a obovados, 26.0–33.0 x 21.0–27.0 μm , asseptados, com paredes 2.0–3.0 μm , castanho escuro, equinulados, com, 2 poros equatoriais.

Material examinado: BRASIL, Rio Grande do Sul, Vale dos vinhedos, em folhas vivas de *Tradescantia fluminensis*, 29 Julho 2004, O. L. Pereira (VIC 31341); BRASIL, Rio Grande do Sul, Santa Tereza, em folhas vivas de *Tradescantia fluminensis*, 26 Novembro 2005, O. L. Pereira (VIC 28808); BRASIL, Santa Catarina, Agudos do Sul – Bateria de baixo, em folhas vivas de *Tradescantia fluminensis*, 22 Novembro 2005, O. L. Pereira (VIC 31343); BRASIL, Rio Grande do Sul, São Francisco de Paula (Parque das 8 cachoeiras), em folhas vivas de *Tradescantia fluminensis*, 26 Novembro 2005, O. L. Pereira (VIC 31344); BRASIL, Rio Grande do Sul, Vale dos Vinhedos, em folhas vivas de *Tradescantia fluminensis*, 27 Novembro 2005, O. L. Pereira (VIC 31345); BRASIL, Santa Catarina, Lages – BR 116, em folhas vivas de *Tradescantia fluminensis*, 27 Novembro 2005, O. L. Pereira (VIC 31346) BRASIL, Rio Grande do Sul, Gramado (Rodovia três coroas), em folhas vivas de *Tradescantia fluminensis*, 29 Julho 2004, R. W. Barreto (VIC 30576);

Notas: A família Pucciniaceae inclui um grupo de fungos composto de aproximadamente 8000 espécies. No gênero *Tradescantia*, só há 3 espécies de ferrugens descritas – *Phakopsora tecta* H.S. Jacks. & Holw., *Puccinia commelinae* Holw e *Uromyces commelinae* Cooke (Farr & Rossman, 2010). No Brasil, *U. commelinae*, é a única espécie descrita em espécies do gênero *Tradescantia* (Farr & Rossman, 2010). No caso de *U. commelinae*, existe um relato da sua associação em *T. fluminensis* no Uruguai. De acordo com Hennen (2005), há dificuldade de se separar *P. commelinae* e *U. commelinae* pelo estágio uredinial. Em novos trabalhos para reidentificar essas duas espécies através do estado uredinial, verificou-se que era possível diferenciá-las da seguinte forma: os urediniósporos de *P. commelinae* apresentam uma parede de 1.5-2.0 µm de espessura; mais ou menos uniformemente equinulada; marrom-canela; sem ou raramente a presença de manchas lisas nos poros equatoriais; *U. commelinae*, tem, por outro lado, uma parede mais espessa (2.0-3.0 µm); castanho-marrom, com a presença freqüente de manchas lisas nos poros equatoriais. No caso dos espécimes encontrados neste trabalho também foi observado a total ausência da fase telial, mas a morfologia de seus uredósporos seguindo o critério descrito por Hennen et al. (2005) permitiu concluir que *U. commelinae* é o agente causal da doença observada em *T. fluminensis*.

Depois de repetidas tentativas frustradas de trazer plantas de *T. fluminensis* do campo e mantê-las doentes, tanto no telado, quanto na casa-de-vegetação ou em câmaras de crescimento, e mesmo com repetidas tentativas de redistribuição de inóculo para partes não infectadas das plantas, optou-se pelo uso de plantas-sentinelas. Neste teste vasos com plantas do biótipo da Nova Zelândia foram deixados em dez localidades no sul do país por mais de um ano

em áreas onde *T. fluminensis* ocorre naturalmente. O resultado obtido é que somente em uma localidade a ferrugem conseguiu infectar a planta sentinela (Bento Gonçalves). Entretanto, ao ser trazida para a base em Viçosa estas plantas após alguns meses a doença desaparecia. Os estudos sobre especificidade e a biologia desta ferrugem foram então abandonados e nada se pode afirmar sobre o seu potencial para o controle biológico além do fato de que há populações desta ferrugem capazes de infectar o biótipo neozelandês de *T. fluminensis*.

Agradecimentos

Essa pesquisa faz parte da tese de doutoramento de D. M. Macedo e foi desenvolvida com apoio financeiro do Landcare. O primeiro autor agradece à FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pela bolsa de estudos. R. W. Barreto e O. L. Pereira agradecem ao CNPq pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas

ADAMS, E.B. Fungi in classical biocontrol of weeds: In: M. N. Burge (ed.) Fungi in Biological Control Systems. Manchester: Manchester University Press. 1988. pp. 111-124.

AgResearch. 2006. 2020 science, New Zealand's science—New Zealand's future. Hamilton, AgResearch Limited. 5 p.

Alves JL, Barreto RW, Pereira OL, Soares DJ. 2010. Additions to the mycobiota of the invasive weed *Miconia calvescens* (Melastomataceae). Mycologia 102: 69-82.

Aptroot A. 2006. *Mycosphaerella* and its anamorphs:2. Conspectus of *Mycosphaerella*. CBS Biodiversity Series 5: 1-231.

Bailey JA, Jeger MJ. 1992. *Colletotrichum*: biology, pathology and control.

Barreto RC. 1997. Levantamento das espécies de Commelinaceas R. Br nativas do Brasil. Tese em Botânica. Universidade de São Paulo, São Paulo. 490 pp.

Barreto RW, Evans HC. 1994. Mycobiota of the weed *Cyperus rotundus* in the state of Rio de Janeiro, with an elucidation of its associated *Puccinia* complex. *Mycological. Research.* 98: 1107-1116.

Barreto RW, Seixas CDS, Killgore E. 2001. *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *miconiae*: o primeiro fungo fitopatogênico brasileiro a ser introduzido no exterior para o controle biológico clássico de uma planta invasoras (*Miconia calvescens*) In: 7 Simpósio de Controle Biológico, 2001b, Poços de Caldas. VII Simpósio de Controle Biológico. Livro de Resumos.: 109.

Bowers RC. 1986. Commercialization of Collego - An industrialist's view. *Weed Science* 34: 24-25.

Canonaco A. 1936. Contributo alla flora micológica dell'africa orientale italiana. Estrato dal Bollettino di Studi ed Informazioni de R. Giardino Coloniale di Palermo 14: 1 – 27.

Crous PW. 2009. Taxonomy and phylogeny of the genus *Mycosphaerella* and its anamorphs. *Fungal Diversity* 38: 1-24.

Crous PW, Braun U (2003) 'Mycosphaerella and its anamorphs: names published in Cercospora and Passalora. CBS diodiversity series 1'.(Centraalbureau voor Schimmelcultures: Utrecht)

Davis JJ. 1931. Notes on parasitic fungi in Wisconsin XVIII. Transactions of the Wisconsin Academic of Sciences, Arts and Letters 26: 253 – 261.

Dhingra OD, Sinclair JB. 1995. Basic plant pathology methods. New York: CRC Press. pp 434.

Ellison CA, Pereira JM, Thomas SE, Barreto, RW, Evans HC. 2006. Studies on the rust *Prospodium tuberculatum*, a new classical biological control agent released against the invasive weed *Lantana camara* in Australia. 1. Life-cycle and infection parameters. Australasian Plant Pathology 35: 309-319.

Farr DF, Rossman AY. 2010. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved March 29, 2010, from <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>

Garcia GV, Onco MAP, Susan VB. 2006. Review, biology and systematics of the form genus *Rhizoctonia*. Spanish Journal of Agricultural Research 4(1): 55 – 79.

Garibaldi A, Gilardi G, Bertetti D, Gullino ML. 2009a. First report of leaf blight on Fan Columbine (*Aquilegia flabellata*) caused by *Rhizoctonia solani* AG 4 in Italy Plant Disease 93: 433-433.

Garibaldi A, Bertetti D, Gullino ML. 2009b. First report of leaf blight on *Hosta fortunei* caused by *Rhizoctonia solani* AG 4 in Italy. *Plant Disease* 93: 432-432.

HASAN, S. Plant pathogens and biological control of weeds. *Review of Plant Pathology* 59: 349-355. 1980.

Hennen JF, Figueiredo MB, Carvalho Jr AA, Hennen PG. 2005. Catalogue of plant rust fungi (Uredinales) of Brazil. Disponível em: <<http://www.jbrj.gov.br>> (Acesso em: 29/03/2010).

Kelly D, Skipworth JP. 1984. *Tradescantia fluminensis* in a Manawatu (New Zealand) forest: I Growth and effects on regeneration. *New Zealand Journal of Botany* 22: 393 – 397.

Kelly D, Sullivan JJ. 2010. Life histories, dispersal, invasions, and global change: progress and prospects in New Zealand ecology, 1989-2029. *New Zealand Journal of Ecology* 34(1): 207 – 217.

Lorenzi H. 2008. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas e tóxicas. Ed. Plantarum, Nova Odessa, São Paulo. 672pp.

Mendes MAS, Urben AF. 2010. Fungos relatados em plantas no Brasil, Laboratório de Quarentena Vegetal. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Disponível em: <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/fgbanco01.asp>. Acesso em: 29/3/2010.

Mordue JEM. 1974. *Corticium rolfsii*. C M I Descriptions of pathogen fungal and bactéria. vol 410: 1 – 2.

Mordue E. 1967. *Glomerella tucumanensis*. CMI Descriptions of pathogens fungi and bacteria 133: 1 – 2.

Mortensen K, Makowski RMD. 1997. Effects of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* on plant development and biomass of non-target field crops under controlled and field conditions. Weed Research 37: 351-360.

Norman DJ, Trujillo EE. 1995. Development of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *clidemiae* and *Septoria passiflorae* into two mycoherbicides with extended viability. Plant Disease 79: 1029 – 1032.

Pereira OL, Barreto RW (2006) *Pseudocercospora palicoureae* sp. nov. associated with the toxic rubiaceous weed *Palicourea marcgravii* in Brazil, with observations on its mycobiota. Fungal Diversity 23: 243-253.

Pereira, O.L., Barreto, R.W. & Waipara, N. (2008) Pathogens from Brazil for classical biocontrol of *Tradescantia fluminensis* . In: XII International Symposium on Biological Control of Weeds, Eds: Julien MH, Sforza R, Bon MC, Evans HC, Hatcher PE, Hinz HL, Rector BG. Proceedings of the XII International Symposium on Biological Control of Weeds. Wallingford : CAB International, p. 195 – 199.

Pereira OL, Barreto RW, Cavalazzi JRP, Braun U. 2007. The mycobiota of the cactus weed *Pereskia aculeata* in Brazil, with comments on the life-cycle of *Uromyces pereskiae*. *Fungal Diversity* 25: 167-180.

Pereira OL, Kasuya MCM, Rollemberg CL, Chaer GM. 2005. Isolamento e identificação de fungos micorrízicos rizotonióides associados a três espécies de orquídeas epífitas neotropicais no Brasil. *Revista Brasileira da Ciências do Solo* 29: 191-197.

Punja ZK. 1985. The biology, ecology and control of *Sclerotium rolfsii*. *Annual Review of Phytopathology* 23: 97 – 127.

Rayner RW. 1970. A mycological colour chart. Commonwealth Mycological Institute and British Mycological Society, Kew, Surrey.

Roberts P. 1999. *Rhizoctonia*-forming fungi: a taxonomic guide. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. 239pp.

Saccardo P. A (1892) Sylloge Fungorum. Padova. vol. XXVI. 1142.

Soares DJ, Barreto RW, Braun U. 2009. Brazilian mycobiota of the aquatic weed *Sagittaria montevidensis*. Mycologia 101: 401-416.

Soares DJ, Barreto RW. 2008. Fungal pathogens of the invasive riparian weed *Hedychium coronarium* from Brazil and their potential for biological control. Fungal Diversity 28: 85-96.

Standish RJ, Robertson AW, Williams PA. 2001. The impact of an invasive weed *Tradescantia fluminensis* on native regeneration. Journal of Applied Ecology 38: 1253 – 1263.

Standish RJ Bennet SJ, Stringer IAN. 2002. Conservation of *Powelliphanta tracersi*: effects of removal of *Tradescantia fluminensis* and rodent poisoning. Science for Conservation 195. 24pp

Trujillo EE, Norman DE. 1995. *Septoria* leaf spot of lantana from Ecuador: a potential biological control for bush lantana in forests of Hawaii. *Plant Disease*. 79: 819–821.

Verkley GJM, Crous PW, Groenewald JZ, Braun U, Aptroot A. 2004. *Mycosphaerella punctiformis* revisited: morphology, phylogeny, and epitypification of the type species of the genus *Mycosphaerella* (*Dothideales*, *Ascomycota*). *Mycological Research* 108: 1271-1282.

Wapshere AJ (1974) A strategy for evaluating the safety of organisms for biological weed control. *Annals of Applied Biology*. 77: 201-211.

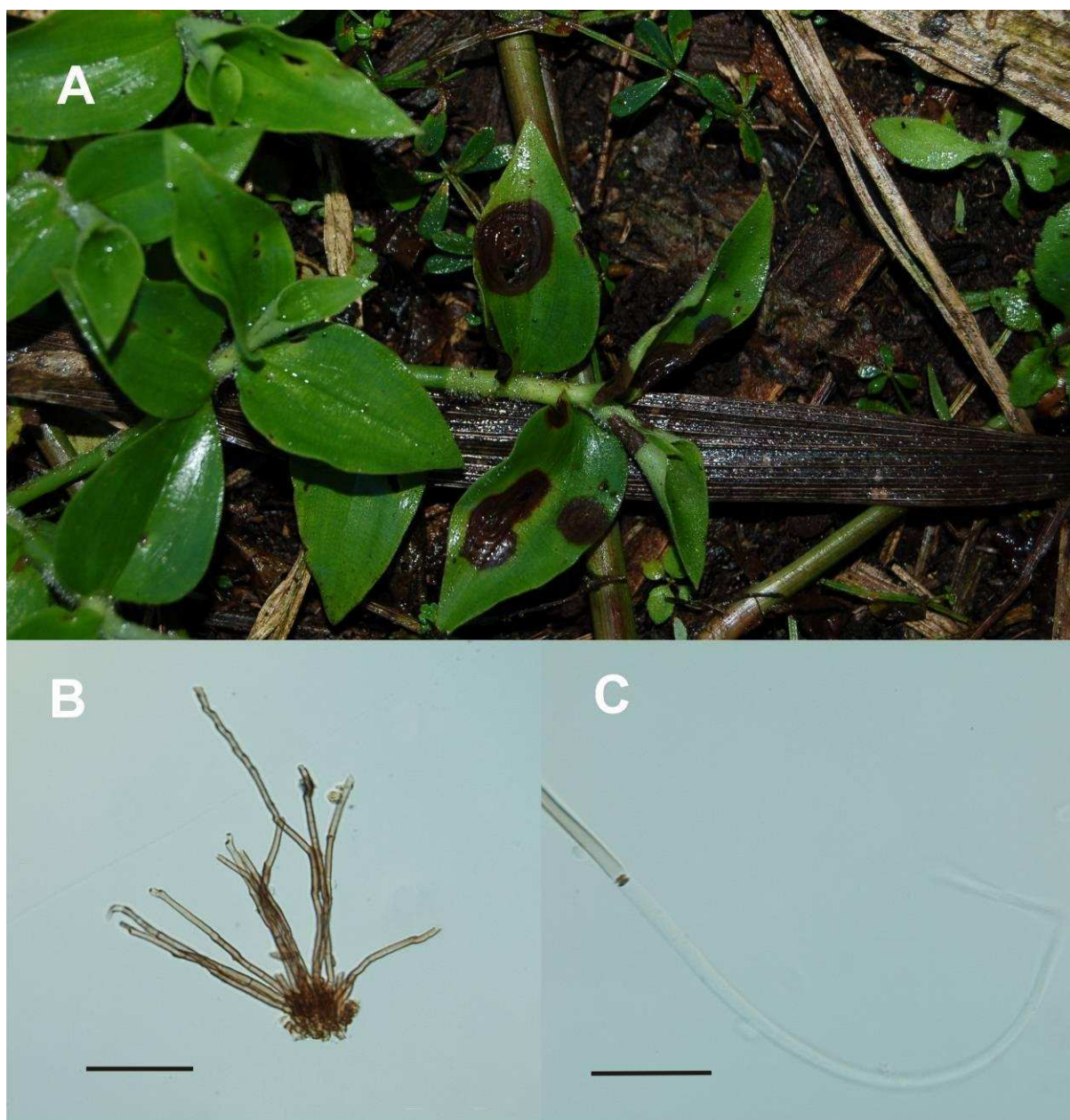


Fig 1. A. Sintomas de mancha foliar de *Cercospora apii* em *T. fluminensis*. B. Conidióforos de *C. apii* (Barra = 60 µm) C. Conídio aderido ao conidióforo de *C. apii* (Barra = 30 µm)

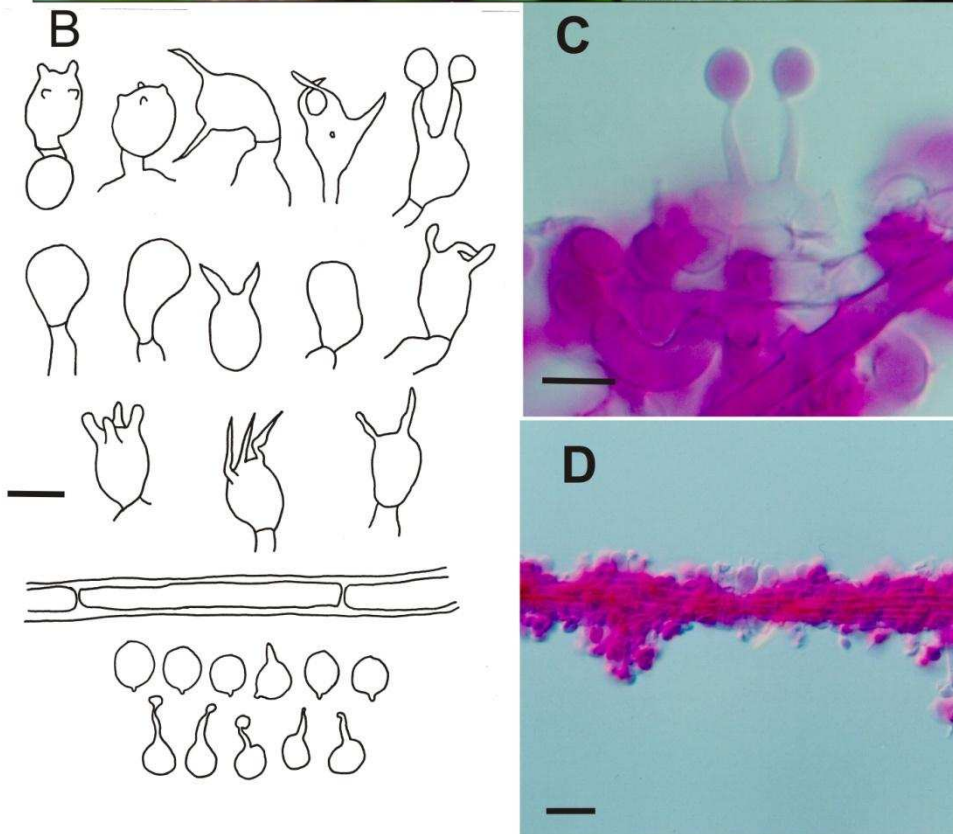


Fig 2.A. Colônias de *Ceratobasidium sparsum* sobre folhas de *T. fluminensis*.
B-C. Basídias e basidiósporos de *C. tradescantiae* (Barra=10.0 μm). Cordão micelial de *C. tradescantiae* (Barra=20.0 μm).

