

CLAUDINE DINALI SANTOS SEIXAS

**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Miconia calvenscens* DC.
(MELASTOMATACEAE) COM FITOPATÓGENOS**

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
2002**

Ao meu marido Marcos

e aos meus filhos Mateus e Carolina,

DEDICO.

A Deus, presente em todas as horas.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), especialmente ao Departamento de Fitopatologia pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida durante o curso.

Ao “Research Corporation of the University of Hawaii”, pelo apoio financeiro dado ao projeto.

Ao Professor Robert Weingart Barreto pela orientação, amizade, confiança, e pelo incentivo constante.

Ao Dr. Clifford Smith, Dr. Don Gardner, Dr. Tracy Johnson e à Dra. Eloise Killgore.

Aos Professores Luiz Antonio Maffia, Leandro Grassi de Freitas e Acelino Couto Alfenas pela atenção, disponibilidade, críticas e sugestões.

Aos Professores Laércio Zambolim e Onkar dev Dhingra pelas sugestões.

Aos funcionários do DFP, em especial a José Orlando e Renildo.

À Dra. Regina Carneiro e ao Dr. Renato Goldemberg.

À Companhia Agrícola Florestal Santa Bárbara Ltda. (CAF).

Aos colegas de curso.

Aos amigos.

AGRADEÇO.

BIOGRAFIA

CLAUDINE DINALI SANTOS SEIXAS, filha de Crisóstomo José dos Santos e Darci Dinali dos Santos, nasceu em Lavras-MG, em 17 de julho de 1966.

Em 1988, graduou-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal de Lavras, MG.

Em 1992, concluiu o curso de Mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa-MG.

Em 1998, iniciou o curso de doutorado em Fitopatologia na mesma instituição, defendendo tese em 7 de junho de 2002.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	v
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	7
ARTIGO 1	9
Mycobiota of <i>Miconia calvescens</i> and related species from the Neotropics, with particular reference to potential biocontrol agents	
Abstract	9
Introduction	9
Materials and Methods	11
Results and Discussion	12
References	35
ARTIGO 2	38
<i>Coccidiella miconiae</i> : um agente de biocontrole em potencial contra <i>Miconia calvescens</i> DC (Melastomataceae)	
Resumo	38
Introdução	38
Material e Métodos	41
Resultados	48
Discussão	56
Referências	63
ARTIGO 3	65
Micoparasitas de <i>Coccidiella miconiae</i> em <i>Miconia calvescens</i> DC (Melastomataceae)	
Resumo	65
Introdução	65
Material e Métodos	67
Resultados e Discussão	68
Discussão Geral	83
Referências	84
ARTIGO 4	87
<i>Ditylenchus drepanocercus</i> Goodey, 1953, causador da mancha angular em folhas de <i>Miconia calvescens</i> DC. (Melastomataceae), como potencial agente de biocontrole clássico	
Resumo	87
Introdução	88
Material e Métodos	89
Resultados	99
Discussão	107
Literatura Citada	114
ARTIGO 5	118
First report of a phytoplasma-associated witches' broom disease of <i>Miconia calvescens</i> in Brazil	
References	120
CONCLUSÕES GERAIS	121

RESUMO

SEIXAS, Claudine Dinali Santos, D.S., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2002. **Controle biológico de *Miconia calvenscens* DC (Melastomataceae) com fitopatógenos.** Orientador: Robert Weingart Barreto. Conselheiros: Luiz Antonio Maffia e Acelino Couto Alfenas.

Miconia calvenscens é uma planta da família Melastomataceae nativa das Américas do Sul e Central que se tornou uma invasora agressiva no Taiti e Havaí. Objetivou-se determinar a patobiota associada a *Miconia calvenscens* e gerar informações úteis para a avaliação, seleção e manipulação de potenciais agentes de controle biológico desta planta invasora. No levantamento realizado nos Estados de Minas Gerais, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo, no Brasil, e em algumas regiões da Costa Rica e do Equador, foram encontradas 11 espécies fúngicas, sendo que duas ainda não descritas: *Guignardia miconiae* (causando mancha de piche) e *Korunomyces prostratum* (causando queima foliar). Além destas foram identificados: *Coccodiella miconiae* (agente da acne negra), *Glomerella cingulata*, *Corticium* sp., *Melanconium* sp., *Myrothecium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Phomopsis* sp., *Phyllachora* sp., *Pseudocercospora tamonae* e *Pythium* sp. Um nematóide (*Ditylenchus drepanocercus* – causador da mancha angular) e um fitoplasma (causador de envassouramento) foram também encontrados e estudados. Entre os fungos com maior potencial para biocontrole, destaca-se *Coccodiella miconiae*, que foi estudado para elucidação de aspectos relacionados com a sua biologia e determinação da influência de fatores meteorológicos sobre a intensidade da doença no campo. Testaram-se diferentes métodos de inoculação artificial; estudaram-se a ejeção e a germinação de ascósporos sob diferentes temperaturas; métodos de preservação de folhas infectadas e controle químico do micoparasita *Sagenomella* sp. Em Dionísio-MG e em Viçosa-MG, ramos e folhas de *M. calvenscens* foram marcados para avaliar a incidência e severidade da doença sob influência dos fatores meteorológicos. Também foram registradas as incidências do anamorfo (*Hemidothis* sp.) e de micoparasitas sobre estromas de *C. miconiae*. Dentre os métodos de inoculação testados nenhum resultou em sintomas de acne negra em plantas

de *M. calvescens*. A liberação de ascósporos ocorreu entre 5 a 35°C, mas foi maior a 25 a 35°C, e a germinação foi favorecida por temperaturas de 20 a 22°C, luz e água livre. A germinação de ascósporos aumentou quando os estromas foram pré-acondicionados a 5°C por 2 dias. Material infectado mantido a 10°C por no máximo 6 dias ainda se manteve viável e com bom nível de germinação de ascósporos. A doença ocorreu o ano todo nas duas localidades avaliadas. Em Viçosa-MG, a incidência não se correlacionou com nenhuma das variáveis climáticas estimadas (temperatura, umidade relativa e precipitação) e a severidade se correlacionou negativamente com a temperatura. Em Dionísio-MG, a incidência correlacionou-se negativamente com a temperatura. Tanto o anamorfo quanto os hiperparasitas ocorreram durante todo o período avaliado, mas a incidência de ambos não se correlacionou com nenhuma das variáveis climáticas. O cloro foi o produto mais eficiente para o controle do hiperparasita *Sagenomella* sp., mas foi deletério a *Coccodiella miconiae* também. Além de *Sagenomella alba* var. nov. *synematosa* foram observados, no campo, os seguintes micoparasitas: *Sagenomella dimorphica* sp. nov.; *Cladosporium oxysporum*; *Corynespora cassiicola*; *Redbia annulata* sp. nov. e *Paranectriella juruana*. A mancha angular causada por um nematóide foi observada no Brasil, Costa Rica e Equador. O nematóide foi identificado como *Ditylenchus drepanocercus*. Indivíduos de ambos os sexos possuem um apêndice na extremidade da cauda em forma de foice. Os nematóides ficam alojados no parênquima lacunoso, cujas células aumentam de 7 a 13 vezes de tamanho. Dentre três métodos artificiais, atomização de suspensão contendo indivíduos de diferentes estádios de desenvolvimento sobre folhas feridas previamente destacou-se como o método mais eficiente para inoculação do nematóide. Plantas de *M. calvescens* apresentaram sintomas da mancha angular 20 dias após a inoculação. A doença ocorreu durante os 12 meses de avaliação em Viçosa-MG e Dionísio-MG. Em Viçosa, a incidência não se correlacionou com nenhuma das variáveis meteorológicas. Em Dionísio, a incidência correlacionou-se positivamente com a umidade relativa e com a temperatura. No teste de gama de hospedeiros, 107 espécies de plantas foram testadas. Além de *M. calvescens*, o nematóide foi detectado em *M. prasina* e *M. phanerostila*. A presença de um fitoplasma associado às plantas apresentando sintomas de envassouramento foi confirmada por exame