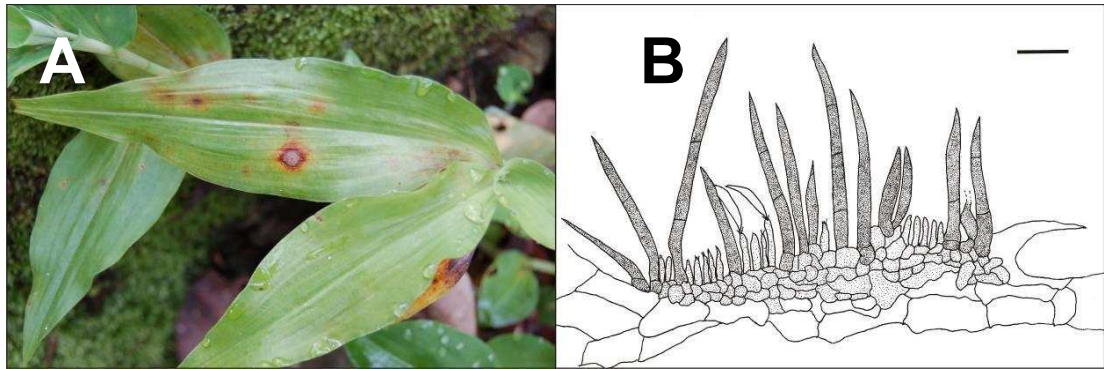


Fig 3.A. Sintomas de antracnose causada por *Colletotrichum falcatum* em *T. fluminensis*. **B.** Ilustração do acérvulo, da célula conidiogênica e dos conídios de *C. falcatum* (Barra=20.0 µm).

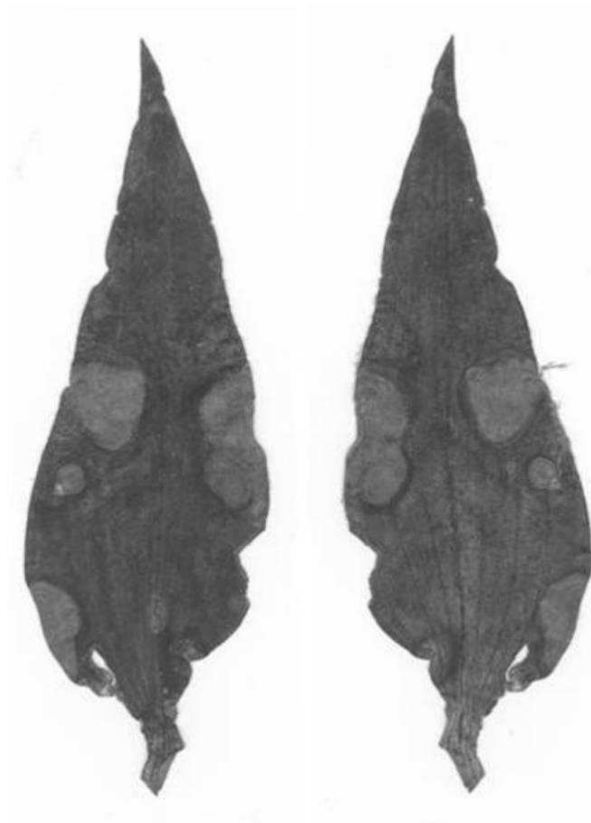


Fig 4.A. Sintomas de mancha foliar causados por *Mycosphaerella tradescantiae* em *T. fluminensis*: aspecto adaxial de folha colonizada (esquerda) e abaxial (direita).

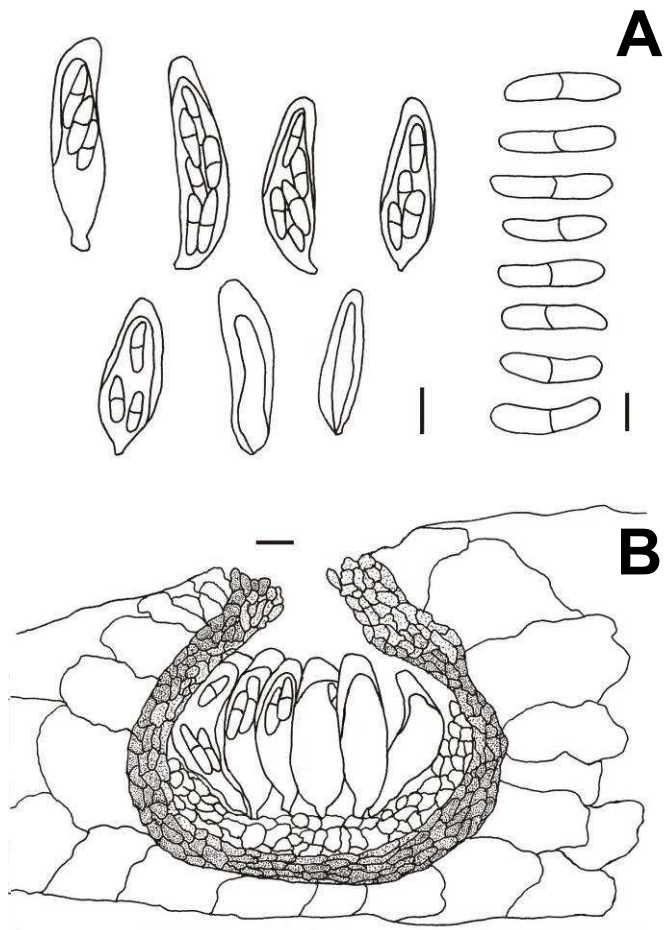


Fig 5. *Micosphaerella tradescantiae*. **A.** Ascas e ascósporos **B** Secção do pseudotécio (Bar=10.0 μ m).

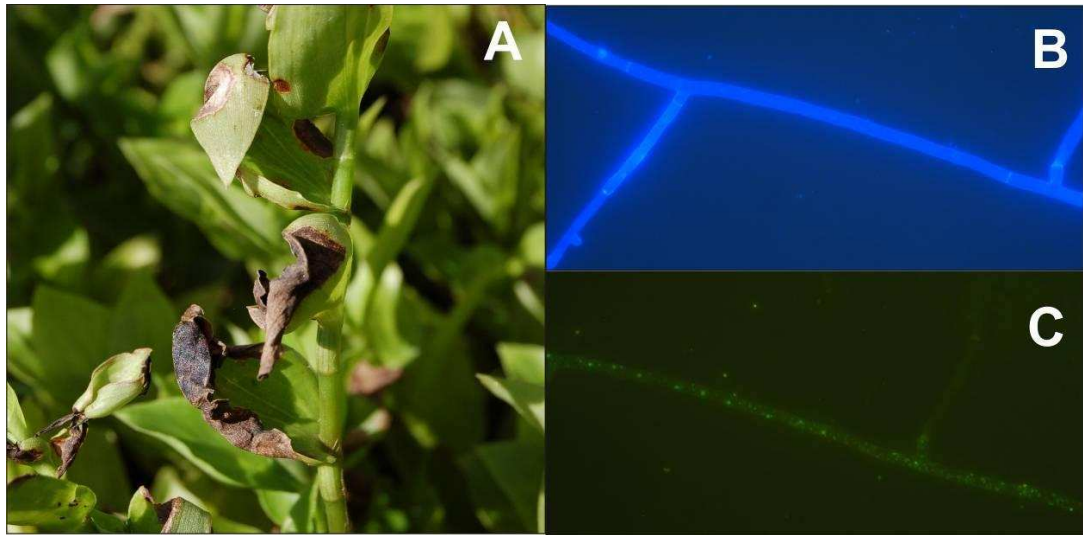


Fig 6.A. Sintomas de queima foliar causada por *Rhizoctonia solani* em *T. fluminensis*. **B-C.** imagens de microscopia de fluorescência em diferentes comprimentos de onda para demonstrar a condição multinucleada das hifas de *R. solani* coradas com SYBR Green®.

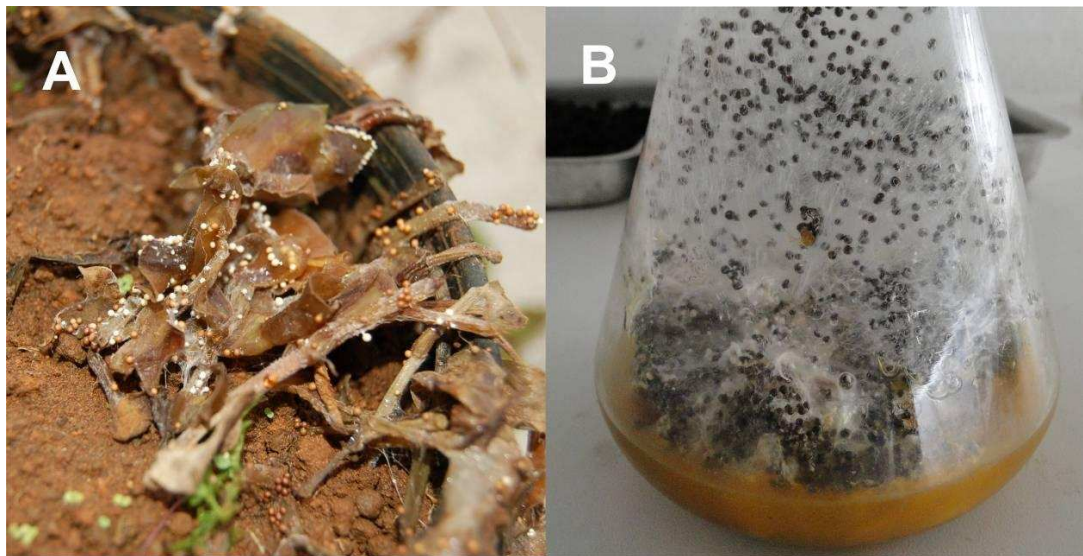


Fig 7.A. Plantas de *T. fluminensis* necrosadas (Note presença de numerosos escleródios de *Sclerotium rolfsii*) **B.** Escleródios formados abundantemente em cultura pura sobre pedaços de cenoura.

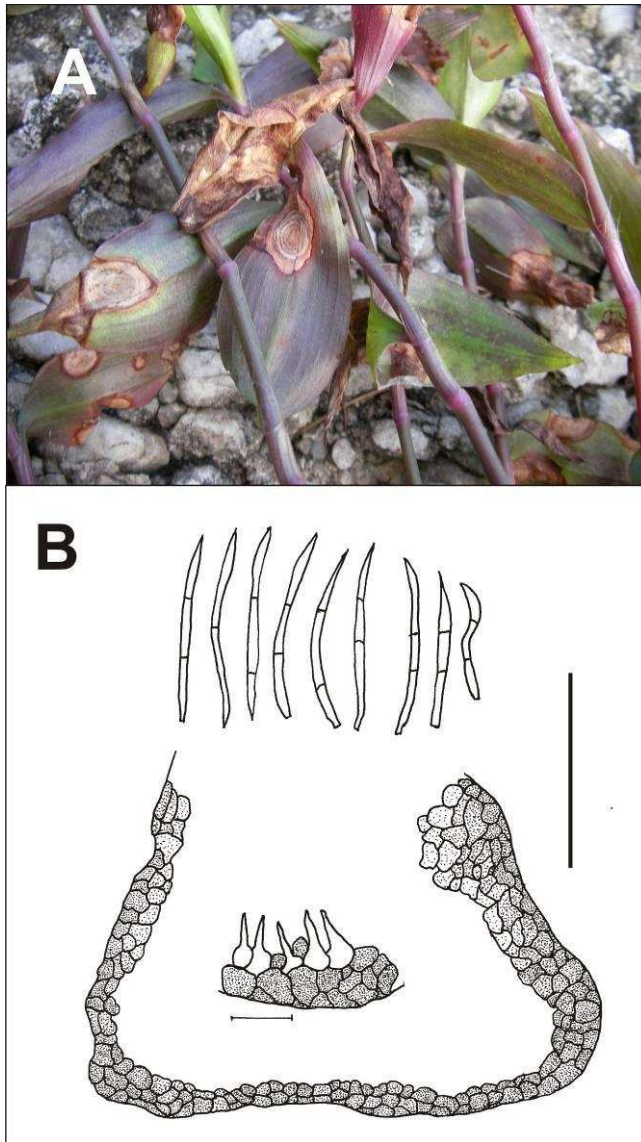


Fig 8.A. Manchas foliares causadas por *Septoria paranaensis* em *T. fluminensis*. **B.** Picnidio, célula conidiogênica e conídios de *S. paranaensis* (Bar= 45.0 μm).

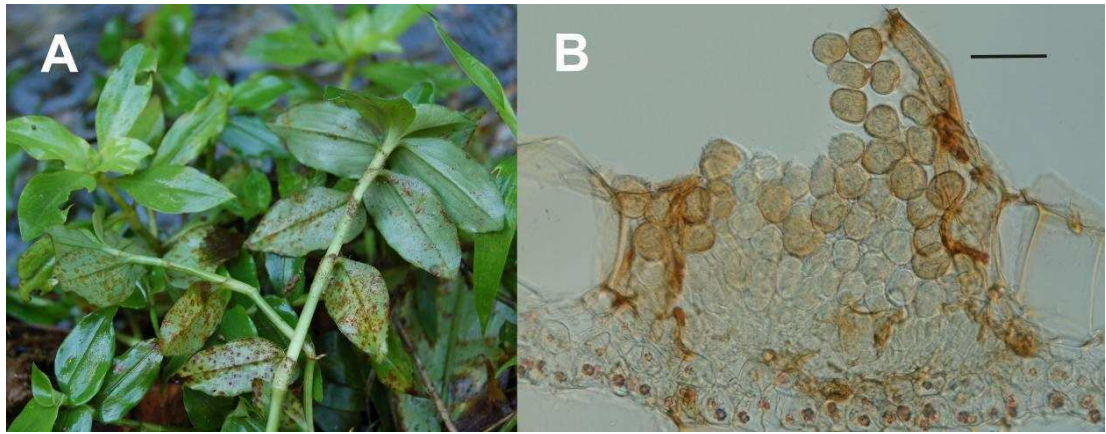


Fig 9.A. *Tradescantia fluminensis* com sintomas de ferrugem. **B.** Secção da uredinia de *U. commelinae* contendo urediniósporos (Bar=25.0 μ m).

ARTIGO 3

***Kordyana brasiliensis* sp. nov. (Ustilaginomycetes: Brachybasidiaceae): a potential classical biocontrol agent for the weed *Tradescantia fluminensis* from Brazil**

***Kordyana brasiliensis* sp. nov. (Ustilaginomycetes: Brachybasidiaceae): a potential classical biocontrol agent for the weed *Tradescantia fluminensis* from Brazil**

Davi M. Macedo; Olinto L. Pereira; Robert W. Barreto* & Braz T. Hora Júnior

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa

Viçosa, Minas Gerais, 36570-00, Brazil

*Corresponding author: rbarreto@ufv.br

Phone +55 31 38992503

Fax +55 31 38992240

ABSTRACT

Tradescantia fluminensis (wandering Jew) is a herbaceous plant native from Brazil that became a major invader of ecosystems in New Zealand. Surveys for natural enemies to be used as classical biological agents against this weed were performed in South and Southeastern Brazil yielding several pathogens and arthropods appearing to have potential for this use. Among the fungi that were collected is a species belonging to the basidiomycete genus *Kordyana* (Ustilaginomycetes: Brachybasidiaceae) that is newly described herein as *Kordyana brasiliensis*. Morphological and molecular features clearly distinguished the fungus collected on *T. fluminensis* from related species in this genus. The fungus caused a severe yellowing of infected leaves on *T.*

fluminensis leading to foliar necrosis and symptoms were very similar to those caused by white smuts, a group of related fungi that includes *Entyloma ageratinae*, a highly successful biocontrol agent introduced into New Zealand as a weed biocontrol agent against mist flower. As an exercise to illustrate the extent of damage produced on *T. fluminensis* by the fungus a fully grown individual of this species was collected from a population undergoing a severe outbreak of the disease. All leaves were taken from this plant and each was evaluated for disease severity. Disease incidence on leaves was 70% and percentage of necrosis on individual living leaves was up to 82%. Although the disease does not normally kill the host-plant it is likely that fungus infection has an effect similar to that of rust and other biotroph pathogens of serving as an energy sink weakening the diseased plants and leading to a reduction of its competitiveness. A high level of host-specificity was demonstrated by an indirect method of long term exposure of a series of 69 test-plant species (including 15 Commelinaceae) to inoculum from a group of highly infected *T. fluminensis* in a shade-house. The only plants that became infected after one month were *T. fluminensis* specimens, including plants grown from New Zealand originated stock. This, coupled with observations in the field of natural occurrences of the disease and the absence of the fungus attack on other neighboring plants led to the confirmation of the safety of the use of this fungus for classical introductions.

Taxonomical novelty: *Kordyana brasiliensis* Macedo, Pereira & Barreto

Key words: Classical biological control, Commelinaceae, Exobasidiales, taxonomy, white smut.

INTRODUCTION

Tradescantia is a neotropical genus of the Commelinaceae that includes 60 species (Barreto, 1997), some of which are cultivated as ornamentals but most of which are obscure understory plants of humid forests. *Tradescantia fluminensis* Vell. (wandering Jew; local name in Brazil – trapoeraba branca) is the sole species that is included in weed lists. In Brazil it is native to the coastal areas from the northeast to the south (Lorenzi, 2008) but is particularly common in Southeastern and Southern Brazil where it forms small patches on humid rocky habitats such as along creek margins. In its native range, although included in weed lists, it is doubtful if it deserves such a status as it never forms dense extensive populations and is only occasionally seen competing with crops. Conversely in situations where it was introduced into exotic tropical and subtropical regions of the world it became a very serious invader of native ecosystems. It is known to occur outside its native range in Australia, USA, Spain and Russia (Standish et al., 2001). It is ranked among the most invasive species of Florida (FLEPPC, 2009) and is particularly harmful to forest ecosystems in New Zealand for its ability to grow in shaded habitats (Kelly and Skipworth, 1984), affecting invertebrate communities (Toft et al., 2001; Standish, 2004) and hampering natural processes of forest regeneration and nutrient cycling (Standish et al., 2001; Standish et al., 2002, Standish et al., 2004).

Attempts to mitigate *T. fluminensis* invasions through chemical, mechanical and other control methods failed (Standish et al., 2002) and biological control was hence encouraged (Standish et al., 2001). *Tradescantia fluminensis* has no significant natural enemies (arthropods or pathogens) in New Zealand (Winks et

al., 2003) and the need for searches of co-evolved biocontrol agents was then regarded as necessary.

In 2004 cooperation started in two separate fronts: study of arthropods natural enemies (work based in the Universidade Federal do Paraná, at Curitiba – Brazil) and search for pathogens. A cooperative agreement was signed between Landcare Research (New Zealand) and the Fundação Arthur Bernardes of the Universidade Federal de Viçosa (Brazil) aimed at surveying and evaluating pathogens associated with *T. fluminensis* collected in Brazil as potential classical biocontrol agents to be used against this weed in New Zealand. A series of insects with clear potential as biocontrol agents were collected and one (*Neolema ogloblini* F.) was treated as having priority. Unfortunately colonies that were being screened for a potential introduction were found to be parasitized with protozoan of Subclass Gregarina and this has delayed the introduction of this insect (Fowler, 2009).

Surveys for plant pathogens yielded at the first stage five fungi which were preliminarily identified as *Uredo* sp. (rust), *Kordyana tradescantiae* (Pat.) Racib. (white smut-like), *Ceratobasidium* sp. (thread-blight), *Cercospora apii* Fresen. (leaf spot), *Mycosphaerella* sp. (leaf spot) and, additionally, a bacterial disease was also observed and the bacterium was identified as *Burkholderia andropogonis* (Pereira *et al.* 2008). All of these pathogens but *Ceratobasidium* sp. were regarded initially as having potential justifying further evaluations of their biocontrol potential. This work was continued and additional fungal pathogens were collected on *T. fluminensis* as well as other related species of *Tradescantia*. A complete list of the mycobiota of *T. fluminensis* with elucidation of taxonomy and a discussion on pathological aspects is being published

separately. Herein a detailed discussion of the fungus that was first misidentified as *K. tradescantiae* but found now to represent a new species is presented including an elucidation of its taxonomy, pathology and host-specificity.

MATERIAL AND METHODS

Surveys

Samples collected in the January 2003 and December 2005 surveys as described in (Pereira et al. 2008) were incorporated in the present work. Additional samples were obtained in survey trips to Southern Brazil in July 2008 and May 2009 and followed the same procedure described in Pereira et al. (2008). Representative specimens were deposited in the local herbarium (Herbarium VIC). Additionally to the specimens that were collected and dried in a plant press, live plants bearing white smut-like symptoms were collected from most location of the occurrence of this disease and brought back to the base at the Universidade Federal de Viçosa and kept in a shade house for later studies.

Isolations

Isolations were attempted by directly transferring spores from freshly collected leaves bearing sporulating lesions with a sterile fine pointed needle onto plates containing each of the two following media: VBA (vegetable broth-agar) as described in Pereira et al. (2003) or Melin-Norkrans modified (MNM) as described in Marx (1969). Finally, at a later stage, isolations were attempted by attaching selected fragments of infected leaves onto the inner side of the lid of

plates containing the media mentioned above. After 48 hours the surface of the underlying medium was scanned under a dissecting microscope in order to locate ejected basidiospores. Small fragments of the medium over which the spores were deposited were then transferred to other plates in order to tubes containing PCA.

Fungus morphology

Representative specimens of *T. fluminensis* bearing white smut-like symptoms were examined either after being dried in a plant press or fresh upon arrival from the field or later from the plants kept in the shade house. A fungus producing white sporulation over diseased tissues was consistently found to be associated with the leaf spots. Fungal structures were either scraped with a scalpel from the infected tissues or hand sections were prepared and mounted in lactophenol. Alternatively, sections were made with a cryostat "Microm HM520". Observations, measurements and illustrations were performed with a light microscope (Olympus BX 51) equipped with a digital camera "Olympus evolt E-330".

DNA isolation, amplification and sequence analysis

DNA analysis of pure cultures obtained from infected leaves of *T. fluminensis* with leaf spot showed that none of these belonged to *Kordyana*, contrary to the morphological evidence obtained through observation of infected leaves. Then, in order to gather additional evidence of the taxonomic distinction of the fungus on *T. fluminensis* from other species in *Kordyana* the following procedure was utilized in order to extract and examine *Kordyana* DNA directly from colonized *T. fluminensis* leaves. The DNA isolation was carried out following standard

CTAB extraction protocol and the DNA was used as template for the Polymerase Chain Reaction (PCR) for amplification of one genomic regions of the rDNA: region of the nuclear large subunit rRNA gene using primers NL1 and NL4 (O'Donnell, 1992).

PCR products were purified by means of High Pure PCR Product Purification Kit (ROCHE) following the instructions in the manual and sequenced directly over both strands using a MegaBACE™1000 DNA Sequencing System. In addition to the sequences generated in the present study LSU sequences from other works (Begerow et al., 2002) were downloaded from NCBI and aligned using the Clustal W algorithm in the MEGA program (Tamura et al., 2007). The LSU sequences of the *Anthracoidea arenaria* 1394A. are (Ustilaginomycetidae), was used as outgroup in the analysis. The LSU final alignment contained 24 taxa and 425 aligned nucleotides (Table 1). Sequences were analyzed using maximum parsimony, maximum likelihood analyses in PAUP 4.0 b10 (Swofford, 2002) and Bayesian inference and Markov chain Monte Carlo simulation implemented in MrBayes ver 3.0 with three repetitions (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). For the maximum likelihood analyses the GTR+I+G model was selected by the program Modeltest (http://bioag.byu.edu/zoology/crandall_lab/modeltest.htm) and Bootstrap analysis was performed with 1000 random replicates. Bayesian analysis was conducted on the same aligned dataset after MrModeltest v. 2.2 (Nylander, 2004) was used to determine the nucleotide substitution model GTR +I+G models. The Markov Chain Monte Carlo (MCMC) analysis of four chains started with a heating parameter of 0.1 from a random tree topology and lasted 5,000,000 generations. Trees were saved each 100 generations, resulting in 50,000 saved trees. Burn-in was set at 1,250,000 generations after which the

likelihood values were stationary, leaving 37,000 trees from which the 50 % majority rule consensus trees and posterior probabilities were calculated.

Pathogenicity

Tests aimed at demonstrating the pathogenicity of the fungus from Brazil to the biotype of *T. fluminensis* occurring in New Zealand and to establish its host-range were performed.

Additionally, after repeated failure in attempts to reproduce the disease with inoculum obtained from pure cultures of the several fungi that were obtained, and after observations were made that healthy *T. fluminensis* plants placed close to infected plants brought from the field became infected with white smut a experiment was designed taking advantage of the natural spread of the disease that was seen to occur in the shade house. A selection of 70 species was chosen (Table 3) and three potted individuals of each species including *T. fluminensis* of New Zealand origin , were placed together with a population of *T. fluminensis* that had become naturally infected and presented a high percentage of leaves infected with the fungus. The test-plants were organized in rows on the floor of a shade-house and between each row at a 50 cm distance, a row of pots containing diseased *T. fluminensis* was placed. During the first month, test-plants were examined weekly for disease symptoms, after that evaluations were performed at monthly intervals.

One similar approach aimed at checking the susceptibility of the New Zealand biotype of *T. fluminensis* to both a rust fungus that was found in the field attacking it and to *Kordyana* involved the placing of sentinels (potted plants of the New Zealand biotype) at selected places where these pathogens occurred on natural populations of *T. fluminensis* in Southern Brazil (Paraná, Santa

Catarina and Rio Grande do Sul). ten localities (Table 2). These were left in the field for 14 months after which each site was visited, sentinel plants were carefully examined and later removed and destroyed if not bearing disease symptoms or otherwise brought back to the base at the Universidade Federal de Viçosa for further examinations.

Preliminar evaluation of the extent of damage produced by *Kordyana*

A single plant arbitrarily chosen among naturally infected *T. fluminensis* in the shade-house was taken to a lab bench and had almost of its leaves (200 leaves) removed and examined for the occurrence or absence of white smut symptoms. Only living leaves were included. Data was recorded aimed at generating information on disease incidence per leaf population (each leaf one individual). Each leaf was scanned (HP "Scanjet 6100c" at 600dpi of resolution) and disease severity was evaluated with the software QUANT v. 1.0.2 (Xavier et al., 2003).

Results

Surveys

The surveys yielded 19 samples of *Kordyana* from *T. fluminensis*. These were found attacking the host in the field at 16 localities of four Brazilian states. Although the fungus was never found in the states of Minas Gerais on *T. fluminensis* nor at any Southeastern Brazilian state life infected plants collected from southern states and brought to Viçosa maintained the fungus population and no progressive loss of diseased material was observed for plants infected with white smut such as repeatedly seen in *Uredo* rust-infected *T. fluminensis* treated the same way. In fact, after several years of study in Viçosa both *T. fluminensis* and white smut are occurring naturally in areas next to the field plots in the university campus.

Isolations

Isolation of the *Kordyana* from *T. fluminensis* proved to be challenging. Although numerous isolation attempts yielded many fungus isolates, some of which were filamentous and some yeast-like, repeated inoculations of healthy *T. fluminensis* with such isolates did not reproduce the disease in any case leading to speculation on loss of pathogenicity in culture or inadequate isolate-weed biotype matches. Further examinations of the morphology of each fungus in culture and, at a later stage, molecular analysis of selected isolates, has finally demonstrated that these isolates represented in fact an heterogeneous

assemblage of taxa ranging from possible mycoparasites such as *Lecanicillium* sp. to yeast-like contaminants.

Only at a later stage of this study pure culture of the *Kordyana* on *T. fluminensis* were finally obtained through basidiospore ejection on plates.

Fungus morphology

Kordyana brasiliensis D.M. Macedo & R.W. Barreto **sp. nov.** (Figs 3)

MYCOBANK, MB 508070

GENBANK, HM 105582

Etymology: based on the geographic origin

Holotype: Brazil, Minas Gerais, Viçosa, experimental plot on *Tradescantia fluminensis* (Commelinaceae), December 2009, D.M. Macedo (VIC 31367).

Symptoms on upper leaf surface, appearing as diffuse chlorotic spots, becoming more prominent as chlorosis spreads; central area turning reddish brown and surrounded by an irregular, pale greenish-white border; often spreading and coalescing to cover large part of leaf; eventually necrosing and turning dark brown: on lower leaf surface, spots initially discrete, circular and silvery white covered with caespituli; becoming pale to ginger brown centrally and finally dark brown and necrotic with age, surrounded by pale whitish-green halo, becoming irregular in shape and spreading as new caespituli continually

emerge, 0.3-1.0 x 0.5-1.8 cm, coalescing and leading to complete yellowing and death of infected leaves. Spermogonia absent. Hymenium filling the substomatal cavity with hyaline mycelial mass, 65.0 x 92.0 – 70.0 x 110 μm ; Basidia bisterigmate, cylindrical bifurcate, 66.0 x 76.0 – 4.0 μm , hyaline, smooth. Basidiospores, oblong to elliptic 8.0 x 15.0 – 3.0 x 5.0 μm , hyaline, smooth.

In culture: colonies slow growing (2.0 cm diam after 10 days) initially yeast-like, becoming filamentous, flat, with feltrose white aerial mycelium, sparse sporulation.

Material examined: BRAZIL, Paraná, Curitiba, on living leaves of *Tradescantia fluminensis*, 15 November 2003, S. Fowler (VIC 27789); BRAZIL, Rio Grande do Sul, Santa Tereza, on living leaves of *Tradescantia fluminensis*, 29 April 2004, O. L. Pereira (VIC 28793); BRAZIL, Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves (Vale dos Vinhedos), on living leaves of *Tradescantia fluminensis*, 27 November 2005, O. L. Pereira (VIC 31347); BRAZIL, Rio Grande do Sul, road Gramado/Nova Petrópolis (access to Pinheiro Multisecular), on living leaves of *Tradescantia fluminensis*, 26 November 2005, O. L. Pereira (VIC 31348); BRAZIL, Paraná, Curitiba (Clube Atlético Primavera – Juruqui), on living leaves of *Tradescantia fluminensis*, 20 November 2005, O. L. Pereira (VIC 31349); BRAZIL, Paraná, Curitiba (Campus antigo da UFPR), on living leaves of *Tradescantia fluminensis*, 17 November 2005, O. L. Pereira (VIC 31350); BRAZIL, Santa Catarina, Rodovia SC 301, on living leaves of *Tradescantia fluminensis*, 22 November 2005, O. L. Pereira (VIC 31351); BRAZIL, Rio Grande do Sul, São Francisco de Paula (Hotel Fazenda Parque das Araucárias), on living leaves of *Tradescantia fluminensis*, 26 November 2005,

O. L. Pereira (VIC 31352); BRAZIL, Rio Grande do Sul, São Francisco de Paula (Parque das 8 cachoeiras), on living leaves of *Tradescantia fluminensis*, 26 November 2005, O. L. Pereira (VIC 31353; VIC 31354; VIC 31355); BRAZIL, Paraná, Curitiba, next to giant araucaria on living leaves of *Tradescantia fluminensis*, 30 November 2005, O. L. Pereira (VIC 31356); BRAZIL, São Paulo, Ponte do Rio São Pedrinho (BR 116 – Km 564), on living leaves of *Tradescantia fluminensis*, 19 November 2005, O. L. Liparini (VIC 31357); BRAZIL, Rio Grande do Sul, Santa Tereza, on living leaves of *Tradescantia fluminensis*, 29 July 2007, O. L. Pereira (VIC 28808); BRAZIL, Rio Grande do Sul, Canela, on living leaves of *Tradescantia fluminensis*, 07 December 2007, R. W. Barreto (VIC 30580); BRAZIL, Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, on living leaves of *Tradescantia fluminensis*, 08 December 2007, R. W. Barreto (VIC 30582); BRAZIL, Santa Catarina, Lages, on living leaves of *Tradescantia fluminensis*, 09 December 2007, R. W. Barreto (VIC 30583); BRAZIL, Minas Gerais, Viçosa, on living leaves of *Tradescantia fluminensis*, 10 December 2009, D. M. Macedo (VIC 31367)

The specimen of *K. brasiliensis* has generated amplicons 425bp with LSU region. The maximum parsimony analysis produced eight trees and the maximum likelihood analysis led to the selection of one tree having a 3289.54702 of probability (date not shown). Bayesian analysis yielded a tree having a topology equivalent to that obtained as above (Fig 7). Results obtained through the three phylogeny analysis models have shown that the *K. brasiliensis* indeed represents a new species. This was confirmed by the consistency on the topology of the trees generated for the species of *Kordyana*.

Pathogenicity

The indirect host-range test has demonstrated that *K. brasiliensis* was only pathogenic to *T. fluminensis*. Healthy *T. fluminensis* grown from New Zealand-origin plant stock showed “white smut” symptoms one month after they were placed in the vicinity of plants infected with *K. brasiliensis* in the shade house. None of the other test plants belonging to the other 69 taxa became infected by *K. brasiliensis* after 12 months of observation (Tab.1).

Preliminary evaluation of the extent of damage produced by *Kordyana*

Disease incidence on the leaves of the fully grown – naturally infected *T. fluminensis* individual that was examined was 70% whereas disease severity, as evaluated with Quant was 36%. Some individual leaves had more than 80% of the leaf blade area damaged by the disease (Fig. 6). All leaves having a higher proportion of damage were excluded and considered dead.

Discussion

The order Exobasidiales includes four fungal families: Brachybasidiaceae, Exobasidiaceae, Cryptobasidiaceae and Graphiolaceae (Kirk et al., 2008). Fungi in this order typically produce no teliospores on the parasitic phase, have holobasidia and are dimorphic (Bauer et al, 2001; Begerow et al., 2002). The Brachybasidiaceae includes 5 genera: *Brachybasidium*, *Dicellomyces*, *Exobasidiellum*, *Kordyana* and *Proliferobasidium*. These genera share the following features: sporulation on the surface of host tissue, haustoria absent, basidia producing two sterigmata bearing ballistosporic basidiospores with hilar appendixes oriented adaxially in relation to the apex of basidia. (Cunningham et al., 1976; Begerow et al., 2002). *Kordyana* included until now five species all of which are plant parasites causing white smut disease on members of the Arecaceae or Commelinaceae (Begerow et al., 2002, Kirk et al., 2008; Farr et al, 2010). They produce tufts of basidia that emerge through the stomata arising from the substomatal cavities and from disrupted epidermis and each basidium bears two sterigmata on which a single forcibly ejected basidiospore is formed. The fungus collected on *T. fluminensis* fits well within the accepted concept for *Kordyana* and was regarded as new for having smaller basidiospores (8.0-15.0 μm) than those of *Kordyana tradescantiae* (Pat.) Rac. (15.0-18.0 μm) the only other species known to attack members of *Tradescantia*. As for the other species of *Kordyana* besides their separation in terms of being associated to different host-plant genera *Aneilema*, *Callisia*, *Commelina* and *Pollia* the following morphological differences are also of relevance: *K. celebensis* Gäum has shorter basidia (up 60.0 μm); *K. commelinae* Sawada has smaller basiospores (7.0-8.0 x 3.0-4.0 μm); *K. polliae* Gäum has larger basidiospores

(15.0-21.0 x 5.0-8.0 μm) (Gäumann, 1922; Farr & Rossman, 2010; Mendes & Urben, 2010).

Additionally, the phylogenetic analyses of relevant DNA sequences have clearly demonstrated with 100% of confidence that species of *Kordyana* with sequences deposited in GeneBank (*K. celebensis* and *K. tradescantiae*) are different from *K. brasiliensis*.