de diversas amostras em microscopia eletrônica de transmissão. Tanto *Cocodiella miconiae*, quanto *Ditylenchus drepanocercus*, mostraram bom potencial como agentes de biocontrole, mas alguns obstáculos, tais como, verificação da existência de especialização fisiológica nos dois patossistemas; método de preservação de inóculo e estudos mais completos sobre a especificidade do nematóide; método de inoculação e condições de incubação mais adequados para *C. miconiae*, ainda têm que ser superados antes de uma eventual introdução em ambiente exótico .

ABSTRACT

SEIXAS, Claudine Dinali Santos, D.S., Universidade Federal de Viçosa, June, 2002. **Biological control of *Miconia calvenscens* DC. (Melastomataceae) with plant pathogens.** Advisor: Robert Weingart Barreto. Committee members: Luiz Antonio Maffia and Acelino Couto Alfenas.

Miconia calvenscens of Melastomataceae family is native of Central and South America and has become an aggressive invader in Haiti and Hawaii. This work was done to find pathogenic biota associated with this plant and generate information that will be useful for evaluation, selection and manipulation of potential biocontrol agents of this plant. In the surveys done in the states of Minas Gerais, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro and some regions of Costa Rica and Ecuador, 11 fungal species were found. These included two undescribed species, *Guignardia miconiae* (causing tar spot) and *Korunomyces prostratum* (causing foliar blight). Other described species were: *Coccodiella miconiae* (black blister), *Glomerella cingulata*, *Corticium* sp., *Melanconium* sp., *Myrothecium* sp., *Pestalotiospsis* sp., *Phomopsis* sp., *Pseudocercospora tamonae* and *Pythium* sp. One nematode (*Ditylenchus drepanocercus* - causing angular leaf spot) and a phytoplasma (causing witch's broom) were also found and studied. Among the fungi *C. miconiae* showed maximum biocontrol potential, therefore was studied for elucidation of aspects related to its biology and meteorological factors affecting disease intensity in field. Methods of inoculation, ascospore ejection and germination under different temperatures, methods for preservation of infected leaves and chemical control of mycoparasite *Sagenomella* sp. were elaborated. In Dionisio- MG and Viçosa- MG, branches and leaves of *M. calvenscens* were marked to evaluate incidence and severity of the disease under the influence of climatic factors. Incidence of anamorph (*Hemidothis* sp.) and of the mycoparasites on the stroma also was recorded. None of the inoculation method tested produced black blister symptom in *M. calvenscens* plants. The ascospore liberation occurred between the 5 and 35 °C but was higher at 25 to 35 °C, and their germination was favored by light and free water at 20 to 22 °C. The ascospores germination increased if stroma was stored at 5 °C for 2 days. Infected material stored at 10 °C for a maximum of 6-day period remained viable with good proportion of

ascospore germination. The disease occurred throughout the year in the both the localities. Disease incidence in Viçosa- MG it did not correlate to any evaluated climatic variable (temperature, relative humidity and precipitation) but the severity negatively correlated to temperature, however in Dionisio-MG the disease incidence negatively correlated to temperature. The anamorph and the hyperparasites occurred during the entire evaluation period, without any correlation to climatic variables. Chlorine was most effective in controlling the *Sagenomella* sp., but also was detrimental to *C. miconiae*. Besides *Sagenomella alba* var. nov. *synematosa*, following mycoparasites were observed in field: *S. dimorphica* sp. nov.; *Cladosporium oxysporum*; *Corynospora cassiicola*; *Redbia annulata* sp. nov. and *Paranectriella juruana*. The angular leaf spot caused by the nematode *D. drepanocercus* was observed in Brazil, Costa Rica and Ecuador. The individuals of both the sexes this species have a sickle shaped appendix on the tail end. The nematode lodged in the lacunose parenchyma whose cell size increased by 7 to 13 times. Among the three methods of inoculation tested, spraying pre-wounded leaves with a suspension containing individuals of different developmental stages was most efficient. The angular leaf spot symptoms appeared 20 days after inoculation. The disease in field occurred during the entire 12-month evaluation period in Viçosa-MG and Dionisio-MG. In Viçosa, the disease incidence did not correlate to any climatic variable but in Dionisio it correlated positively to relative humidity and temperature. One hundred and seven plant species were tested to determine host range, and the nematode was detected in *M. prasina* and *M. phanerostila*. Presence of a phytoplasma in plants with witch's broom symptoms was confirmed in many samples examined by transmission electronic microscope. *Cocodiella miconiae* and *D. drepanocercus* appear to have good potential as biocontrol agents of *M. calvescens*, but aspects such as, physiological specialization in both the pathosystems; inoculum preservation, specificity of the nematode; appropriate inoculation method and incubation conditions for *C. miconiae*, need to be elucidated before eventual introduction into an exotic ecosystem.

INTRODUÇÃO GERAL

Uma planta invasora responsável por invasão biológica, é uma planta exótica que se distribui naturalmente (sem a ajuda direta de pessoas) em um habitat natural ou seminatural, produzindo mudanças significativas em termos de composição, estrutura ou processos do ecossistema. Com esta definição são excluídas as plantas invasoras de áreas altamente perturbadas pelo homem, invasoras de áreas agrícolas (CRONK e FULLER, 1997). Estas plantas modificam o habitat diminuindo a diversidade da flora e da fauna, removendo fontes de alimento ou introduzindo fontes de alimento antes inexistentes, alterando a condição nutricional do solo e os processos de sedimentação, dentre outros. Essas alterações podem ter efeitos profundos na composição da flora e fauna da região e na paisagem como um todo (VITOUSEK, 1994; CRONK e FULLER, 1997; BARUCH et al., 2000).

É difícil avaliar informações sobre a distribuição geográfica do problema com plantas invasoras, mas em algumas áreas, como Havaí, África do Sul e Austrália existe um reconhecimento da importância das plantas. Entretanto, em grandes regiões, como as Américas do Sul e Central, Ásia e Índia existem poucos ou nenhum relato da distribuição de plantas invasoras. Isto pode ser atribuído à falta de recursos, falta de percepção local ou falta de casos reais (CRONK e FULLER, 1997).