Pathogenicity studies have clearly demonstrated that *K. fluminensis* is highly host-specific to *T. fluminensis* and capable of causing a severe disease on plants of the biotype of the weed that is present in New Zealand. No species other than *T. fluminensis* was either seen in the field attacked by this fungus or infected when directly exposed to inoculum sources under closer scrutiny. Such a level of host-specificity, although desirable could be regarded as unnecessary in the case of New Zealand since there is no native or cultivated plants of relevance in this family in this country. Potential for its use as a classical biocontrol agent is regarded as very high and, considering the weather similarities and equivalent latitude of the natural range of *K. brasiliensis* in southern Brazil and the regions invaded by *T. fluminensis* in New Zealand, it is probable that the fungus will adapt well if its introduction is approved. Such climatic and latitudinal matching is commonly regarded as good indicators of a biocontrol candidate chances of successfully adapting to the new range (Wapshere, 1985). The affinity of *Kordyana* with *Entyloma* and similarity of the disease it causes as that caused by *Entyloma* (white smut) may also be regarded as indications that a similar level of success might be achieved with the introduction of *K. brasiliensis* as that obtained after the introduction of *Entyloma ageratinae* R.W. Barreto & H.C. Evans against mist-flower *Ageratina*

riparia in Hawaii in the 1970s (Trujillo, 2005) and in New Zealand in the 1990s (Fröhlich et al., 2000). Results of both releases have been reported as spectacular in both cases (Trujillo, 2005; Barton et al., 2007). In New Zealand evaluations of the results of the introduction of white smut on *A. riparia* four years after its introduction have shown that the fungus was able to disperse to distances superior to 400 Km from release sites, establishing stable populations where introduced, significantly reducing weed infestations and contributing to recovery of local biodiversity (Barton et al., 2007). The example provided by the preliminary observation that was made here of the impact of *K. brasiliensis* on a selected individual represents only a minor illustration of the kind of damage that could be promoted in the field in New Zealand after its release and was not meant to represent a statistically significant demonstration of impact. Nevertheless it is suggested that a high percentage of leaves (more than 70%) may become naturally infected. As in the case of other biotrophic fungi such as rusts, the main impact is often not properly assessed by estimation of areas of necrotic tissues on infected plants (which in the case of *K. brasiliensis* might be regarded as somewhat low, only 36 %). Colonization by such fungi generates sinks for plant reserves and often lead, in the case of crop plants, to major reduction in productivity and, in the case of plants in natural habitats, to loss of the ability to compete with other plants (Watson, 1991; Charudattan, 2005). One of the most important pre-requisites for using an organism as a biocontrol agent is a high-host specificity, a feature that is recognized as occurring at the highest level in biotrophic fungi such as *K. brasiliensis* (Frank, 1992). On the entomological side of the biocontrol program against *T. fluminensis* work was approaching the release of the phytophagous beetle *Neolema ogloblini* (Chrysomelidae) which was already being held in quarantine in New Zealand.

Unfortunately it was found that the colonies were infected with an exotic insect pathogen and, until now attempts to clean-up these colonies have failed (Fowler, 2009). This insect is regarded as having a high potential as a biocontrol candidate and it is likely that attempts to obtain healthy colonies in New Zealand and in Brazil will be continued and that the success story of the combined use of a fungal pathogen and an insect against a weed that occurred in the case of the programs of biocontrol of *A. riparia* in Hawaii and New Zealand will be repeated for *T. fluminensis*.

Acknowledgements

This study makes part of a DS thesis presented by D. M. Macedo to the Departamento de Fitopatologia/Universidade Federal de Viçosa and was performed with financial support from Landcare Research Manaaki Whenua - New Zealand, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG). The authors acknowledge the Núcleo de Microscopia e Microanálise of the Universidade de Federal Viçosa for the use of its equipment, with the technical support of C. A. Vanetti.

REFERENCES

- Barreto RC (1997) Levantamento das espécies de Commelinaceas R. Br nativas do Brasil. Tese em Botânica. Universidade de São Paulo, São Paulo. 490 p.
- Barton J, Fowler SV, Gianotti AF, Winks CJ, de Beurs M, Arnold GC, Forrester G (2007) Successful biological control of mist flower (*Ageratina riparia*) in New Zealand: Agent establishment, impact and benefits to the native flora. *Biological Control* 40, 370-385.
- Bauer R, Begerow D, Oberwinkler F, Piepenbring M, Berbee ML (2001). The Ustilaginomycetes. In: Mclaughlin DJ, Mclaughlin EG, Lenke PA (eds). *Mycota VII part B. Systematics and Evolution*, pp 57- 83. Springer Verlag, Heidelberg, New York.
- Begerow D, Bauer R, Oberwinkler F (2002) The Exobasidiales: an evolutionary hypothesis. *Mycological Progress* 1(2), 187 – 199. doi: 10.1007/s11557-006-0018-7
- Charudattan R (2005) Ecological, practical, and political inputs into selection of weed targets: what makes a good biological control target? *Biological Control* 35, 183–196.

Cunningham JL, Bakshi, BK, Lentz PL (1976) Two new genera of leaf-parasitic fungi (Basidiomycetidae: Brachybasidiaceae). *Mycologia* 68: 640 – 654.

Farr DF, Rossman AY (2010) Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved March 29, 2010, from <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>

Fowler S (2009) What's New in Biological Control of Weeds? *Manaaki Whenua Landcare Research Issue* 51.

Frank SA (1992) Models of plant pathogen evolution. *Trends in Genetics* 8, 213–219.

Fröhlich J, Fowler SV, Gianotti A, Hill RL, Kilgore E, Morin L, Sugiyama L, and Winks C (2000) Biological control of mist flower (*Ageratina riparia*, Asteraceae): Transferring a successful program from Hawai'i to New Zealand. Pages 51-57 in: Proceedings of the 10th International Symposium on Biological Control of Weeds. N. R. Spencer, ed. Montana State University, Bozeman.

Gäumann E (1922) Über die gattung *Kordyana* Rac. *Annales Mycologici* 20, 257 – 271.

Kelly D, Skipworth JP (1984) *Tradescantia fluminensis* in a Manawatu (New Zealand) forest: I Growth and effects on regeneration. *New Zealand Journal of Botany* 22, 393 – 397.

Kirk PM, Cannon PF, Minter JA, Stalpers JA (2008) Dictionary of Fungi. 10th ed. Wallingford, UK. CAB International. 771pp.

Lorenzi H (2008) Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas e tóxicas. Ed. Plantarum, Nova Odessa, São Paulo. 672pp.

Marx DH (1969) The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic fungi and soil bacteria – I: antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* 59:153-163.

Mendes MAS, Urban AF(2010) Fungos relatados em plantas no Brasil, Laboratório de Quarentena Vegetal. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Disponível em: <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/fgbanco01.asp>. Acesso em: 29/3/2010.

Nylander JAA (2004) MrModeltest v 2.2. Program distributed by the author.

O'Donnell K (1992) Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). *Current Genetics* 22, 213–220.

Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574..

Pereira, O.L., Barreto, R.W. & Waipara, N. (2008) Pathogens from Brazil for classical biocontrol of *Tradescantia fluminensis* . In: XII International Symposium on Biological Control of Weeds, Eds: Julien MH, Sforza R, Bon MC, Evans HC, Hatcher PE, Hinz HL, Rector BG. Proceedings of the XII International Symposium on Biological Control of Weeds. Wallingford : CAB International, p. 195 – 199.

Standish RJ, Robertson AW, Williams PA (2001) The impact of an invasive weed *Tradescantia fluminensis* on native regeneration. *Journal of Applied Ecology* 38, 1253 – 1263.

- Standish RJ, Bennet SJ, Stringer IAN (2002) Conservation of *Powelliphanta tracersi*: effects of removal of *Tradescantia fluminensis* and rodent poisoning. *Science for Conservation* 195. 24p
- Standish RJ, Williams PA, Robertson AW, Scott NA, Hedderley DI (2004) Invasion by a perennial herb increases decomposition rate and alters nutrient availability in warm temperate lowland forest remnants. *Biological Invasions* 6, 71–81.
- Swofford D (1998) PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods), Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24,1596-1599
- Toft RJ, Harris RJ, Williams PA (2001) Impacts of the weed *Tradescantia fluminensis* on insect communities in fragmented forests in New Zealand. *Biological Conservation* 102: 31 - 46.
- Trujillo EE (2005) History and success of plant pathogens for biological control of introduced weeds in Hawaii. *Biological control* 33, 113-122.

Wapshere AJ (1985) Effectiveness of biological control agents for weeds: present quandaries. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 13, 261–280.

Watson AK (1991) The classical approach with plants pathogens. In: *Microbial Control of Weeds* (ed. DO TeBeest), pp. 3–23. Chapman & Hall Inc., New York, USA.

Winks CJ, Waipara NW, Gianotti A, Fowler SV (2003) Invertebrates and fungi associated with *Tradescantiafluminensis* (Commelinaceae) in New Zealand. *Department Of Conservation Report*: 1–22.

Xavier FXT, Filho EIF, Liberato, JR (2003) Quant. A software for plant disease severity assessment. 8th International Congress of Plant Pathology, p. 105.

Table 1. List of fungal species studied (DNA sequences)

List of specimens studied	
Specimens	Sequence
1. Exobasidiomycetidae	
Entyloma dahliae	AY272035.1
Tilletiopsis pallescens	AB178263.1
Kordyana celebensis	AF487401.1
Kordyana tradescantiae	AF487402.1
Exobasidium bisporum	AB177598.1
Eballistra lineata	AF229351
Microstroma album	AF352052.1
Quambalaria pitereka strain QP45	DQ823439.1
Tilletia controversa	DQ832244.1
Doassansia epilobii	AF007523
Entyloma arnosericis	DQ645528.1
Tilletiopsis washingtonensis	DQ025487.1
2. Ustilaginomicetidae	
Moesziomyces bullatus	DQ831011.1
Sporisorium andropogonis-micranthi	AY740100.1
Sporisorium penniseti	AY740130.1
Ustilago hordei	AF453934.1
Ustilago nuda	AJ236139.1
Tranzscheliella hypodytes	DQ875373.1
Melanotaenium cingens	DQ875364.1
Melanustilospora ari voucher HUV11528	EF517924.1
Urocystis ulei voucher RB5053	EF517930.1
Vankya heufleri voucher HUV 15007	EF653981.1

1. List of sequences deposited in NCBI

Table 2. List of *Tradescantia fluminensis* sentinel plants (New Zealand stock) left exposed to inoculum of *Uromyces commelinae* and *Kordyana brasiliensis* in the native range resulting infections.

Plant No:	Location	GPS coordinates	Pathogen	Recollection (Y/N)
1	São Francisco de Paula plant a	S 28° 23' 45.9"; W 049°32' 49.0"	K	Y – No disease
2	São Francisco de Paula plant b	S 28° 23' 45.9"; W 049° 32' 49.0"	K	Y – No disease
3	Bento Gonçalves Rs 444 plant a	S 29° 11' 08.8"; W 051° 36' 08.1"	U	Y – Uromyces infection
4	State border Rio Grande do Sul & Santa Catarina Br 116	S 28° 14' 6.3"; W 050° 46' 4.7"	K/U	Y - No disease
5	Bento Gonçalves Rs 444 plant b	S 29° 11' 08.8"; W 051° 36' 08.1"	U	Y – No disease
6	Lages plant a	S 27° 47' 26.8"; W 050° 21' 14.5"	K/U	Y – No disease
7	Lages plant b	S 28° 14' 6.3"; W 050° 46' 4.7"	K/U	Y – No disease
8	Serra do Rio do Rastro	S 28° 23' 45.9" ;	K	N – plant not recovered due to

W 049° 32' 49.0"

site flooding

* **K** = Sentinel plants placed amongst/proximate to plants infected by *K. brasiliensis*

* **U** = Sentinel plants placed amongst/proximate to plants infected by *U. commelinae*

Table 3. List of test-plants included in the specificity test

BOTANIC FAMILY	PLANT SPECIES
Amaranthaceae	<i>Alternanthera philoxeroides</i> (Mart.) Griseb
Alismataceae	<i>Echinodorus grandiflorus</i> (Cham. & Schltld.) Micheli <i>Sagittaria montevidensis</i> Cham. & Schltld.
Anacardiaceae	<i>Mangifera indica</i> L. <i>Pistacia vera</i> L. <i>Rhus copallinum</i> L. <i>Schinus molle</i> L. <i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi <i>Spondias purpurea</i> L.
Araceae	<i>Pistia stratiotes</i> L. <i>Anthurium</i> sp.
Arecaceae	<i>Rhopalostylis sapida</i> H. Wendl. & Drude
Asteraceae	<i>Emeranthus</i> sp.
Balsaminaceae	<i>Impatiens walleriana</i> Hook. f.
Bixaceae	<i>Bixa orellana</i> L.
Bromeliaceae	<i>Aechmea aquilega</i> (Salisb.) Griseb.
Chrysobalanaceae	<i>Licania tomentosa</i> (Benth.) Fritsch
Commelinaceae	<i>Callisia repens</i> (Jacq.) L. <i>Callisia warszewicziana</i> (Kunth & Bouché) D.R. Hunt <i>Commelina benghalensis</i> L. <i>Commelina diffusa</i> Burm. f. <i>Commelina erecta</i> L. <i>Dichorisandra thyrsiflora</i> J.C. Mikan <i>Gibasis schiedeana</i> (Kunth) D.R. Hunt <i>Siderasis fuscata</i> (Lodd.) H.E. Moore <i>Tradescantia fluminensis</i> Vell. <i>Tradescantia pallida</i> (Rose) D.R. Hunt <i>Tradescantia spathaceae</i> Sw. <i>Tradescantia zebrina</i> Heynh. <i>Tradescantia zononia</i> (L.) Sw. <i>Tripogandra diuretica</i> (Mart.) Handlos. <i>Tinantia</i> sp.
Costaceae	<i>Costus erythrophyllus</i> Loes
Cyperaceae	<i>Cyperus rotundus</i> L.
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia heterophylla</i> L. <i>Hevea brasiliensis</i> (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg.
Fabaceae	<i>Cassia grandis</i> L. f.
Faboideae	<i>Dalbergia</i> sp.
Juncaceae	<i>Juncus</i> L.
Malvaceae	<i>Theobroma cacao</i> L.
Maranthaceae	<i>Maranta bicolor</i> Ker Gawl.
Melastomataceae	<i>Tibouchina herbaceae</i> (DC.) Cogn. <i>Miconia calvescens</i> DC.
Meliaceae	<i>Cedrela fissilis</i> Vell. <i>Cedrela odorata</i> L.

Table 3. (continued)

BOTANIC FAMILY	PLANT SPECIES
Myrtaceae	<i>Eugenia uniflora</i> L. <i>Plinia edulis</i> (Vell.) Sobral <i>Plinia trunciflora</i> (O. Berg) Kausel <i>Psidium cattleianum</i> Sabine <i>Psidium guava</i> Griseb <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels
Pontederiaceae	<i>Eichornia crassipes</i> Solms
Rosoideae	<i>Rubus fruticosus</i> L.
Rosaceae	<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch <i>Rosa</i> sp.
Rubiaceae	<i>Coffea arabica</i> L.
Rutaceae	<i>Citrus x limon</i> (L.) Osbeck
Solanaceae	<i>Solanum lycocarpum</i> A. St.-Hil.
Strelitziaceae	<i>Strelitzia reginae</i> Aiton
Thyphaceae	<i>Typha domingensis</i> Pers.
Verbenaceae	<i>Lantana camara</i> L. <i>Verbena</i> sp.
Zingiberaceae	<i>Hedychium coronarium</i> J. König <i>Zingiber officinale</i> Roscoe



Fig1A-B Population of *Tradescantia fluminensis* bearing white smut symptoms caused by *Kordyana brasiliensis* **B-** Close-up (note intense yellowing of lower leaves with brown necrotic tissues appearing centrally).



Fig 2 A Sentinel *Tradescantia fluminensis* plant of the New Zealand biotype as left in the field **B** White smut symptoms appearing on sentinel plants of the New Zealand biotype of *Tradescantia fluminensis* left in the field.

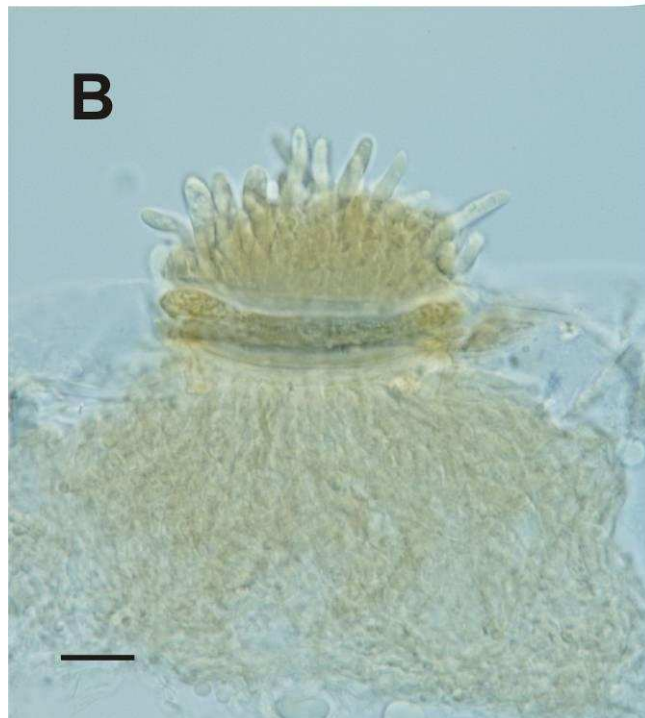
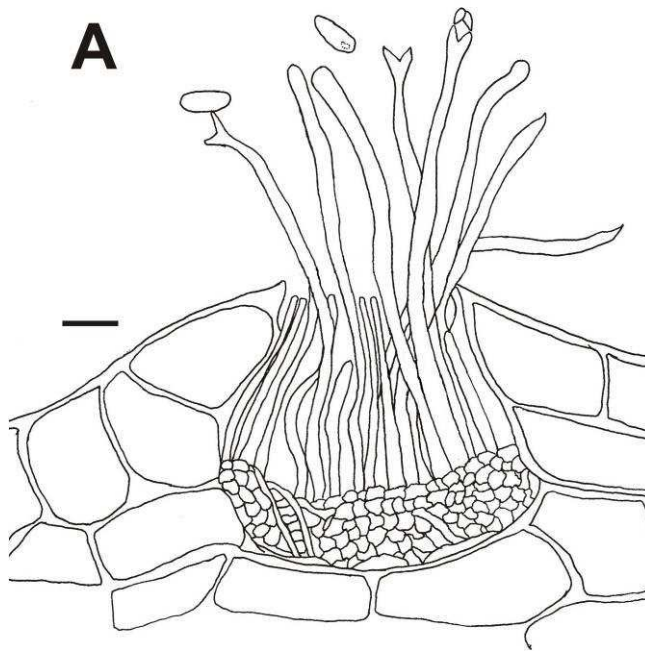


Fig 3A - Caespituli of basidia of *Kordyana brasiliensis* emerging through stoma of *Tradescantia fluminensis* (bar= 15 μ m) B- *Ibid* (bar= 15 μ m).