Ilhas oceânicas possuem ecossistemas freqüentemente relatados como mais vulneráveis e suscetíveis às invasões biológicas, do que ecossistemas continentais. Várias são as prováveis razões para isso: (1) baixo número de espécies, que é atribuído a distância das fontes continentais de animais e plantas; (2) a evolução em isolamento; a fauna e flora nativas de ilhas remotas que evoluem de forma isolada freqüentemente sem adaptação a altos níveis de competição; (3) colonização pioneira; (4) a pequena extensão e a relativa uniformidade do ponto de vista físico não impedem as explorações, os distúrbios e as introduções. Além disso, as curtas distâncias possibilitam que uma introdução possa se dispersar mais facilmente para um habitat melhor; (5) rota de comércio intercontinental (ilhas oceânicas eram freqüentemente usadas para transferir material vegetal de propagação entre continentes); (6) espécies exóticas vinham para as ilhas sem qualquer controle e livres de seus

inimigos naturais tendo assim uma vantagem sobre a vegetação nativa (CRONK e FULLER, 1997).

Entre as alternativas de controle de plantas invasoras tem-se o controle físico (mecânico e manual), o químico e o biológico. Entretanto, uma planta é usualmente declarada invasora quando já está amplamente disseminada ou quando forma densos estandes. Nestes casos, o controle físico costuma já não ser viável e eficiente. Em relação ao controle químico, fatores como o alto custo no desenvolvimento de novos herbicidas e sua inaplicabilidade em certos ecossistemas, bem como a conscientização pública sobre seus efeitos nocivos ao homem e ao meio ambiente (PRASAD, 1993; FIGUEIREDO, 1995) têm aumentado a rejeição ao seu uso e levado a investigações de outras alternativas de controle, principalmente o biológico, que tem se mostrado o método mais promissor (MEYER e MALET, 1997). O controle biológico de plantas invasoras utiliza organismos vivos para redução ou controle da população de espécies indesejáveis (WATSON, 1991). Trata-se de método que não polui o ambiente e os agentes são escolhidos por sua inabilidade de sobreviver e reproduzir em outra planta que não a planta-alvo sendo o seu uso, portanto seguro (HARLEY e FORNO, 1992).

Plantas invasoras de regiões geográficas normalmente são introduzidas livres de seus inimigos naturais (HARLEY e FORNO, 1992). O controle biológico clássico envolve a introdução de um ou mais inimigos naturais que atacam a planta-alvo em seu habitat natural (WATSON, 1991). De forma semelhante aos outros métodos de controle, o controle biológico não erradica a planta invasora. Após o agente de controle biológico ter se estabelecido, um equilíbrio dinâmico é alcançado com os efeitos desta interação (SCHROEDER, 1983; JULIEN, 1997).

Programas de controle biológico inicialmente, foram conduzidos por entomologistas e consistiram na introdução de insetos exóticos no intuito de controlar plantas invasoras naturalizadas (HASAN e AYRES, 1990). O primeiro programa de controle biológico clássico, envolvendo a importação de agentes do país de origem da planta invasora, foi contra *Lantana camara* L. no Havaí, em 1902 por Perkins e Koebele (HARLEY, 1971). Estes pesquisadores coletaram 23 espécies diferentes de insetos associados à planta no México, que foram introduzidos no Havaí, sendo que oito delas se estabeleceram e

controlaram adequadamente *L. camara* em muitas áreas (NESER e CILLIERS, 1990).

Na Austrália, por volta de 1912, espécies de *Opuntia* eram sério problema. Entre 1913 e 1914, cinco tipos de insetos foram liberados, mas uma das espécies de *Opuntia* continuou se espalhando. Em 1920, novas pesquisas foram feitas no México e sudeste dos Estados Unidos, de onde a planta era originária, e na Argentina, de onde se tinha relatos de sua ocorrência. Quarenta e oito espécies de insetos foram então importadas e testadas. Destas, 12 foram liberadas e se estabeleceram. A mais importante foi *Cactoblastis cactorum* Bergroth, uma mariposa, introduzida da Argentina em 1925. Em torno de 24 milhões de hectares de terras valiosas haviam sido infestadas pela planta. Por volta de 1933, a última grande área infestada pelo cacto foi recuperada. Desde então, a planta continua sendo controlada pela mariposa. Este inseto foi introduzido em outros países também promovendo o controle esperado (McFADYEN e WILLSON, 1997).

WILSON (1969) chama a atenção para o potencial de fitopatógenos em causar impacto na capacidade competitiva e na sobrevivência de plantas invasoras. A primeira introdução de um patógeno foi feita da Itália para a Austrália. O agente, um fungo, *Puccinia chondrillinae* Bubak & Syd, causador de ferrugem em *Chondrilla juncea* L.. O fungo foi muito bem sucedido no controle da forma mais comum de *Chondrilla*, permanecendo ainda outras duas formas desta planta ainda não infectadas. A procura por novas estirpes da ferrugem permanece em andamento no sul e leste da Europa, centro de origem da planta (WATSON, 1991; McFADYEN e WILLSON, 1997).

O Brasil é parte do centro de origem de muitas plantas invasoras (HOLM et al., 1977), hoje estabelecidas em várias partes do mundo. Dentre elas, estão algumas das responsáveis pelas piores invasões de ecossistemas no planeta como: *Lantana camara* L.; *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb; *Eichhornia crassipes* (Martius) Solms; *Salvinia molesta* D.S. Mitchell; *Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson; *Psidium cattleianum* Sabine; e outras (BARRETO e EVANS, 1994; BARRETO et al., 1995). Por isso, muitos programas de controle biológico clássico têm envolvido levantamentos intensivos no Brasil em busca de inimigos naturais destas plantas. Por outro lado, o Brasil também enfrenta graves problemas com plantas introduzidas.

Apesar disso, nenhum programa de controle biológico clássico foi desenvolvido no Brasil visando a introdução de inimigos naturais destas plantas até o momento.

A família Melastomataceae compreende cerca de 4000 espécies de plantas tropicais. Este grupo de plantas é considerado em geral como de pouca relevância econômica, embora algumas espécies sejam usadas como ornamentais. Há, no entanto, algumas que após terem sido introduzidas em alguns novos habitats, particularmente ilhas oceânicas, livres de seus inimigos naturais, tornaram-se invasoras agressivas (MEYER, 1998). *Miconia calvescens* DC. (Figura 1) é uma dessas plantas. É nativa do sul do México ao sul do Brasil e norte da Argentina, sendo que no sul do México, norte da Guatemala, Belize, Costa Rica e Equador ocorre um biotipo com folhas grandes de até 1m de comprimento, com a face adaxial verde escuro e a abaxial violeta (MEYER, 1996). Este biotipo é o responsável pelas invasões biológicas em arquipélagos do Pacífico.



Figura 1- *Miconia calvescens*, biotipo do Haváí.

Em áreas onde esta espécie é nativa, os indivíduos alcançam 3 a 4m. Já nas áreas onde foi introduzida, pode chegar a 15m de altura. Uma árvore de 10m com 100 inflorescências, 300 frutos/inflorescência e 100 sementes/fruto, produz três milhões de sementes, talvez duas a três vezes por ano formando

um extraordinário banco de sementes, tendo ainda grande potencial para dispersão por pássaros (LOOPE, 1997).