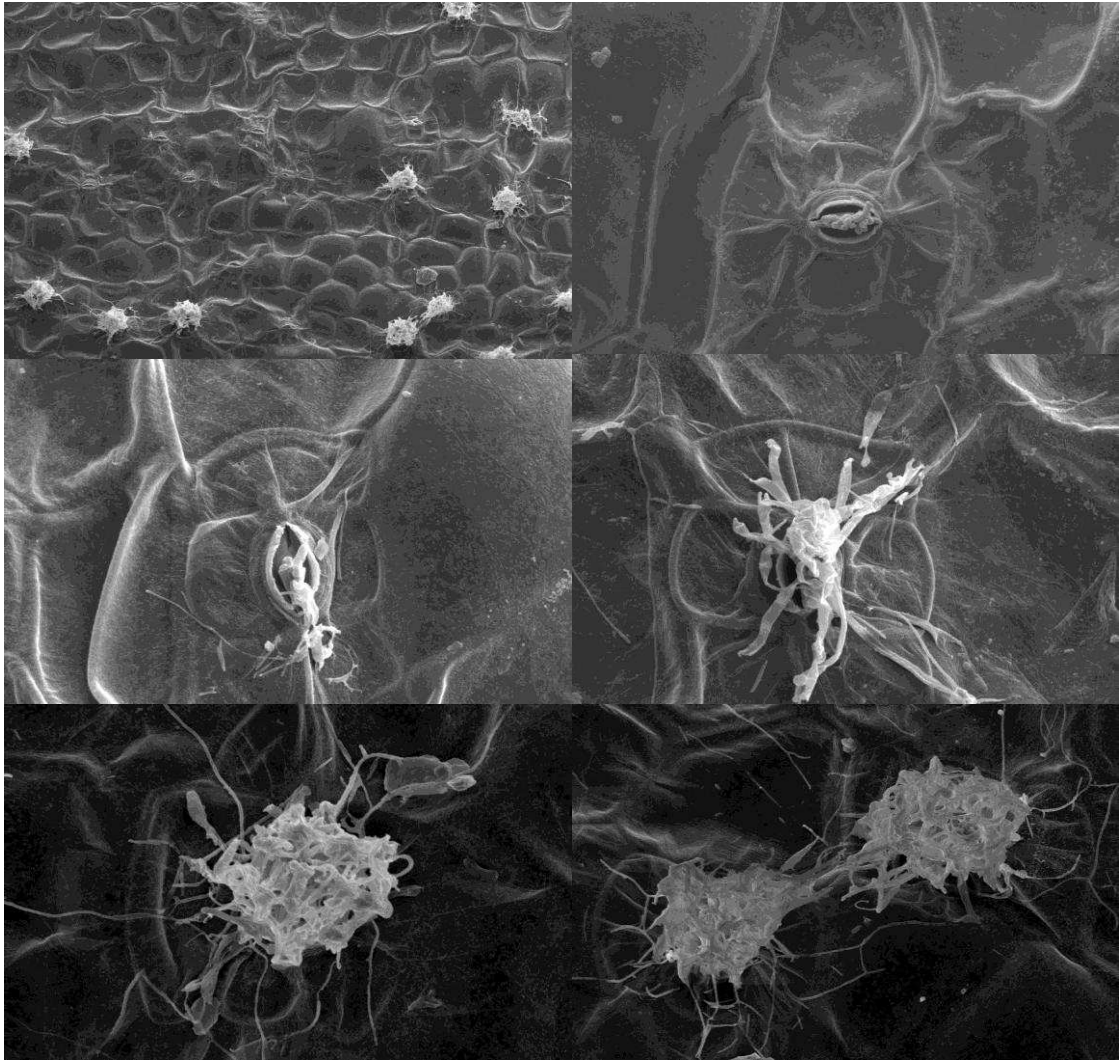


Fig 4. SEM images of *Kordyana brasiliensis caespituli* emerging through stomata.



Fig5 A-C Centrifugal phylogenetic hos-range test of *Kordyana brasiliensis*.

A- General view of experiment in shade house. B- Test-plants growing intermixed with infected *Tradescantia fluminensis*. C- Close-up showing a *T. fluminensis* individual heavily infected with white smut growing among test-plants.

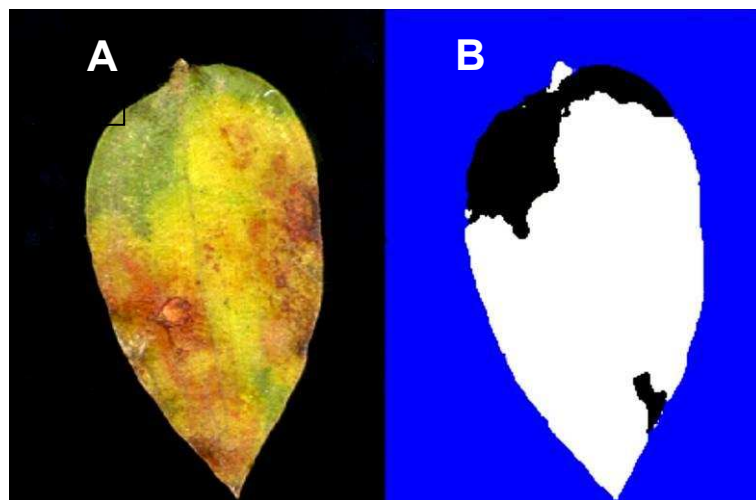


Fig 6. Single leaf of *T. fluminensis* infected by *K. brasiliensis*. 82% severity. A- standard scanned image. B- same image edited in Quant v 1.0.2

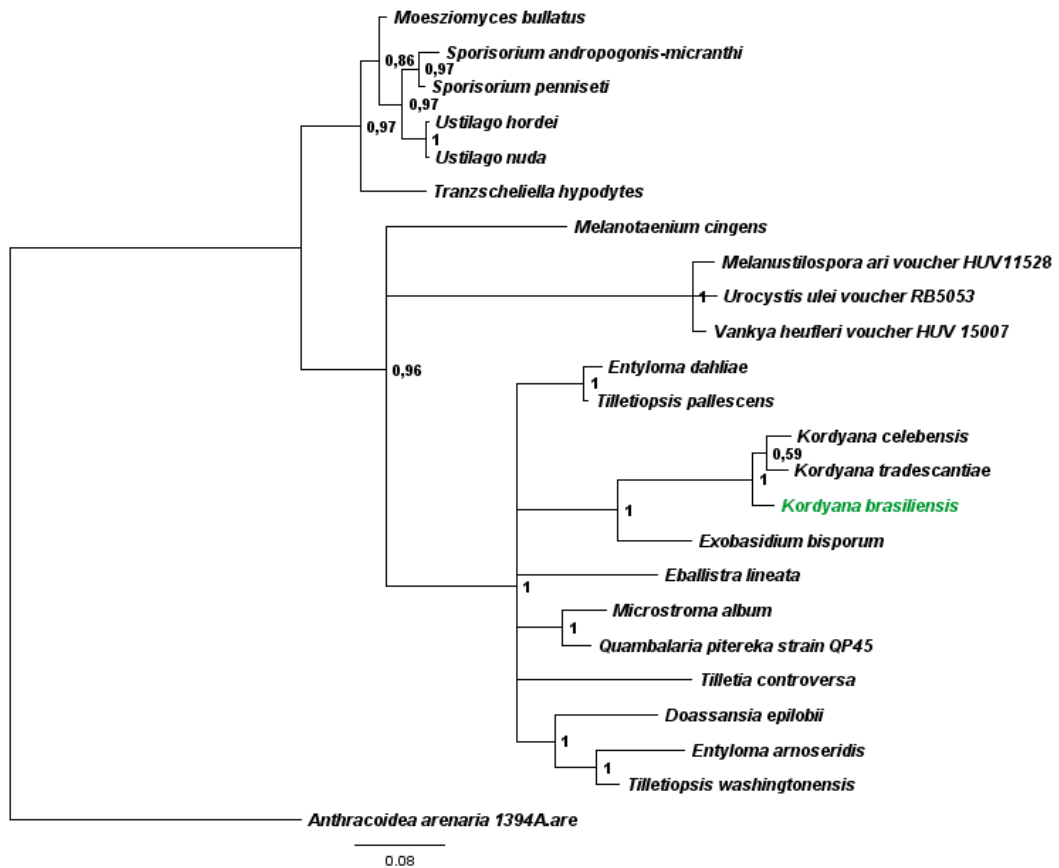


Figure 7. The 50% majority rule tree of 37,500 trees obtained from a Bayesian analysis of the LSU sequence alignment. Bayesian posterior probabilities are given at the nodes and the scale bar shows 0.08 expected changes per site. The tree was performed to evaluated the phylogenetics position of *Kordyana brasiliensis* rooted with *Anthracoidea arenaria* 1394Aare

ARTIGO 4

**Black mildew fungi (Meliolaceae) associated with *Schinus terebinthifolius*
(Brazilian pepper tree) in Brazil**

Black mildew fungi (Meliolaceae) associated with *Schinus terebinthifolius* (Brazilian pepper tree) in Brazil

Macedo, D. M.¹; Pinho, D. B.¹; Barreto, R. W.¹, Pereira, O. L.¹ e Cuda J.²

1 - Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

2 - Biological Weed Control, UF/IFAS Entomology & Nematology Dept., Bldg. 970, Natural Area Drive, PO Box 110620, Gainesville, FL 32611-0620, USA. .

corresponding author: rbarreto@ufv.br

Abstract

Irenopsis schini-terebenthifolii sp. nov., *Meliola chilensis* and *Meliola rhois* var. *africana* are described for the first time in association with *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae) Illustrations and a key to all Meliolaceae known in association with species belonging to the genus *Schinus* are provided.

Key words: invasive plant, mycobiota, taxonomy, tropical fungi, weed.

Introduction

Schinus terebinthifolius Raddi (Anacardiaceae), Brazilian pepper tree (known in Brazil as aroeira) is a small sized plant that is widely distributed in Brazil but also occurring in Argentina and Paraguay. It was introduced as ornamental or as a source of spice in many tropical and sub-tropical regions of the world becoming invader of natural ecosystems and provoking serious disruptions of such natural areas. It is now regarded as one of the worst plant invaders in Florida, Hawaii and New Zealand (Ferriter, 1997). It has been a target of biological control programs for several decades but these originally only involved the use of insect natural enemies (Cuda et al., 2006). Only recent studies involving the survey and evaluation of fungal pathogens of *S. terebinthifolius* were initiated in Brazil. Partial results of such surveys were published subsequently (Faria et al. 2008). These studies have revealed a significant diversity of pathogenic or purported pathogenic fungi in association with *S. terebinthifolius*, some of these have clear potential for use in biological control of Brazilian pepper tree namely *Septoria* sp. Wei (Faria et al., 2008). The present publication deals with a group of species collected on *S. terebinthifolius* that belongs to the fungal family Meliolaceae which were readily recognized as having no biocontrol potential although representing mycological novelties.

The family Meliolaceae includes approximately 2000 species most of which are from the tropics (Kirk, 2008). The main genera in this family are *Amazonia* Theiss, *Appendiculella* Höhn., *Asteridiella* McAlpine, *Irenopsis* F. Stevens and *Meliola* Fr. (Hansford, 1961). Fungi in the Meliolaceae together with the disease they cause on their host plants are commonly referred to as the black mildews. They have little economic importance even when attacking

cultivated plants since the disease severity is generally low (Sabulal et al. 2006; Hosagoudar et al. 1997). In some cases, particularly when the host-species is an ornamental plant and black mildew colonies are abundant, this may harm the appearance of infected plants rendering them unsightly, such as reported for *Asteridiella pittieri* (Toro) Hansf. attacking *Duranta repens* L. (Pereira et al. 2006).

Three distinct taxa of black mildew were found during the survey of the mycobiota of *S. terebinthifolius*. Even though of no relevance for its biocontrol it was recognized that these might represent mycological novelties, therefore deserving being further investigated. There is an obvious need to broaden the knowledge of the Meliolaceae in Brazil. This group has been largely neglected and little has been published on this fungal group in Brazil when compared with the large number of novel taxa in the Meliolaceae that has been published in other tropical countries (Crane & Jones, 2001; Housagoudar and Shiburau, 2002; Song and Li, 2004; Biju et al., 2005; Rodriguez and Piepenbring, 2007).

Materials and methods

An intensive survey of the mycobiota of *S. terebinthifolius* was performed at two different periods September 2001 to May 2003, concentrated in a small part of southeastern Brazil in areas of the states of Rio de Janeiro, São Paulo and Minas Gerais and later in a wider area including the previous states plus Espírito Santo, Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul and also some *ad hoc* collections in the state of Pernambuco from 2008 to 2010. Foliage of *S. terebinthifolius* bearing black mildew colonies were either collected and dried in a plant press or observed while still fresh. The samples were examined under a

stereomicroscope "Olympus SZX7". Representative structures were either scraped or removed with an adhesive tape and mounted on lactophenol. Slides were examined and fungal structures were measured and illustrated under a light microscope Olympus BX 51 equipped with a digital camera Olympus e-volt 330 and a drawing tube. Representative specimens were deposited in the local herbarium at the Universidade Federal de Viçosa (Herbarium VIC).

Results and Discussion

Meliola chilensis Speg., Beihefte zur Sydowia 2:470. 1961 (Fig. 1)

Colonies amphigenous, mostly epiphyllous, black, dense, subvelvety, up to 0.6-2.7 mm diam. Hyphae crooked, composed of dark brown septate, cells mostly 15.0- 26.5 x 7.5-9.0 μm , branching alternate or irregular at acute or irregular angles, producing apleria and conidiogenous cells. Apleria alternate, subantrorse, straight or bent; stalk cells cylindrical to cuneate, brown, 7.5x 10.0 x 7.5-9.0 μm , head cell cylindrical-clavate and entire, straight or bent, or sometimes rounded-angulose to sublobate, brown or red brown, 14.0-20.0 x 13.0-19.0 μm . Conidiogenous cells (phialides) separate, opposite or alternate, ampulliform, brown, 11.0-15.0 x 5.0-7.0 μm . Mycelial setae numerous, scattered, straight or slightly flexuous, 7-12 septate, simple, apex obtuse, dark brown, 332.0-550.0 x 7.5-10.0 μm . Perithecia in a central group, black, globose, verrucose, 213.0-344.5 μm diam. Asci evanescent. Ascospores oblong, obtuse, hyaline when inside the ascus, becoming brown with age, rounded at the tips, 4-septate, constricted at the septa, dark brown, 46.0-52.0 x 15.0-20.0 (19.0) μm .

Known distribution: Paraná and Minas Gerais (Brazil).

Material examined: BRAZIL, Minas Gerais, Heliadora, on leaves of *Schinus terebinthifolius*, 08 July 2008, D. M. Macedo (VIC 31323). BRAZIL, Paraná, Bacaetava, on leaves of *Schinus terebinthifolius*, 09 July 2008, D. M. Macedo (VIC 31322), BRAZIL, Minas Gerais, São Brás do Suaçuí, on leaves of *Schinus terebinthifolius*, 28 October 2009, D. M. Macedo (VIC 31336). BRAZIL, Minas Gerais Viçosa, Barbacena, on leaves of *Schinus terebinthifolius*, 28 October 2009, D. M. Macedo (VIC 31337).

Meliola rhois Henn. var. *africana* Hansf., Beihefte zur Sydowia 2:469. 1961 (Figs 2-3)

Colonies amphigenous, mostly epiphyllous, black, dense, velvety, up to 0.3-2.6 cm diam. Hyphae substraight to sinuous, composed of dark brown septate hyphae, cells mostly 12.5-25.0 x 7.5-9.0 μm , branching usually alternate at acute angles, producing apressoria and conidiogenous cells. Apressoria alternate, more or less antrorse, straight or bent; stalk cells cylindrical to cuneate, brown, 6.0-10.0 x 6.0-7.5 μm , head cell irregularly lobate, versiform, from elongate-clavate to broader than long straight or variously bent, brown, 12.5-22.5 x 12.5-17.5 μm . Conidiogenous cells (phialides) separate, opposite or alternate, ampulliform, brown, 17.5-25.0 x 7.5-9.0 μm . Mycelial setae numerous, scattered, straight, 6-12 septate, simple, apex acute, dark brown, 314.0-527.0 x 8.5-10.0 μm . Perithecia in a central group, black, globose, verrucose, 243.0x354.0 μm diam. Asci evanescent. Ascospores oblong to subellipsoid,

obtuse, hyaline when inside the ascus, becoming brown with age, rounded at the tips, 4 septate, constricted at the septa, dark brown, 45.0-52.5 x 14.0-19.0 μm .

Known distribution: Rio de Janeiro

Material examined: BRAZIL, Rio de Janeiro, Nova Friburgo, Mury, on living leaves of *Schinus terebinthifolius*, 11 April 2008, D. M. Macedo (VIC 31320).

Irenopsis schini-terebinthifolii Macedo & Barreto, sp. nov. MycoBank MB 518069 (Fig. 4-5)

Etymology: based on the host species *Schinus terebinthifolius*.

Differs from *I. comocladiae* colonies up to 0.4-2.1 cm; hyphae cellular 15.0-40.0 x 7.0-9.0 μm . Appressoria, cellular basal cylindrical or wedge-shaped, 6.0-11.0 x 6.0-10.0 μm ; cellular apical wedge-shaped or pyriform, 12.0-19.0 x 11.0-16.0 μm . Cellular conidiogenous mixed with appressoria, opposite, conical or ampulliform, 19.0-21.0 x 6.0-8.0 μm . Perithecia mammiform, 167.5-300.0 μm diam; setae perithecial straight or moderately curved, 1-2 septate, 64.0-140.0 x 5.0-7.0 μm diam; Ascospores 40.0-50.0 x 15.0-23.0 μm .

Holotype : BRAZIL, Rio de Janeiro, Casimiro de Abreu. On living leaves *Schinus terebinthifolius*, 11 April 2008, D. M. Macedo (VIC 31318).

In foliis *Schinus terebinthifolius* Raad (Anarcadiaceae).