Em áreas onde esta espécie é nativa, os indivíduos alcançam 3 a 4m. Já nas áreas onde foi introduzida, pode chegar a 15m de altura. Uma árvore de 10m com 100 inflorescências, 300 frutos/inflorescência e 100 sementes/fruto, produz três milhões de sementes, talvez duas a três vezes por ano formando um extraordinário banco de sementes, tendo ainda grande potencial para dispersão por pássaros (LOOPE, 1997).

No Taiti, *M. calvescens* foi introduzida em 1937 e ocorre hoje em 65% dos 1045 Km² de ilha, sendo que em 25% ocorre de forma densa. O ecossistema torna-se completamente transformado com o domínio por essa planta, devido ao sombreamento provocado que nenhuma espécie de planta nativa tolera, somente a própria *Miconia*. No Taiti, 70 a 100 espécies de plantas nativas, incluindo 35 a 45 espécies endêmicas da Polinésia Francesa estão diretamente ameaçadas de extinção pela invasão de *M. calvescens* (MEYER, 1996). No Havaí, está na lista de plantas invasoras nocivas desde 1992. Lá, em termos de controle, os esforços têm sido concentrados na tentativa de erradicar a planta. Entre 1991-93, 20 mil plantas foram cortadas por voluntários, mas a longevidade do banco de sementes é um empecilho a esta estratégia. Plantas com até 3m de altura podem ser removidas manualmente, como não há raízes adventícias, o método costuma ser bem sucedido. Quando não é possível essa remoção, as plantas são cortadas bem próximo ao solo e tratadas com herbicida, mas com a remoção da cobertura promovida pela copa das plantas, há uma espetacular germinação do banco de sementes. Uma tentativa foi feita no início de 1994 para áreas de difícil acesso com pulverização aérea de herbicida. Na avaliação inicial, os pesquisadores verificaram que 70% das árvores foram mortas, outras sofreram desfolha, abortamento de flores e frutos verdes, mas se recuperaram e frutificaram na estação seguinte (LOOPE, 1997). Em Queensland, na Austrália, seu cultivo e comercialização estão proibidos desde 1997 (CSURHES, 1997).

WATSON (1991) aponta que o levantamento dos agentes potenciais ao biocontrole nos centros de origem é um dos primeiros procedimentos para um programa bem sucedido de controle biológico de plantas invasoras através do método clássico.

Há alguns anos o Professor Clifford Smith, na ocasião, Chefe do Cooperative National Parks Resources Studies Unit of the University of Hawaii, fez uma visita ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa e demonstrou interesse em um levantamento preliminar de fungos fitopatogênicos associados a melastomatóceas daninhas nativas do Brasil. Algumas observações iniciais feitas no campo indicaram a existência de fungos com potencial para o controle biológico de *M. calvescens* e outras melastomatóceas. Assim, um convênio foi então proposto envolvendo a Cooperative National Parks Resources Studies Unit através da RCUH (Research Corporation of the University of Hawaii) e a FUNARBE (Fundação Arthur Bernardes), visando a realização de um levantamento de patógenos associados a melastomatóceas daninhas no estado de Minas Gerais e estados vizinhos. A ênfase foi em patógenos de *M. calvescens*.

O objetivo deste trabalho é contribuir para o conhecimento da patobiota associada a *Miconia calvescens* e gerar informações úteis para a avaliação, seleção e manipulação de potenciais agentes de controle biológico desta planta.

A tese está apresentada na forma de artigos já formatados de acordo com o periódico ao qual pretende-se submetê-los:

- Artigo 1 – Mycobiota of *Miconia calvescens* and related species from the Neotropics with a complete description of *Coccodiella miconiae*.
- Artigo 2 – *Coccodiella miconiae*: um agente de biocontrole em potencial contra *Miconia calvescens* (Melastomataceae)
- Artigo 3 – Micoparasitas de *Coccodiella miconiae*.
- Artigo 4 – *Ditylenchus drepanocercus* Goodey, 1953, causador de mancha angular em folhas de *Miconia calvescens* (Melastomataceae), como potencial agente de biocontrole clássico.
- Artigo 5 – First report of a phytoplasma-associated witches' broom disease of *Miconia calvescens* in Brazil. (Publicado em: New Disease Report, v.5, january-july, 2002; [http:// www.bspp.org.uk/ndr](http://www.bspp.org.uk/ndr))

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARRETO, R.W.; EVANS, H.C. The mycobiota of the weed *Chromolaena odorata* in southern Brazil with particular reference to fungal pathogens for biological control. **Mycological Research**, v.98, p.1107-1116, 1994.
- BARRETO, R.W., EVANS, H.C.; ELLISON, C.A. The mycobiota of the weed *Lantana camara* in Brazil, with particular reference to biological control. **Mycological Research**, v.99, p.769-782, 1995.
- BARUCH, Z.; PATTINSON, R.R.; GOLDSTEIN, G. Responses to light and water availability of four invasive Melastomataceae in the Hawaiian islands. **Int. J. Plant Sci.**, v.161, n.1, p.107-118, 2000.
- CRONK, Q.C.B.; FULLER, J.L. **Plant invaders. The threat to natural ecosystem**. London: Chapman & Hall, 1996, 239p.
- CSURHES, S.M. *Miconia calvescens* DC. (Melastomataceae) a potentiality invasive plant in Australia's tropical and sub-tropical rainforests. **Proceedings First Regional Conference on Miconia Control**, Papeete, Taiti, august, 1997.
- FIGUEIREDO, G. Herbicidas microbiológicos empregados no controle de plantas daninhas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.3, p.111-32, 1995.
- HARLEY, K.L.S. Biological control of *Lantana*. **PANS**, v.17, n.4, p.433-437, 1971.
- HARLEY, K.L.S.; FORNO, I.W. **Biological control of weeds, a handbook for practioners and students**. Melbourne: Inkata Press, 1992, 74p.
- HASAN, S.; AYRES, P.G. The control of weeds through fungi: principles and prospects. **New Phytol.**, v.115, p.201-222, 1990.
- HOLM, L.G.; PLUCKNETT, D.L.; PANCHO, J.V.; HERBERGER, J.P. **The world's worst weeds. Distribution and biology**. Honolulu, Hawaii: University Press of Hawaii, 1977.
- JULIEN, M.H. Success, and failure, in biological control of weeds. In: JULIEN., M.; WHITE, G. **Biological control of weeds: theory and practical application**. ACIAR Monograph n^o9, 1997, p.9-15.
- LOOPE, L.L. *Miconia calvescens* DC. **HNIS Report for Miconia calvescens**. A product of the Hawaiian Ecosystems at Risk Project, 1997, 8p.