Colonies amphigenous, mostly hypophyllous, confluent, black, dense, scattered, up to 0.4-2.1 mm diam. Hyphae straight to substraight or undulate, composed of dark brown septate hyphae, 15.0-40.0 x 7.0-9.0 μm , branching opposite at acute or wide angles, producing apressoria and conidiogenous cells. Appressoria alternate, antrorse, slightly bent; stalk cells cylindrical to cuneate, brown, 6.0-11.0 x 6.0-10.0 μm , head cell ovate, cuneate, entire or rounded-angulose, brown or red brown, 12.0-19.0 x 11.0-16.0 μm . Conidiogenous cells (phialides) mixed with appressoria, opposite, conoid to ampulliform, brown, 19.0-21.0 x 6.0-8.0 μm . Peritecial setae straight, 1-2 septate, simple, apex obtuse, dark brown, 64.0-140.0 x 5.0-7.0 μm . Perithecia black, scattered, globose, mammiform, 167.5-300.0 μm diam. Asci evanescent. Ascospores oblong to subellipsoid, often pointed at apex, obtuse, hyaline when inside the ascus, becoming brown with age, rounded at the tips, 4-septate, constricted at the septa, dark brown, 40.0-50.0 x 15.0-23.0 μm .

Known distribution: Rio de Janeiro and Minas Gerais (Brazil).

Material examined: BRAZIL, Rio de Janeiro, Rodovia Serramar (RJ 162) sentido Casimiro de Abreu, on living leaves of *Schinus terebinthifolius*, 11 April 2008, D. M. Macedo (VIC 31318). BRAZIL, Rio de Janeiro, Parque Nacional de Jurubatiba, 9 April 2008, D. M. Macedo (VIC 31319). BRAZIL, Rio de Janeiro, Rodovia Serramar (RJ162) Casimiro de Abreu, 11 April 2009, D. M. Macedo (VIC 31321). BRAZIL, Minas Gerais, Ponte Nova (BR 262), 22 August 2008, D. M. Macedo (VIC 31325). BRAZIL, Minas Gerais Viçosa, Padre Viegas, 22 August 2008, D. M. Macedo (VIC 31326). BRAZIL, Minas Gerais Viçosa, Catas Altas, 24 August 2008, D. M. Macedo (VIC 31226). BRAZIL, Minas Gerais Viçosa, Antonio Pereira, 25 August 2008, D. M. Macedo (VIC 31340). BRAZIL, Rio de Janeiro, Paraty, Estação Ecológica de Tamoios, 01 April 2009, D. M. Macedo (VIC 31332). BRAZIL, Rio de Janeiro, Paraty, Centro, 01 April 2009, D. M. Macedo (VIC 31330); BRAZIL, Minas Gerais, Lambari (Parque Estadual de Nova Baden), 23 March 2009, D. M. Macedo (VIC 31334).

The three meliolaceous fungi collected on *S. terebinthifolius* clearly belonged to *Irenopsis* and *Meliola*. The latter is easily separated from *Appendiculella*, *Asteridiella* and *Irenopsis* by having mycelial setae whereas *Asteridiella* has no setae, *Appendiculella* has perithecia bearing larviform appendages and *Irenopsis* has setose perithecia (Hansford, 1961).

Forty-two species and seven infra-specific taxa in Meliolaceae are known in association with members of the Anacardiaceae. The majority are species of, *Meliola* - thirty-eight species and seven infra-specific taxa (Hansford, 1961; Hosagoudar, 1996; Hosagoudar e Archana, 2009). The following species of Meliolaceae have been reported in association with members of *Schinus*:

Meliola chilensis Speg., *M. lanigera* Speg., *M. rhoina* Doidge, *M. rhoina* var. *schini* Hansf., *M. rhois* var. *africana* Hansf. and *M. rhois* var. *lithraeae* Hansf. (Hansford, 1961; Mafia et al., 2004; Farr and Rossman, 2010; Mendes and Urben, 2010). With the exception of *M. chilensis*, all of these taxa were reported from Brazil but only *M. lanigera* was reported in association with *S. terebinthifolius*. The first taxon described in this work fits well within the description of *M. chilensis*, a fungus originally known from *Schinus latifolius* (Gillies ex Lindl.) Engl. and *Schinus latifolius* var. *tomentosus* Fenzl in Chile. The second taxon clearly belongs to *M. rhois* var. *africana*, a fungus reported from Uganda and Congo on *Rhus glaucescens* A. Rich.; and on *Protorhus longifolia* (Bernh.) Engl. in South Africa; on *Schinus dependens* Ortega in Brazil and *Schinus molle* L. in Argentina, Brazil and Paraguay. Therefore, the two taxa of *Meliola* described in this work are being reported for the first time on *S. terebinthifolius*. There are often more than one species of black mildew associated with plants of the Anacardiaceae. For instance *S. latifolius* is a host for both *M. chilensis* and *M. rhoina* var. *schini* and *S. dependens* is a host for *M. lanigera*, *M. rhoina* and *M. rhois* var. *africana*.

There are only two species of *Irenopsis* described on members of the Anacardiaceae: *I. comocladiae* (F. Stevens) F. Stevens and *I. portoricensis* F. Stevens. The new species described in *S. terebinthifolius* is the first species in the genus to be reported on a member of the *Schinus* and differs from other species of *Irenopsis* for having the combination of mammilate perithecia, simple and straight perithecial setae, longer cells at the base of the appressoria and larger ascospores than those of *I. comocladiae* and *I. portoricensis*

Acknowledgements

This study makes part of a DS thesis presented by D. M. Macedo to the Departamento de Fitopatologia/Universidade Federal de Viçosa and was performed with financial support from USDA. The first author acknowledge Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) by the scholarship. R. W. Barreto e O. L. Pereira acknowledge the financial support Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),

References

Biju CK, Hosagoudar VB, Abraham TK.2005. Meliolaceae of Kerala, India - XV. Nova Hedwigia 80(3-4): 465-502.

Crane JL, Jones AG.2001. Nomenclatural and taxonomics revisions in the Meliolaceae. Mycotaxon 77: 145 – 151.

Faria ABV, Barreto RW, Cuda J .2008. Fungal pathogens of *Schinus terebinthifolius* from Brazil as potential biocontrol agents. In: XII International Symposium on Biological Control of Weeds, Proceedings of the XII International Symposium on Biological Control of Weeds. Wallingford eds: Julien MH, Sforza R, Bon MC, Evans HC, Hatcher PE, Hinz HL, Rector BG; CAB International, p. 270-277.

Farr DF, Rossman AY .2010. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Available at: <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/> [Verified 22 February 2010]

Ferriter A .1997.Brazilian pepper management plan for Florida recommendations from Brazilian pepper task force & Florida pest council. Brazilian pepper task force chairman. 26pp.

Hansford CG.1961. The Melionaceae A Monograph. Beiheth. Sydowia 2: 1 – 806.

Hofmann TA, Piepenbring M. 2008. New species and records of *Asterina* from Panamá. *Mycological Progress* 7(2): 87 – 98.

Hosagoudar VB (1996) *Meliolales of India*. Botanical Survey of India, Calcutta, 363 pp.

Hosagoudar VB, Abraham TK, Krishnan PN, Vijayakumar K .1997. Biochemical changes in the leaves of ebony tree affected with black mildew. *Indian Phytopathology* 50: 439-440.

Hosagoudar VB, C. K. Biju, Abraham TK, Crane JL. 2000. *Meliolaceae of Kerala, India – VII*. *Mycotaxon* 76: 299-304.

Hosagoudar VB, Shiburaj S.2002. *Meliola gamsii* sp nov (Ascomycetes, Meliolales) from Kerala, India. *Nova hedwigia* 74(3-4): 411-413.

Hosagoudar VB, Archana GR .2009. Host range of meliolaceous fungi in India. *Journal of Threatened Taxa* 1: 269-282

Jain MK, YU B, Rogers JM, Smith AE, Boger ETA, Ostrander RL, Rheingold, AL. 1995. Specific Competitive inhibitor of Secretes Phospjolipase A2 from Berries of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry* 39: 537-47.

Kirk PM, Cannon PF, MinterJA, Stalpers JA. 2008. *Dictionary of Fungi*. 10th ed. Wallingford, UK. CAB International. 771pp.

Mafia RG, Alfenas AC, Andrade GCG, Neves DA, Graça RN, Alonso SK. 2004. Incidência de *Meliola rhoina* como fator limitante à produção de mudas de *Schinus molle* para fins de arborização. Fitopatologia Brasileira 29:224.

Mendes MAS, Urben AF. 2010. Fungos relatados em plantas no Brasil, Laboratório de Quarentena Vegetal. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Available at: <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/fgbanco01.asp> [Vericado 22 Fevereiro 2010]

Pereira OL, Soares DJ, Barreto RW .2006. First report of *Asteridiella pittieri* on golden dewdrop *Duranta repens* var. *aurea* in Brazil. Australasian Plant Disease Notes 1: 17-18.

Rodriguez D, Piepenbring M.2007. Two new species of *Appendiculella* (Meliolaceae) from Panama. Mycologia 99(4): 544-552.

Sabulal B, Hosagoudar VB, Pradeep NS, Dan M, George V .2006. Chemical composition and antimicrobial activity of *Meliola toddaliae* infected leaf oil of *Pamburus missionis*. Journal of Mycopathological Research 44: 237-242.

Song B, Li TH .2004. Studies on the genus *Asteridiella* of China 2. Mycotaxon 89(1): 201-204.

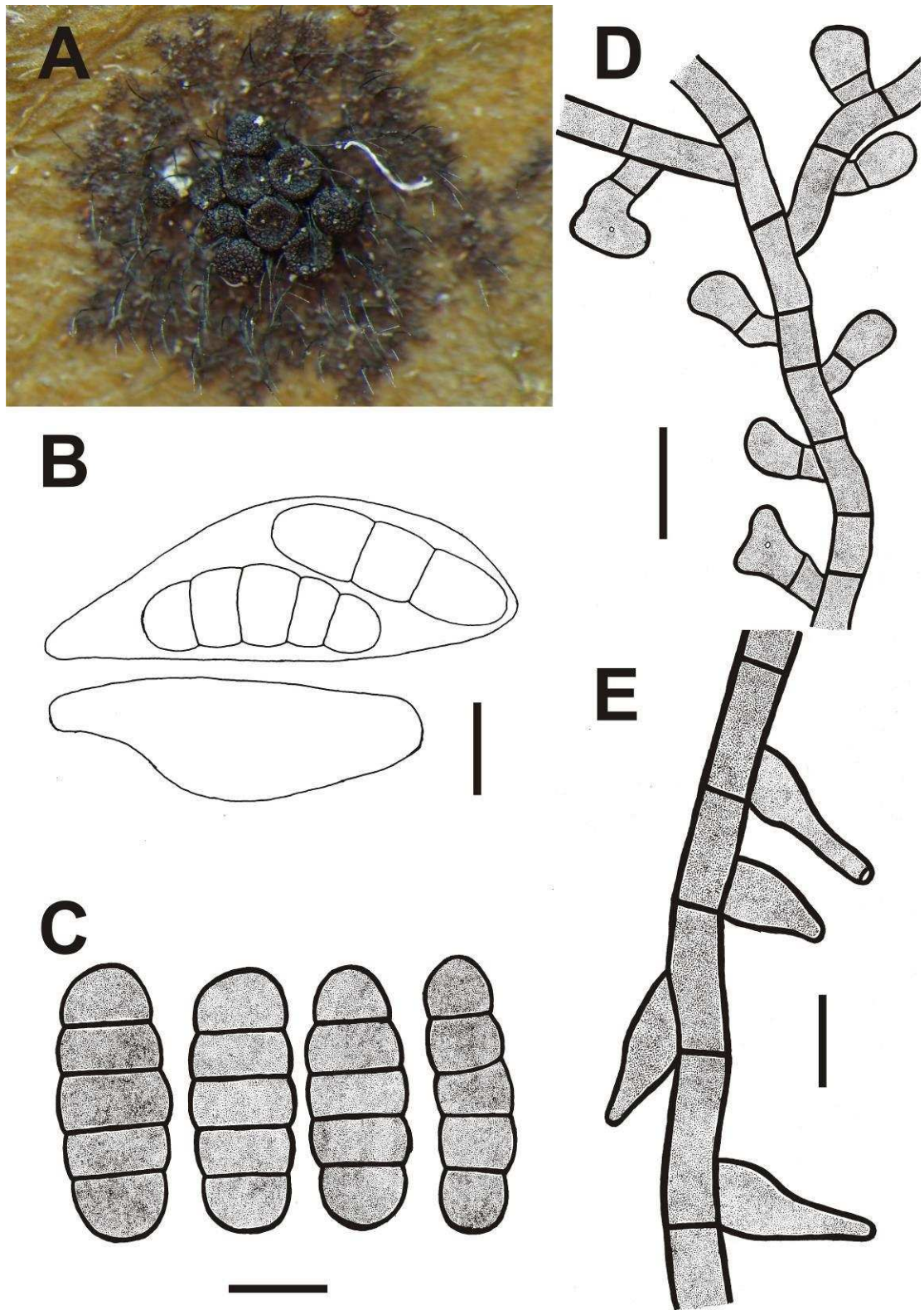


Fig. 1. *Meliola chilensis*. A. Colony on leaf of *Schinus terebinthifolius* B. Asci and immature ascospores C. Ascospores D. Appressoria on hypha E. Conidiogenous cells on hypha (Bar=20 μ m)

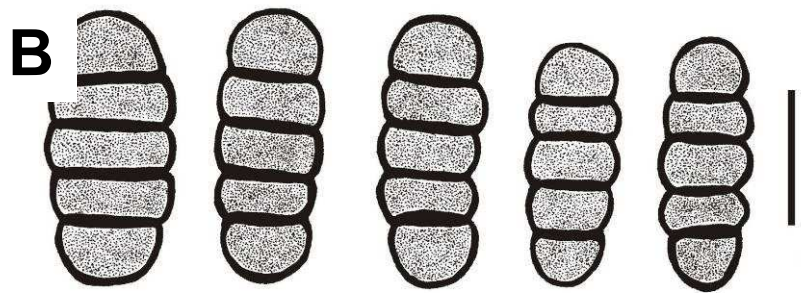
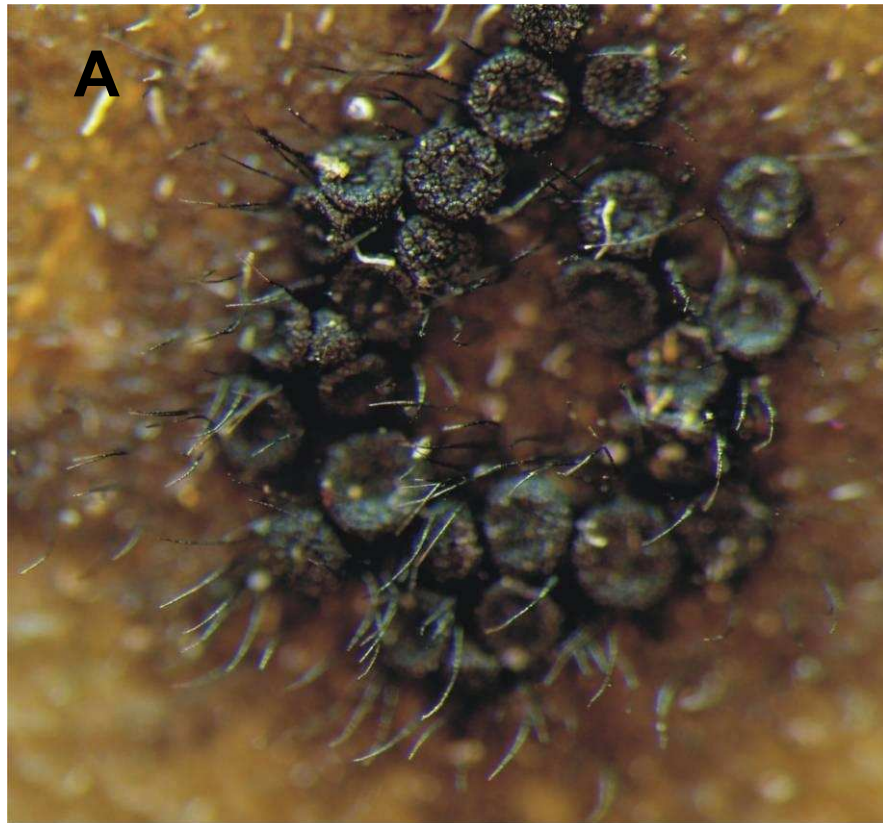


Figure 2. *Meliola rhois* var. *africana* A. Colony on a leaf of *Schinus terebinthifolius* B. Ascospores (Barrs= 20 μ m).

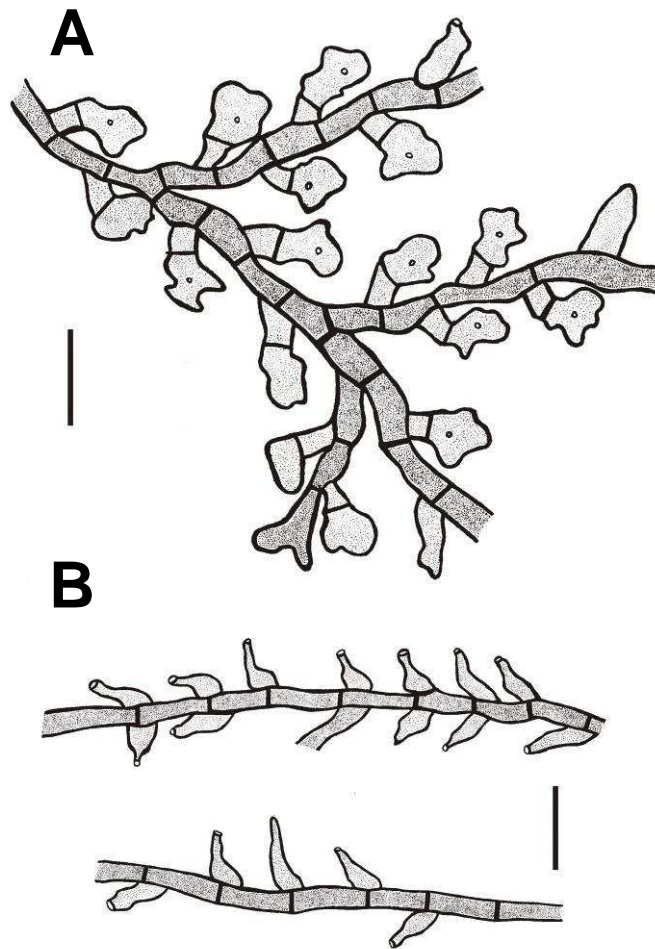


Figure 3. *Meliola rhois* var. *africana*: A. Appressoria on hypha (Bar= 20 μ m) B. Conidiogenous cells on hyphae (Bar= 30 μ m).