- McFADYEN, R.; WILLSON, B. A history of biological control of weeds. In: JULIEN., M.; WHITE, G. **Biological control of weeds: theory and practical application**. ACIAR Monograph n°9, 1997, p.17-22.
- MEYER, J.Y. STATUS OF *Miconia calvescens* (Melastomataceae), a dominant invasive tree in the Society Islands (French Polynesia). **Pacific Science**, v.50, n.1, p.66-76, 1996.
- MEYER, J.Y.; MALET, J.P. **Study and management of the alien invasive tree *Miconia calvescens* DC. (Melastomataceae) in the islands of Raiatea and Tahaa (Society Islands, French Polynesia): 1992-1996**. Manoa, Hawaii: Cooperative National Park Resources Studies Unit University of Hawai'i at Manoa, 1997, 56p. (Technical Report 111).
- MEYER, K. Welcome to the Melastomataceae homepage. In: <http://www.uni-mainz.de/FB/Biologie/Botanikspeziell/Melastomataceae/index.html>; 1998, 2p.
- NESER, S.; CILLIERS, C.J. Work towards biological control of *Lantana camara*: perspectives. In: INTERNATIONAL SYPOSIUM ON BIOLOGICAL CONTROL OF WEEDS, 7, 1988, Roma. **Proceedings...** Italy: Federconsorzi Conference Hall, 1990. P.363-369.
- PRASAD, R. Development of bioherbicides for integrated weed management in forestry. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM INDIAN SOCIETY OF WEED SCIENCE, 1, 1993, Hisar. **Proceedings...**Hisar: 1993. p.269-274.
- SCHROEDER, D. Biological control of weeds. In: FLETCHER, W.W. (ed.). **Recent advances in weed research**, CAB Publication, 1983, p.42-78.
- VITOUSEK, P.M. Beyond global warming: ecology and global change. **Ecology**, v. 75, n.7, p.1861-1876, 1994.
- WATSON, A.K. The classical approach with plant pathogens. In: TEBEEST, D.O. **Microbial control of weeds**. New York: Chapman & Hall, 1991, p.3-23.
- WILSON, C.L. Use of plant pathogens in weed control. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v.7, p.411- 434, 1969.

Mycobiota of *Miconia calvescens* and related species from the Neotropics, with particular reference to potential biocontrol agents

Robert W. BARRETO¹, Claudine D.S. SEIXAS¹, Eloise KILLGORE² & Don GARDNER³

¹ Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, MG, 36571-000, Brazil.

² Hawaii Department of Agriculture, Division of Plant Industry, Biological Control Section, Honolulu, Hawaii 96814, U.S.A.

³ Biological Resources Division, U.S. Geological Survey, Department of Botany, University of Hawaii at Manoa, Honolulu, Hawaii 96822, U.S.A.

Running title: Fungal pathogens of *Miconia calvescens* from Brazil

Miconia calvescens is a devastating plant invader in Tahiti and Hawaii. A survey of fungal pathogens associated to this weed was carried out in part of its native range in Brazil and other Latin American countries aimed at finding potential biocontrol agents. *Coccodiella miconiae*, *Pseudocercospora tamona*, *Glomerella cingulata* (= *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *miconiae*) the new species *Guignardia miconiae* and *Korunomyces prostrata* were found associated to foliar diseases of this host and are described herein. Two previously undescribed spore stages of *Coccodiella miconiae* were also obtained allowing a complete description of the life-cycle of this species.

Key words: Biological control, Melastomataceae, Hawaii, Tahiti, *Phomopsis miconiae*

INTRODUCTION

Miconia calvescens DC. belongs to the largest genus of the Melastomataceae, containing around 1000 species. It is a neotropical genus but specially concentrated on the Andes (Renner 1993, Judd & Skean 1991). Few

species in this genus are of practical importance but *Miconia calvescens* became an exception. Once a botanical curiosity, miconia is now the most devastating plant invader in Tahiti (Meyer 1996) and Hawaii (Gagné *et al.* 1996). Although widely distributed and sometimes relatively common locally, particularly in disturbed forest habitats, it never forms dense populations in its native range. In some regions in South and Central America, particularly on the oriental side of the mountain ranges dividing the continents and extending from southern Mexico to Ecuador, there is a form of *M. calvescens* that has very large leaves (up to one meter long) which are green adaxially and purple abaxially (PU biotype) (Meyer 1996, Meyer 1998). Because of its attractive foliage it was introduced as an ornamental in many regions of the world. In some regions this proved disastrous (Gagné *et al.* 1992, Meyer & Florence 1996, Meyer 1996, Meyer 1998, Baruch *et al.* 2000). In Tahiti it was introduced in 1937 where it became naturalized and slowly invaded the native forests. It now covers two thirds of the island and forms monotypic stands in some areas (Meyer & Florence 1996). It is already present in Moorea, Raiatea and Thaa (Meyer & Florence 1996, Meyer & Malet 1997). Miconia invasion is regarded as an example of the dramatic effect of an invasive weed in oceanic island biodiversity (Meyer 1996). It is estimated that 70-100 native species, including 40 to 50 endemics are directly threatened by *M. calvescens* in the French Polynesia (Meyer & Florence 1996). In Queensland, *M. calvescens* was declared a noxious weed in May 1997, but its cultivation and commercialization are still allowed in other Australian states, a dangerous situation as the plant has all the attributes for becoming a serious weed in that country (Csurhes 1997, Csurhes & Edwards 1998). In Hawaii, *M. calvescens* was introduced in the 60s and since 1992 it was included in the list of noxious invasive weeds (Loope 1997, Meyer 1998). Fortunately, until now, the invasions in Hawaii have not become as severe as those of Tahiti (Gagné *et al.* 1992). The plant is nevertheless present in four of the main Hawaiian islands: Hawai'i, O'ahu, Maui and Kaua'i (Meyer 1998).

A search for fungal pathogens to be used as biocontrol agents of *Miconia calvescens* began in June 1995 in Brazil and was extended later to Costa Rica, Dominican Republic and Ecuador. A description of the fungi collected on this

host and observations regarding their biocontrol potential, based on field observations are given below.

MATERIALS AND METHODS

A survey of some Brazilian herbaria was made to locate sites of occurrence of *M. calvescens* in Brazil to establish an itinerary for the survey trips. Localities in the states of Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia, Rio de Janeiro and São Paulo were selected and surveyed. Ad hoc collections were made in the states of Amazonas and Mato Grosso. Additional collecting trips were made to Dominican Republic and Costa Rica (December 1998 – Jan 1999) and Ecuador (May 2000).

Dried specimens of diseased plants were prepared using a plant press and isolates were obtained by direct or indirect isolation in V8 juice agar plates, transferred to PCA agar slants and maintained at 5° C. The cultures were shipped to HDOA's Plant Pathology Quarantine Facility in Honolulu, Hawaii, under United States Department of Agriculture permit no. 954140 for further testing. Samples of selected biotrophic fungi were preserved on bare-root living miconia plants that were either dispatched (from Brazil and Ecuador) or hand-carried to Hawaii (from Costa Rica).

Identifications were made using standard keys for the genera and species. Only those which appeared to have biological control potential were considered further.

Several aspects of the biology and pathology of *Coccodiella* sp. were made and are being published separately. Here only an account of the taxonomy of this fungus is being provided.

Studies on the life-cycle and pathology of a fungus which was preliminarily identified as *Korunomyces* sp. were included. Initially it was thought that *Korunomyces* might be a species of *Ceratobasidium*, a genus containing fungi that cause a similar kind of foliar blight disease. Nuclei staining and teleomorph observation are normally needed in order to elucidate the identity of fungi in this group. Nuclei staining (HCl-Giemsa according to Herr 1979) were then performed and an attempt of inducing teleomorph formation with an adaptation of the method of Silveira (1966). A mycelial suspension produced on

a semi-sintetic medium (Alfenas *et al.* 1991) was brushed on leaves of freshly cut healthy branches of *M. calvescens*. These had the basal part placed into Erlenmeyers containing tap water. The inoculated branches were then left in a dew chamber at 26°C, with a 12-hour light regime for 20 days (nine daylight lamps, 40W, suspended 1,0m above plants). The plant parts were observed once every two days for the appearance of symptoms.

Pathogenicity of *Korunomyces* sp. was evaluated by inoculation of healthy detached leaves of *M. calvescens*, *Terminalia ivorensis* A. Chev., *T. catappa* L. and *Eucalyptus grandis* A. W. Hill ex Maiden with culture plugs. The fungus was cultivated in CVA (vegetable broth-agar according to Pereira *et al.* 2002). After seven days, mycelial plugs obtained from the margins of actively growing cultures were transferred to the abaxial and adaxial sides of the detached leaves (four plugs per leaf, four leaves per plant species). The leaves were then placed into humid chambers - trays containing wet cotton pads and left inside plastic bags. These were left at room temperature and examined several times a day in order to follow symptom development.

RESULTS AND DISCUSSION

Cocodiella miconiae (Duby) Hino & Katuamoto, *in* Katuamoto, K. *Journ. Jap. Bot.* 43: 282, 1968. (Figs. 1, 2, 3)

Sphaeria miconiae Duby *in* *Mem. soc. phys. et hist. nat. Genève* 7: 405, 1835.

Physalospora miconiae (Duby) Sacc., *Syll. Fung.* 1: 447, 1882.

Botryosphaeria miconiae (Duby) Hohnel, *Sitz-ber. Akad. Wien.* 118: 836, 1909.

Phyllachora miconiae (Duby) Sacc., *Ann. Myc.* 11: 547, 1913.

Bagnisiopsis miconiae (Duby) Petrak, *Hedwigia* 68: 275, 1928.

Coccostroma miconiae (Duby) v. Arx & Müller, *Die Gattungen der amerosporen Pyrenomyceten. Beitr. Kryptog. fl. Schw.* 11 (1): 263, 1954.

Disease (black pimple): *Lesions* on living leaves: *adaxially* initially punctiform, chlorotic becoming pale brown centrally, often raised and convex (pimple-like), sometimes concavous; older lesions with a narrow well-defined chlorotic halo surrounded by diffuse chlorotic area becoming dark brown to black centrally, circular, up to 5 mm diam, coalescing in some areas of the leaves; *abaxially*,

stromata initially minute and pale brown, becoming a black shiny dot set inside concavities on the leaf laminae, sometimes surrounded by narrow chlorotic halo easily seen with the naked eye, up to 3 mm diam; general foliar deformation and chlorosis sometimes resulting from severe infection.

Morphology: *Internal mycelium* intra and intercellular, branched, septate, hyaline, 2-5 µm diam. *External mycelium* absent. *Stromata* formed abaxially, erumpent, sub-spherical to pulvinate, 189-1500 µm wide, to 190- 473 µm tall, constricted at the base, 167-584 µm wide at the attachment point, isolated or aggregated, initially pale brown and having one to several spermogonia on the surface, becoming black and having several perithecial locules, walls composed of very dark *textura angularis* and internal tissue pale-brown to hyaline. *Ascomata* perithecial, embedded in the stromata, spherical, sub-spherical, sometimes having a distorted shape, 123-218 µm diam, walls composed of hyaline *textura angularis*, approximately 12-19 µm thick (but not well differentiated from the stromatal tissue). *Dehiscence* ostiolate, one ostiole per perithecium, 28.5-71 µm diam. *Hamathecium* including well-developed and abundant septate, unbranched, hyaline paraphyses (up to 75 µm long x 1 µm wide) and periphyses 20-44 x 1 µm. *Asci* unitunicate, attached to the lower part of the perithecia, cylindrical, 71-100 x 7-10 µm, thick-walled, apex round to sub-truncate, stalked, apical ring indistinct, 8-spored. *Ascospores* uniseriate, ellipsoid to sub-spherical, 7-12 x 6-8 µm, aseptate, eguttulate, hyaline becoming brown with age, smooth and relatively thick-walled, increasing in size after ejection and germinating by the formation of a vesicle of similar shape and size to that of the ascospores. *Spermogonia* formed early on the surface of stromata, cupulate, 42.5- 92.5 µm wide to 38-83 µm high, containing hyphoid receptive hyphae and abundant mucilaginous masses of drop-shaped 2-4 x 1-1.5 µm, hyaline, smooth-walled spermatia; darkening and becoming sterile with age changing into black horn-like projections of the stroma.

***Hemidothis* (mitosporic state)** - *Conidiomata* produced abaxially on leaves, similarly to ascomata, stromatic, multilocular, erumpent, isolate or forming small groups, black, shiny, having many blunt rostri, each supporting a drop of milky mucilaginous conidial mass, up to 1 mm diam; walls of dark-brown *textura angularis*, 2-5 cells, 8-26 µm thick, rough; locules spherical, ellipsoidal or

irregular, 35-94 μm diam arising at different levels within the stromata; having very long, fine, septate, hyaline paraphyses that emerge through the ostiole. *Dehiscence* ostiolate, one per locule, rostrate, 19-84 μm diam. *Conidiophores* arising from the internal walls of the locules, cylindrical, tapering towards the apices, straight or flexuose, 10-41 x 1-2.5 μm , 1-2 septate, branched, hyaline, smooth. *Conidiogenous cells* terminal, enteroblastic, cylindrical, tapering towards the apices, 6.5-24.5 x 1-2 μm , hyaline, smooth. *Conidiogenous loci* minute (0.5-1 μm). *Conidia* mucilaginous, enteroblastic, straight or curved, fusiform to falcate, 3.5-8 x 1-2 μm , apex and base rounded, aseptate (only occasionally septate), guttulate, hyaline, smooth.

Material examined: VIC 19303, Viçosa, MG, 16 March 1998; VIC 19305, São Romão (road Lumiar-Casimiro de Abreu), RJ, 24 February 1998; VIC 19306, Sana, RJ, 24 February 1998; VIC 19307, road Glicério - Vila do Grama, RJ, 24 February 1998; VIC 19308, road Frade - Glicério, RJ, 24 February 1998; VIC 19286, Estrada da Grotta Funda, Rio de Janeiro, RJ, 27 December 1995; VIC 19288, Boca do Mato, Cachoeiras do Macacú, RJ, 5 February, 1996; VIC 19290, Road Rio-Petrópolis, Xerém, RJ, 24 March 1996; VIC 19291, road Dionísio - Timóteo, MG, 30 August 1996; VIC 19292, Road Rio - São Paulo, between Barra Mansa and Arrozal, 20 September 1996; VIC 19293, road Lídice - Angra dos Reis, RJ, 20 September 1996; VIC 19294, Bosque da Barra, Barra da Tijuca, Rio de Janeiro, RJ, 30 September 1996; VIC 19295, Alto da Boa Vista, Rio de Janeiro, RJ, 30 September 1996; VIC 19296, Floresta Azul, BA, 21 November 1996; VIC 19297, Reserva Biológica de Una, Una, BA, 22 November 1996; VIC 19298, road Lajinha - Mutum, MG, 16 December 1996; VIC 19299, road BR 101, km 483, between Itabuna and Ubaitaba, BA, 19 January 1997; VIC 19300, road Ubaitaba - Maraú, BA, 19 January 1997; VIC 22202, Gutierrez Braun, Costa Rica, 3 January 1999; VIC 22203, near road Parque Areal, Costa Rica, 30 December 1998; 22204, between San Carlos and Fortune, Costa Rica, 31 December 1998; 22198, near Rio Pedra Fina, Ecuador, 10 may 2000; VIC 22205, Road Avila-Huita Cocha, Ecuador, 14 may 2000; VIC 22206, Loreto, Ecuador, 14 may 2000.