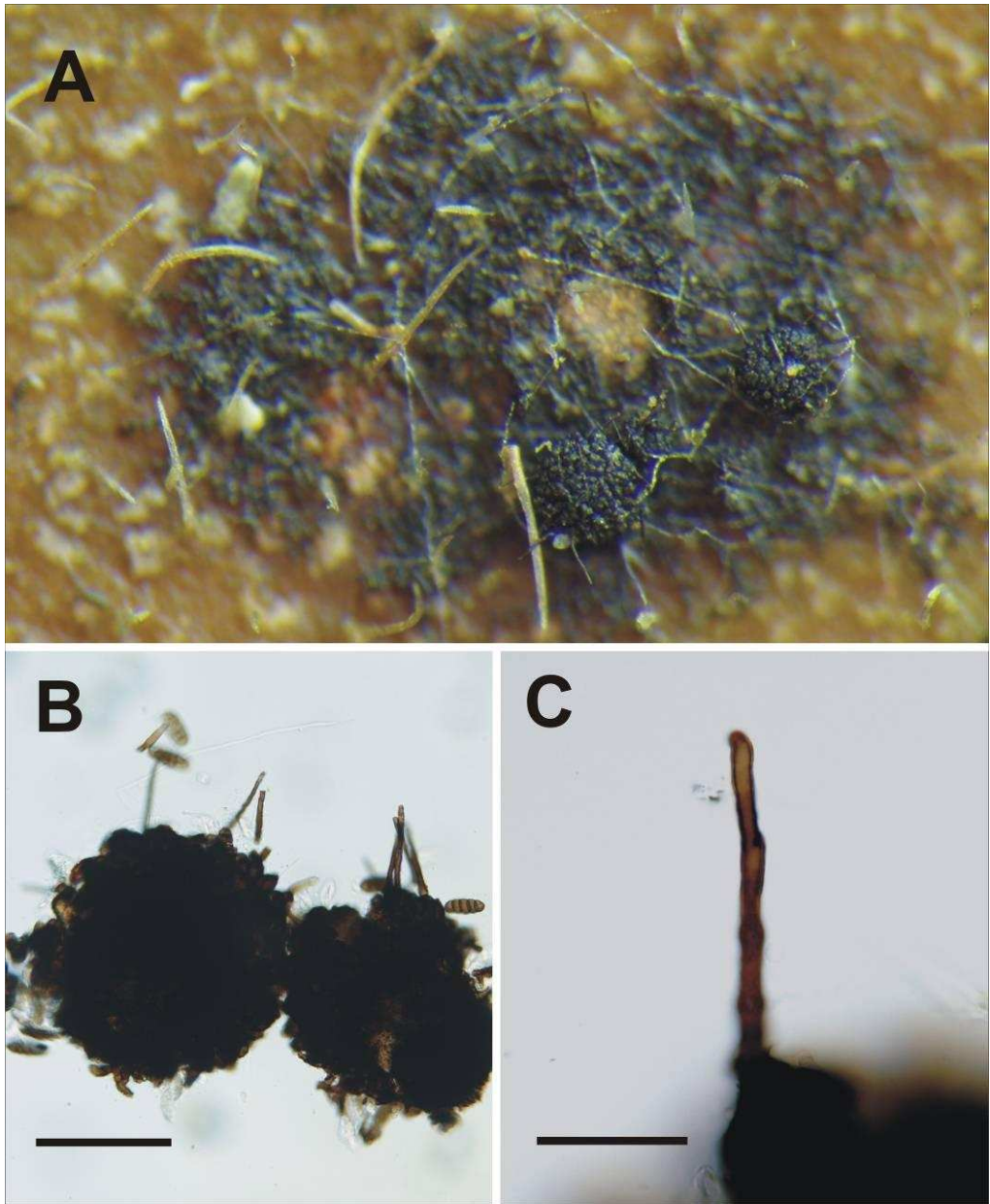


Figure 4. *Irenopsis schini-terebenthifolii* A Colony on leaf of *Schinus terebinthifolius* B. Setose perithecia C. Close-up of perithecial seta (Bar=25 μ m)

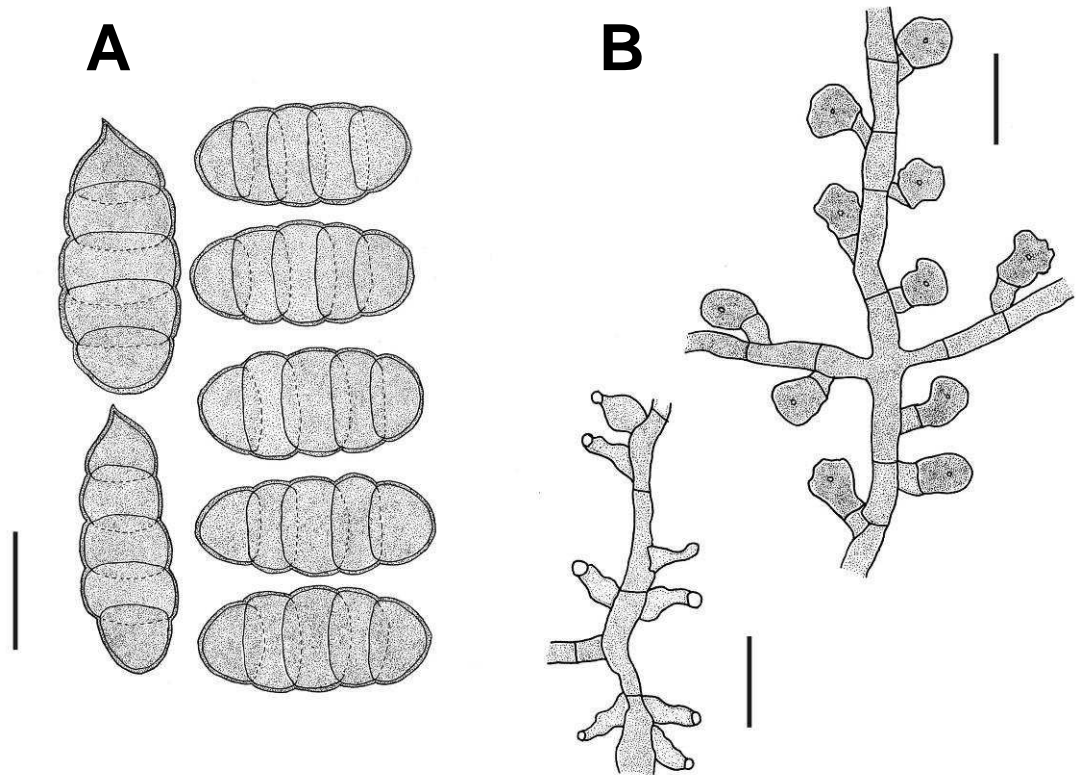


Figure 5. *Irenopsis schini-terebenthifolii* A Ascospores (note two spores bearing pointed cells on left (Bar = 45 μ m) B. Appressoria and conidiogenous cells on hyphae (Bar= 20 μ m)

ARTIGO 5

***Corynespora cassicola* f. sp. *schinii*, um novo patótipo identificado no Brasil com potencial para o uso no controle biológico de aroeira (*Schinus terebinthifolius*)**

***Corynespora cassiicola* f. sp. *schinii*, um novo patótipo identificado no Brasil com potencial para o uso no controle biológico de aroeira (*Schinus terebinthifolius*)**

D.M. Macedo^A, O. L. Pereira^A, Wheller, G. S.^C and R.W. Barreto^{A,B}

^A Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 36570-000, Brazil

^C USDA Agricultural Research Service, Invasive Plant Research Laboratory, 3225 College Avenue, Fort, Lauderdale, FL 33314, USA

[^Brbarreto@ufv.br](mailto:rbarreto@ufv.br)

Abstract

An isolate of *Corynespora* was collected in Brazil (state of Espírito Santo) causing severe leaf spot and foliage blight on *Schinus terebinthifolius* (Brazilian pepper tree, local name aroeira) which is a major environmental weed in many warm areas of the globe. This plant has been the target of a classical biological control project involving pathogens collected in Brazil for several years. Examination of its morphology and DNA analysis has shown that this fungus belongs to *Corynespora cassiicola*. A host-range test involving 22 species, including 8 species in the Anacardiaceae, besides *S. terebinthifolius* has

confirmed its specificity to *S. terebinthifolius* which was the only species to be attacked. Of significance is the fact that plants of Brazilian pepper tree that were included in the test representing biotypes of the plant from Florida and Hawaii became severely diseased. This high level of specificity allowed its recognition as the new *forma specialis Corynespora cassiicola* f. sp. *schinii*. This, coupled with the high level of disease severity observed both from natural infection as observed in the field and as a result of inoculations under controlled conditions indicates that *C. cassiicola* f. sp. *schinii* has potential to be used in classical introductions against Brazilian pepper tree.

Key words: Anacardiaceae, host-specificity, hyphomycete, invasive weed, taxonomy.

Introdução

Schinus terebinthifolius Raddi. é uma espécie nativa do Brasil, Argentina e Paraguai, pertencente à família Anacardiaceae, conhecida vulgarmente no Brasil como “aroeira mansa” ou “aroeira-vermelha”. Encontra-se distribuída do nordeste ao sul do país (Lorenzi & Souza, 1992). Este representante da família Anacardiaceae é muito utilizado na medicina alternativa (Cuda et al., 2006), na construção rural, produção de lenha e carvão, na ornamentação e na recuperação de áreas degradadas (Lorenzi, 1992). Nos EUA, *S. terebinthifolius* foi introduzida no Estado da Flórida, em meados do século XIX, como ornamental, mas se tornou uma das piores plantas invasoras de ecossistemas naturais, afetando a biodiversidade das regiões central e sul dos EUA (Cuda et al, 2006). Atualmente é também considerada uma das 20 piores plantas invasoras na Austrália onde é alvo do controle biológico (Hayes & Paynter, 2009). Como parte do esforço para se mitigar as graves invasões de ecossistemas por *S. terebinthifolius* tem sido procurados agentes de controle biológico em seu centro de origem no Brasil, Argentina e Paraguai. Apenas relativamente recentemente foi dado início a uma busca sistemática por patógenos (sobretudo fungos) para uma possível introdução contra esta planta nos EUA. Um acordo de cooperação foi assinado entre o USDA nos EUA e a Universidade Federal de Viçosa (através da Fundação Arthur Bernardes) para essa finalidade. Originalmente só havia o registro de 5 espécies de fungos associados a *S. terebinthifolius* no Brasil (Farr & Rossman, 2010; Mendes & Urben, 2010). No período de 2001-2002, foi realizado um levantamento numa pequena porção da região sudeste (Rio de Janeiro e São Paulo) que resultou no registro de 11 novas associações de fungos a *S. terebinthifolius*. Como

resultado preliminar foi publicado um trabalho dando conta dos resultados parciais dos levantamentos efetuados numa primeira etapa (Faria et al. 2008). Dentre os fungos encontrados uma espécie de *Septoria*, mereceu particular atenção por apresentar características de um potencial agente de bicontrol. Infelizmente, os estudos preliminares sobre a especificidade desta espécie revelou que ela era capaz de atacar uma espécie de Anacardiaceae nativa dos EUA – *Rhus michauxii* Sarg. - que é listada como espécie ameaçada de extinção, prejudicando a possibilidade de sua introdução (Cuda, J. – comunicação pessoal). Há ainda dúvidas se o resultado observado não representaria uma aberração laboratorial decorrente de uso de concentrações excessivas de inóculo ou anormalmente favoráveis à infecção e novos estudos estão em andamento para testar esta hipótese, a de não ocorrer problemas com a infecção do fungo a esta espécie rara de *Rhus*. No período de 2008 a 2009, novos levantamentos foram realizados na região sul e sudeste do país, para ampliar o levantamento e aprimorar o conhecimento sobre a micobiota de *S. terebinthifolius*. Os organismos obtidos neste novo levantamento serão descritos separadamente. O presente trabalho trata unicamente de uma espécie trazida ao laboratório por um dos autores em coleta independente feita no estado do Espírito Santo e envolve a elucidação de sua identidade e a avaliação de sua especificidade.

Material e métodos

Uma única coleta independente foi feita na região litorânea do estado do Espírito Santo (Meaípe, Brasil) de amostra obtida de planta de aroeira apresentando manchas foliares evoluindo para queima da folhagem. A amostra foi desidratada numa prensa botânica e encaminhada para o laboratório para estudos adicionais. Parte representativa foi depositada no herbário local (VIC). Para a observação da morfologia foram preparadas laminas estruturas fúngicas montadas em lactofucsina. As observações foram realizadas com o auxílio de um microscópio de luz “Olympus BX 51” com uma câmera digital Olympus® e-volt 330 acoplada.

Culturas puras foram obtidas pela transferência de conídios obtidos de colônias fúngicas sobre lesões típicas para placas contendo o meio de cultura CVA (Pereira et al. 2003) como auxílio de um estilete esterilizado. A descrição da culturas foi com os meios de cultura – CVA, BDA (Batata-dextrose-ágar) EMA 2% (Extrato de malte agar 2%). Além disso, as placas foram acondicionadas em uma câmara de crescimento à 25 ± 2 °C; 2 regimes de fotoperíodo, 12h e escuro. Avaliou-se a morfologia, topologia e coloração das culturas após uma semana. No caso da da coloração das colônias, a avaliação foi realizada com a escala de Rayner 1970. O teste de patogenicidade/especificidade foi efetuado com a produção de conídios em arroz como substrato. Inicialmente para a produção do inoculo em arroz, o isolado OLP 559, foi cultivado em CVA por uma semana, conforme descrito acima. Logo após, realizou-se a produção de micélio em meio líquido em 4 béquer de vidro de 250 mL contendo 150 mL do meio batata-cenoura (200 g/L – 200g de batata + 200 g de cenoura/L de água), previamente esterilizados Logo após o resfriamento do meio líquido, foram

depositados 5 discos de micélio do isolado (20 mm de diam) em cada erlenmeyer. Feito isto, os erlenmeyers foram acondicionados em agitador orbital a uma rotação de 150 rpm por 4 dias. Após este período, em 150g de arroz foi adicionado 75% de água (p:v). O arroz foi embalado em sacos plásticos de polipropileno autoclaváveis, os quais foram autoclavados por 1h a 120°C. Após o resfriamento do substrato, 150 mL da suspensão de micélio foi depositada e revolvida. Após 4 dias, a embalagem foi aberta com o auxílio de uma tesoura para permitir a troca gasosa do ambiente. No oitavo dia, o substrato foi lavado com 250 mL de água destilada esterilizada em um béquer de plástico com o auxílio de um bastão de vidro. A suspensão obtida foi depositada em um bequer de vidro de 500 mL. Logo após, o substrato colonizado, foi depositado em uma bandeja de alumínio e acondicionado em uma câmara de crescimento conforme descrito acima, para posteriores lavagens. Neste procedimento, todos os utensílios utilizados foram desinfestados com álcool 70%. A suspensão de conídios foi calibrada sob o auxílio de um hemacitometro a uma concentração 1×10^5 conídios/mL. A inoculação foi realizada sob o auxílio de um atomizador elétrico. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 48h à 25 °C e a seguir encaminhadas para uma casa de vegetação e mantidas a aproximadamente 25 °C. A inoculação envolveu 22 espécies de plantas além de plantas de *S. terebinthifolius* representando duas populações da planta onde o problema de invasões de ecossistemas naturais ocorre nos EUA (Flórida e Havai) seguindo um esquema centrífugo-filogenético simplificado. Neste teste, foram utilizados 10 espécies da família Anacardiaceae, 2 espécies do gênero *Schinus*, 13 espécies de 7 famílias próxima a família Anacardiaceae da ordem

Sapindales e hospedeiros conhecidos de *Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei conforme Wapshere (1974). (Tabela 1)

O DNA genômico total foi extraído pelo método CTAB (Murray e Thompson, 1980) A região foi amplificada por PCR, utilizando primers ITS-1 - TCCGTAGGTGAACCTGCGG e ITS4 - 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3 (White et al., 1990). Os fragmentos da PCR foram purificados, e as seqüências de nucleotídeos foi determinado com o método cíclico de reação de terminação com o Terminator Cycle Sequencing BigDye Kits (Applied Biosystems), com os mesmos primers utilizados para amplificação do DNA 1000™ MegaBACE Sequencing System.

A seqüência obtida da espécie em questão foi comparada, utilizando o protocolo BLAST, com a seqüência de outros isolados de *C. cassiicola* depositadas no Genbank (Altschul et al., 1997).

Resultados e discussão

Corynespora cassiicola (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei **f. sp. *schinii*** D. M. Macedo, O. L. Pereira & R. W. Barreto (Fig 1)

Lesões na face adaxial, inicialmente, apresentam pontuações negras, circulares a elípticas, progredindo para lesões elípticas a irregulares, levemente deprimidas na porção central, 1,5–2.5 × 1.0–4,5 mm. A face adaxial, a lesão apresenta as mesmas características da face abaxial, mas com a presença de pontuação necrótica na porção central da lesão. Além disso, verificou-se a

desfolha de ramos, posteriormente, lesões necróticas nos mesmos seguida da seca das ponteiros. *Conidióforos* isolados, retos, cilíndricos, 325,0–1175,0 × 5,0–7,0 μm, 5–18 septos, não ramificados, parede negra, superfície lisa. *Células conidiogênicas* terminais, integradas, holoblásticas, proliferação percorrente, cilíndricas, 20,0-12,0 x 5,0-8,0 μm, marrom claras. *Loci conidiogênicos* distintos, achatados, escuros e espessos, 3,0–5,0 μm. *Conídios* em cadeias, holoblásticos, obovóides a fusiformes, base truncada, 60,0-210,0 x 3,0-8,0 μm, 2-15 septos, cicatriz conidial espessada, marrom escuros, marrom claros, liso.

Em cultura: em BDA (no escuro e sob regime de luz de 12h) crescimento relativamente lento (9,0 cm diam em 13 dias), micélio aéreo cinza oliváceo pálido a cinza camundongo pálido (Nº 120), elevado a plano no sentido do centro à periferia da colônia, textura cotonosa, sem zonação diurna e com a presença de pigmentação difusa (âmbar); reverso cinza azulado. Em CVA, a colônia apresentava textura pulverulenta, elevada no centro seguido de região cotonosa/pulverulenta branca, sem liberação de pigmento no meio de cultura, reverso negro-esverdeado centralmente com periferia branca e micélio imerso dendrítico. Em EMA colônias de micélio imerso dendrítico, cinza palha, textura cotonosa, reverso com a parte central marrom escuro e o restante marrom esverdeado, com crescimento radial; zonação diurna ausente de todos os tratamentos e pouca esporulação.