Fig. 1. Symptoms of *Coccidiella miconiae* on leaves of *Miconia calvescens*.

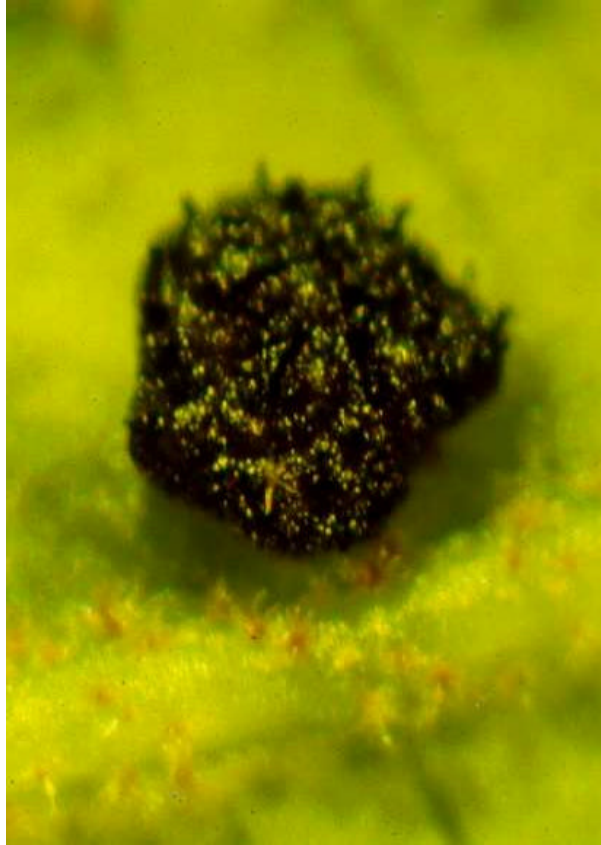


Fig. 2. *Coccidiella miconiae*: one stromata erupting through lower leaf surface (50x).

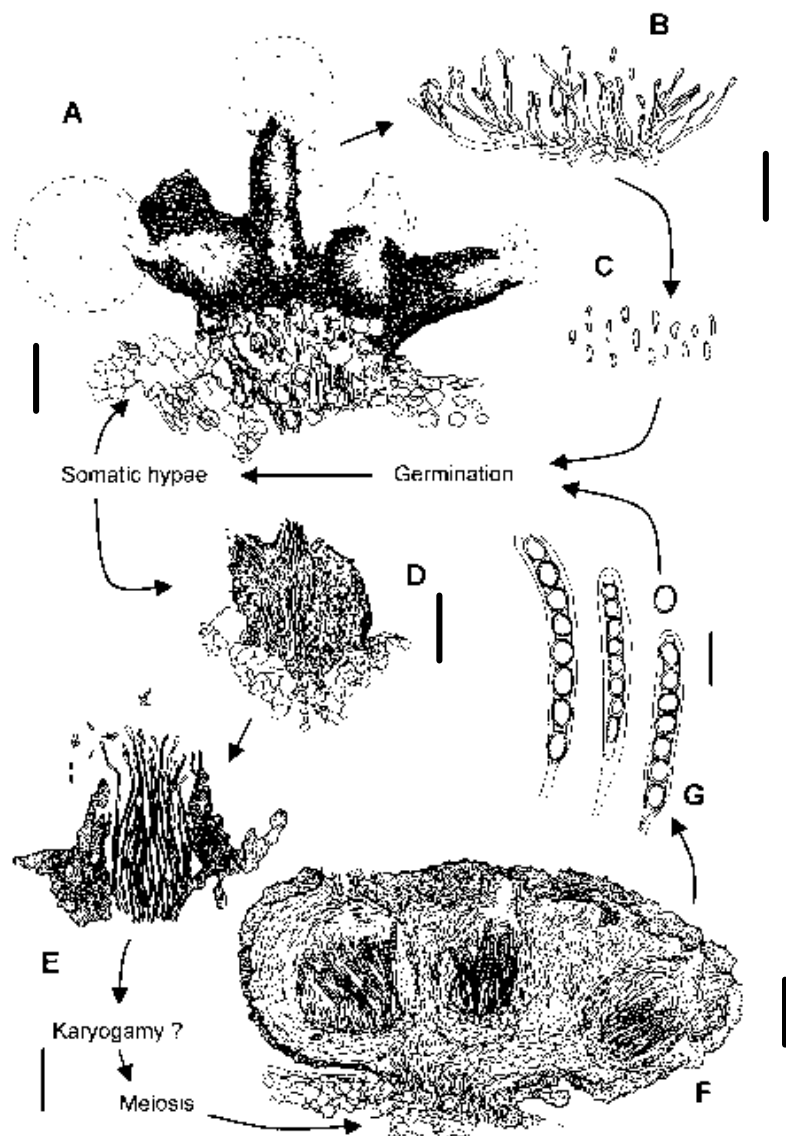


Fig. 3. Proposed life cycle of *Coccodiella miconiae*. Rostrate conidioma supporting drops of mucilaginous masses of conidia (A); Conidiophores and conidiogenous cells showing conidiogenesis (B); Conidia (C); Young stroma erupting through leaf epidermis showing two spermogonia (D); Spermogonium with receptive hyphae and drop-like spermatia (E); Mature stroma with three perithecia (F), (spermogonia not visible in this section); Ascus and ascospores, (note immature ascus with hyaline ascospores), (G). Bar for G= 20 μm . Bar for other figures: A, D and F = 100 μm ; B, C, E = 20 μm .