Material examinado: BRAZIL, Espírito Santo, Meaípe (Praia de Bacutia), em folhas vivas de *Schinus terebinthifolius*, 25 Fevereiro 2008, O. L. Pereira (VIC 30789)

Os testes moleculares foram feitos com os primers mais utilizados na identificação de *C. cassicola* – ITS1 e ITS 4 para a confirmação da identidade do fungo (Silva et al., 1998; Qi et al., 2009). A comparação realizada da sequência de *C. cassicola* obtida neste trabalho com as seqüências depositadas no GenBank com os mesmos primers utilizados foi de 96% de homologia com as sequencias de *C. cassicola* depositadas no GenBank. Esse resultado combinado à morfologia equivalente à descrita para a espécie, por exemplo por Ellis (Ellis, 1957) apesar do isolado ser 3.0 µm mais largo do que os conídios de *C. cassicola* f.sp. *schinii* quando comparado às descrições publicadas foi considerado insuficiente para justificar uma distinção taxonômica a nível de espécie, permitem concluir que o fungo encontrado em *S. terebinthifolius* pertence à *C. cassicola*.

Quarenta e oito horas após a inoculação das plantas incluídas no teste centrífugo-filogenético da aplicação do inóculo as plantas somente as plantas de *S. terebinthifolius* da Flórida e do Hawaii apresentaram sintomas de manchas foliares e já se observou desfolha de plantas (Fig. 2). Nada foi observado nas outras plantas inoculadas nesta ocasião. O acompanhamento dos sintomas das plantas infectadas,verificou que após 10 dias pode ser observado queima foliar e desfolha crescente das plantas de *S. terebinthifolius* com o surgimento de lesões necróticas na ponta das hastes, die-back e morte. A doença não foi observada em nenhuma das outras espécies inoculadas.

As informações publicadas sobre *C. cassicola* sugerem que se trata de um fitopatógeno inespecífico, associado a mais de 300 hospedeiros (Farr & Rossman, 2010). O seu uso no controle biológico clássico pareceria, à primeira

vista, pouco recomendável. No entanto existem evidências de que *C. cassiicola* represente na verdade um complexo populacional que inclui desde formas polífagas até formas muito específicas. Inclusive há outros exemplos de populações de *C. cassiicola* que foram estudadas e se mostraram específicos a uma única ou poucas espécies hospedeiras tendo o seu status reconhecido como o de *formae specialis*. Um exemplo advém inclusive de estudos voltados ao controle biológico de uma importante planta invasora nativa do Brasil e invasora de ecossistemas exóticos: *Lantana camara* L. Isolados de *C. cassiicola* obtidos de *L. camara* se mostraram altamente específicos sendo capazes apenas de infectar determinadas populações de *L. camara* e incapaz até mesmo de infectar outras espécies de *Lantana*. O fungo foi reconhecido com uma *forma specialis* de *C. cassiicola* (*Corynespora cassiicola* f. sp. *lantanae*) e considerado seguro para utilização como agente de controle biológico clássico ou como mico-herbicida (Pereira et al., 2003). Outros autores também propuseram o reconhecimento de *formae specialis* deste fungo em outros patossistemas (Silva et al, 1998; Onesirosan et al., 1974; Spencer & Walters, 1969).

Na família Anacardiaceae, *C. cassiicola*, foi relatada somente em *Spondias purpúrea* L. (Freire, 2005) e *Mangifera indica* (Farr & Rossman, 2010; Mendes & Urban, 2010). No presente trabalho, verificou-se pelos resultados do teste de especificidade centrífugo-filogenético, que o fungo é um promissor agente de biocontrole para *S. terebinthifolius*, tanto na Flórida quanto no Havaí. Existe apenas um relato isolado e desacompanhado de qualquer informação complementar sobre a ocorrência de *Corynespora* sp. na Flórida sobre *S. terebinthifolius* (Farr & Rossman, 2010; Alfieri Jr et al., 1984). Tendo em vista a importância desta planta invasora e a severidade da doença que *C. cassiicola* f.

sp. *schinii* causa ao seu hospedeiro, é improvável que sua suposta ocorrência na Flórida tivesse passada despercebida neste estado. Sua introdução para fins de controle biológico clássico bem como desenvolvimentos adicionais voltados à abordagem inundativa parecem justificados.

Agradecimentos

Essa pesquisa faz parte da tese de doutoramento de D. M. Macedo e foi desenvolvida com apoio financeiro do USDA. O primeiro autor agradece à FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pela bolsa de estudos. R. W. Barreto e O. L. Pereira agradecem ao CNPq pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas

Alfieri Jr. SA, Langdon KR, Wehlburg C, Kimbrough JW (1984) Index of Plant Diseases in Florida (Revised). Florida Dept. Agric. and Consumer Serv., Div. Plant Ind. Bull. 11: 1-389.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.

Hayes L, Paynter Q (2009) What's New in Biological Control of Weeds? Manaaki Whenua Landcare Research Issue 48.

Cuda JP, Ferriter AP, Manrique V, Medal JC (2006) Florida's Brazilian peppertree management plan: recommendations from the Brazilian pepper Task Force & Florida Exotic Pest Council. 81pp.

Ellis MB (1957) Some species of *Corynespora*. *Mycological Paper* 65: 1 – 18.

Farr DF, Rossman AY (2010) Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Available at: <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/> [Verified 22 February 2010]

Faria ABV, Barreto RW, Cuda J (2008) Fungal pathogens of *Schinus terebinthifolius* from Brazil as potential biocontrol agents. In: XII International Symposium on Biological Control of Weeds, eds: Julien MH, Sforza R, Bon MC, Evans HC, Hatcher PE, Hinz HL, Rector BG Proceedings of the XII International Symposium on Biological Control of Weeds. Wallingford : CAB International, p. 270-277.

Freire FCO (2005) An update list of plant fungi from Ceará state (Brazil) – I Hyphomycetes. *Revista Ciência Agronômica* 36(3) 364-370.

Hayes L, Paynter Q (2009) What's New in Biological Control of Weeds? *Manaaki Whenua Landcare Research Issue* 48.

Lorenzi H, Souza HM (1992) 'Árvores do Brasil'. (Editora Plantarum: Nova Odessa).

Mendes MAS, Urban AF (2010) Fungos relatados em plantas no Brasil, Laboratório de Quarentena Vegetal. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Available at: <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aigweb/michtml/fgbanco01.asp>

[Verified 22 February 2010]

- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Research*, 8, 4321-4325.
- Onesirosan PT, Army DC, Durbin RD (1974) Host specificity of Nigerian and North American isolates of *Corynespora cassiicola*. *Phytopathology* 64: 1364 – 1367.
- Pereira JM, Barreto RW, Ellison CA, Maffia LA (2003) *Corynespora cassiicola* f. sp. *lantanae*: a potential bicontrol agent from Brazil for *Lantana camara*. *Biological Control* 26: 21 – 31.
- Qi Y, Xie Y, Zhang X, Pu J, Zhang H, Huang S, Zhang H (2009) Molecular and pathologic variation identified among isolates of *Corynespora cassiicola*. *Molecular Biotechnology* 41: 145 – 151.
- Rayner RW. 1970. A mycological colour chart. Commonwealth Mycological Institute and British Mycological Society, Kew, Surrey.
- Silva WPK, Deverall BJ, Lyon BR (1998) Molecular, physiological and pathological characterization of *Corynespora* leaf spot fungi from rubber plantations in Sri Lanka. *Plant Pathology* 47: 267 – 277.
- Spencer JA, Walters HJ (1969) Variations in certain isolates of *Corynespora cassiicola*. *Phytopathology* 59: 145 – 147.

Wapshere AJ (1974) A strategy for evaluation of the safety of organisms for biological weed control. *Annals of Applied Biology* 77: 201 – 211.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York.

Tabela 1. Lista de espécies de plantas incluídas no teste de especificidade.

FAMILIA BOTÂNICA	ESPECIE DE PLANTA
Anacardiaceae	<i>Myracrodruon urundeuva</i> Fr. All <i>Pistacia vera</i> L. <i>Rhus aromatica</i> Aiton <i>Rhus coppalinum</i> L. <i>Spondias cythera</i> Tussac <i>Spondias mombin</i> L. <i>Spondias purpurea</i> L. <i>Schinus molle</i> L. <i>Schinus terebinthifolia</i> (Flórida) Raddi <i>Schinus terebinthifolia</i> (Hawaii)
Caricaceae	<i>Carica papaya</i> L.
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i> L.
Euphorbiaceae	<i>Hevea brasiliensis</i> (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg. <i>Ricinus communis</i> L.
Fabaceae	<i>Glycine max</i> L. (Merr.)
Meliaceae	<i>Azadirachta indica</i> A. Juss. <i>Cedrela odorata</i> L.
Myrtaceae	<i>Eucalyptus grandis</i> W. Hill ex Maiden
Rutaceae	<i>Citrus</i> <i>Citrus aurantifolia</i> var. <i>Tahiti</i>
Solanaceae	<i>Nicotiana tabacum</i> L. <i>Solanum lycopersicum</i> L. <i>Solanum melongena</i> (Mill.) Dunal

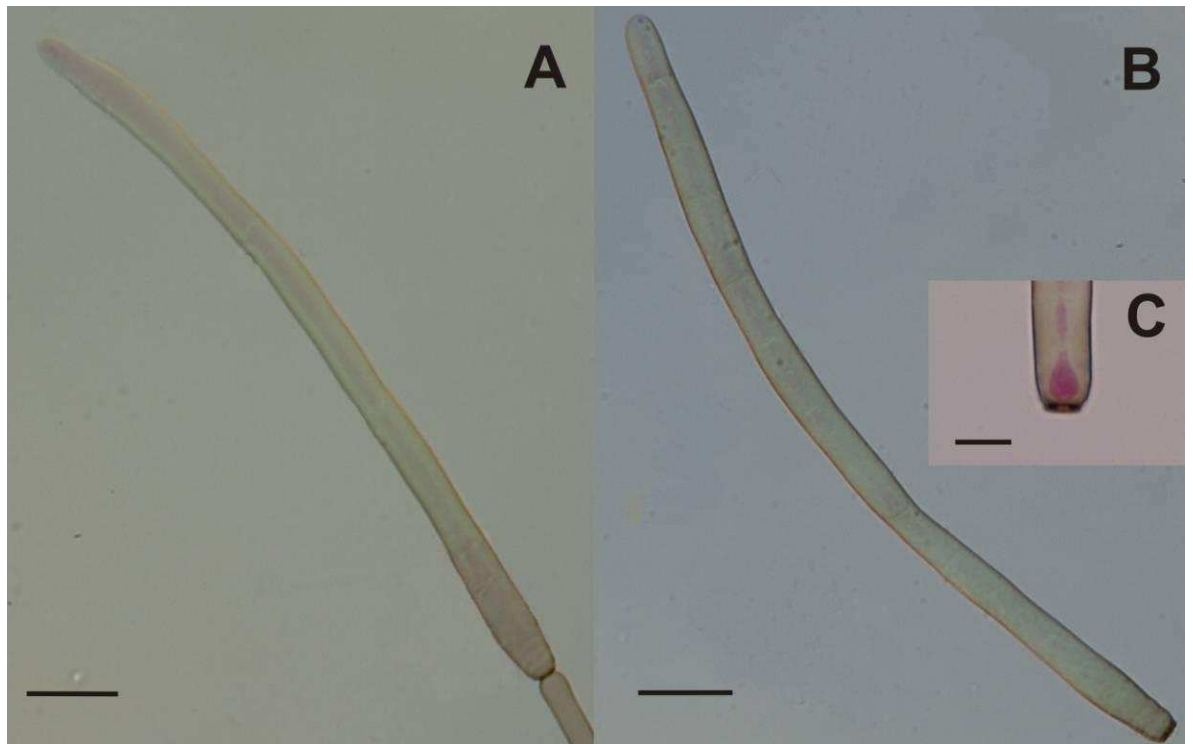


Figura 1. A-B. Conídios de *Corynespora cassicola* (Barra= 20.0 μ m) **C.** Close da base truncada do conídio de *C. cassicola* (Barra = 10.0 μ m).

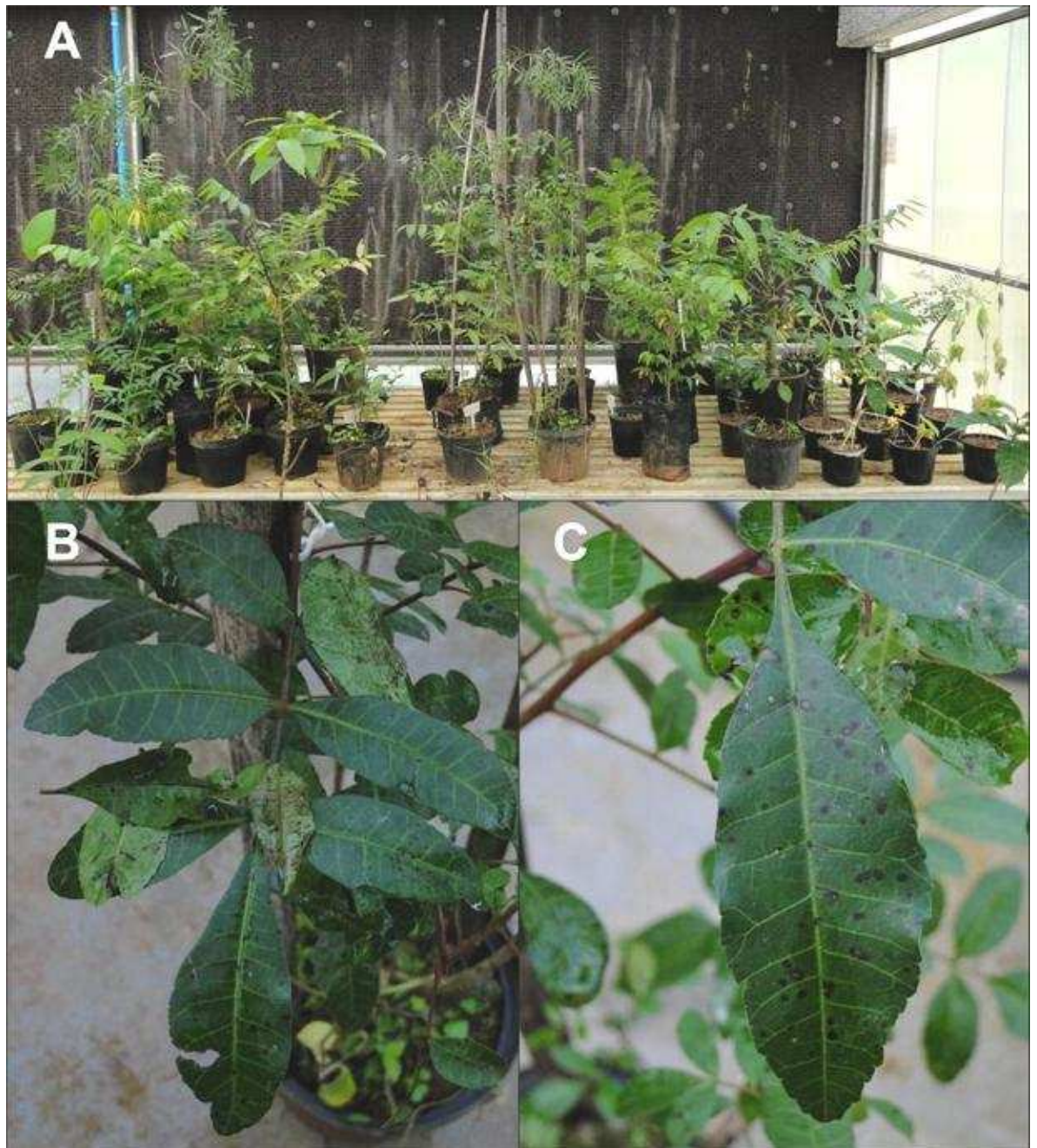


Figura 2. **A-** Teste de especificidade de *Corynespora cassicola* f. sp. *Schinii* em andamento. **B-** Mancha e queima foliar seguida de desfolha de *S. terebinthifolius* (biótipo da Flórida) 2 dias após a aplicação de *Corynespora cassicola* f. sp. *schini*. **C-** Close de folha de *S. terebinthifolius* (biótipo do Havaii) com manchas foliares causadas por *Corynespora cassicola* f. sp. *schini*

CONCLUSÕES GERAIS

- Foi descrito pela primeira vez um patógeno da gramínea invasora exótica *Rottboellia cochinchinensis* (capim-camalote) no Brasil: *Bipolaris chloridis*.
- Demonstrou-se a patogenicidade de *B. chloridis* para duas outras gramíneas, além de *R. cochinchinensis*, inclusive para o milho.
- Foi dada continuidade ao estudo da micobiota fitopatogênica de *Schinus terebinthifolius* (aroeira), uma importante planta invasora de ecossistemas naturais nativa do Brasil e o conhecimento sobre os fungos que atacam a aroeira foram ampliados.
- Coletou-se um espécime de *Corynespora cassiicola* associado a manchas foliares e queima da folhagem de aroeira e comprovou-se que este fungo pertence a uma população específica para esta planta, o que justificou a proposição do novo patotipo *C. cassiicola* f. sp. *terebinthifolii*, um fungo com claro potencial para a utilização no controle biológico de *S. terebinthifolius*.
- O estudo do complexo de Meliolaceae (míldios negros) associado a *S. terebinthifolius* levou aos novos relatos de *M. chilensis* e *M. rhois* var. *africana* sobre este hospedeiro e à descrição da nova espécie *Irenopsis schini-terebinthifolii*.

- O levantamento e estudo da microbiota fitopatogênica de *Tradescantia fluminensis* (trapoeraba), importante espécie invasora de ecossistemas naturais na Nova Zelândia e outras regiões do mundo e nativa do Brasil, levou à descoberta de oito taxa fúngicas sendo que três foram descritos como espécies novas para a ciência (*Ceratobasidium sparsum*, *Kordyana brasiliensis* e *Mycosphaerella tradescantiae*) e cinco representam novas associações com este hospedeiro: *Cercospora apii*, *Colletotrichum falcatum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* e *Uromyces commelinae*.
- Foi descoberta uma espécie nova de *Septoria* (a ser denominada *Septoria paranaensis*), em associação com uma espécie de *Tradescantia*.
- A espécie nova *Kordyana brasiliensis*, foi caracterizada com base em análises morfológicas e moleculares e avaliada quanto a sua especificidade em teste de especificidade envolvendo 69 espécies de plantas dentro de 21 famílias botânicas; demonstrou-se sua alta especificidade e, preliminarmente, sua capacidade de produzir impactos significativos sobre a planta infectada, e assim a viabilidade e elevado potencial desta espécie para utilização como agente de controle biológico clássico para esta planta no exterior.
- O trabalho poderá, caso traduzido em novas introduções, contribuir para o avanço da utilização de fungos fitopatogênicos para o controle biológico clássico de plantas daninhas no mundo.