The genus *Coccodiella* includes around 25 species of biotrophic fungi which are foliar pathogens of plants belonging to 10 different families. Eleven species of *Coccodiella* are parasitic on members of the Melastomataceae. Katumoto (1968) recognized that the name *Coccodiella* proposed for the genus by Hara in 1911 had priority over other names such as *Coccostroma* and *Bagnisiopsis* used by other authors in later works. He then proposed a series of new combinations but only studied material of the type species *Coccodiella arundinaria* Hara. More recently, this species was examined and redescribed by Cannon (1996). Miller & Burton (1943) studied several species of *Bagnisiopsis* (= *Coccodiella*) on the Melastomataceae. These authors observed the presence of spermogonia on the stromata of fungi in this genus for the first time but they apparently failed to observe the later development of these structures in aging stromata. Because of this and the misinterpretation of old spermogonia (and possibly also the rostrate conidiomata) as being ornamented stromata (treated as “setae-like processes” by this authors) they finally adopted their presence as important key characters. In fact, examination of fresh material of the fungus collected on *M. calvescens* having stromata in several stages of development showed quite clearly that such “setae-like processes” are either aged and dried spermogonia or rostrate conidiomata. The presence of these “ornaments” is therefore likely to be dependent on the age or life-cycle stage of the material under examination for other species as well and hence inadequate for species separation. Also, although stating that “the dimensions of ascospores are more variable than in most Ascomycetes” these authors proposed the use of spore size as critical characters for species separation in the key given in their article. These aspects associated with the high proportion of species in the genus described on *Miconia* (9 out of the 26 species of *Coccodiella* having been described from *Miconia*) suggest that some of these taxa may be in fact conspecific. Revision of the *Coccodiella* on Melastomataceae is clearly needed but outside the scope of the present work. The fungus collected during the field work fits well into several overlapping species descriptions given for *Coccodiella* spp on *Miconia*. We decided nevertheless, that now it would be more appropriate using the name *C. miconiae* as this was proposed for a similar *Coccodiella* found growing on leaves of *M. calvescens* in Brazil. Although *C.*

miconiae is not new to science, it is a poorly known fungus (as are in fact the majority of the fungi in this genus) and the description given above is the first complete description of this fungus including two spore stages (spermogonial and mitosporic) which were not previously described or portrayed. A scheme of the life-cycle of this fungus is given in Fig. 3. It is likely that the mitosporic stage with its slimy conidial mass functions in short distance splash dispersal while the ascospores provides the propagules for long distance wind dispersal.

Black pimple caused by *C. miconiae* is ubiquitous on miconia. It is found throughout the year. On certain occasions the disease was almost imperceptible and very few isolated stromata per leaf were present. On other occasions it was very damaging, deforming and causing a general chlorosis of severely infected shoots. Severe mycoparasitism of the stromata of *C. miconiae* was commonly observed. Six different mycoparasites were found associated with this fungus and in some locations they clearly play a major role in limiting the potential damage caused by the black pimple.

It is difficult, nevertheless, at this stage, to explain the differences in severity observed in the field. Based on the many observations that were made of this disease, *C. miconiae* is regarded here as one of the most promising biocontrol candidates found in the mycobiota of *M. calvescens*. It is expected that the introduction of the appropriate strain of this fungus, free from its own natural enemies (particularly its mycoparasites), will result in great impact on invasive populations of miconia.

Glomerella cingulata (Stonem.) Spaulding & Schrenk, *Science Ser.* 2 17: 751, 1903. (Fig. 4)

Meiosporic state: present in old lesions on leaves and formed in some aging cultures. mitosporic state: *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc., *Atti R. Ist. Ven. Sci. Lett. Art. ser.* 6, 2, 670, 1884.

Disease (antracnose): *Lesions* on living leaf on laminae and along leaf margins associated with blight-like symptoms, initiating as minute necrotic circular punctuations becoming larger and roughly circular in the central part of the

leaves, up to 3 cm diam and sometimes elliptical when growing on leaf veins, pale-brown in the centre, periphery dark-brown abaxially and gray-brown to totally gray adaxially, sometimes having a diffuse chlorotic halo; lesions sometimes coalescing leading to necrosis of extensive leaf area; necrotic areas easily torn and tending to fall, sometimes causing the loss of parts of the lamina leaving only a leaf vein skeleton. In one occasion, a miconia population showing widespread die-back starting at the flower buds and descending along the branches was also observed in association to this fungus (RWB 109, Ipeúna, SP).

Material examined: VIC 19306, Sana, RJ, 24 February 1998; VIC 19307, road Glicério - Vila do Grama, RJ, 24 February 1998, VIC 19308, road Frade - Glicério, RJ, 24 February 1998; VIC 19284, road Leopoldina - Cataguases, MG, 2 May 1995; VIC 19285, Mazomba, Itaguaí, RJ, 22 December 1995; VIC 19286, Estrada da Grota Funda, Rio de Janeiro, RJ, 27 December 1995; VIC 19287, Belvedere, Itaguaí, RJ, 27 December 1995; VIC 19288, Boca do Mato, Cachoeiras do Macacú, RJ, 5 February, 1996; VIC 19289, Cristais, Viçosa, MG, 13 March 1996; VIC 19290, Road Rio-Petrópolis, Xerém, RJ, 24 March 1996; VIC 19291, road Dionísio - Timóteo, MG, 30 August 1996; VIC 19292, Road Rio - São Paulo, between Barra Mansa and Arrozal, 20 September 1996; VIC 19293, road Lídice - Angra dos Reis, RJ, 20 September 1996; VIC 19294, Bosque da Barra, Barra da Tijuca, RJ, 30 September 1996; Alto da Boa Vista, Rio de Janeiro, RJ, 30 September 1996; VIC 19296, Floresta Azul, BA, 21 November 1996; VIC 19300, road Ubaitaba - Maraú, BA, 19 January 1997; VIC 19301, margins of Rio Jucú, ES, 17 January 1996; VIC 19302, São Joaquim, Piraí, RJ, 5 March 1997; VIC22207, road of Serrado Cantagalo, 26 November 1998; VIC 22202, Gutiérrez Braun, Costa Rica, 3 January 1999; VIC 22208, Fortuna-Lago Areal, after Tabacon, Costa Rica, 29 December 1998; VIC 22209, road Quito-Lago Agrio, Ecuador, 10 may 2000; VIC 22210, Añango, Ecuador, 12 may 2000.



Fig. 4. Anthracnose of *M. calvenscens* caused by *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *miconiae*.

This is a very common pathogen of *M. calvenscens* in Brazil and on several occasions it was observed in the mitosporic state causing a serious foliar anthracnose. Its morphology is typical of *G. cingulata* and the data for the fungus on miconia fits unmistakably into the description of this taxon and its *C. gloeosporioides* mitosporic stage given in the literature (Arx 1957, Mordue 1971, Sutton 1980). Although isolates were initially obtained from the green undersided leaf form of *M. calvenscens* that is present in Brazil, tests carried out at HDOA (Quarantine Lab), based on an isolate from VIC 19284 has shown that the fungus is host-specific to *M. calvenscens* and a new taxon at the *forma specialis* level was proposed (Killgore *et al.* 1999). A permit for the introduction of the fungus was granted by the Hawaiian authorities and the fungus was introduced in selected sites in the Island of Hawaii in 1997. Later, damaging outbreaks of miconia anthracnose were observed at sites unexpectedly distant from release sites (Barreto *et al.* 2000). This represented the first example of a program involving the classical approach that led to the introduction of a fungal pathogen native from Brazil as a biocontrol agent against a weed in an exotic situation (Barreto *et al.* 2001).

Guignardia miconiae C. D. S. Seixas & R. W. Barreto **sp.nov.** (Figs. 5, 6)

Etym: on leaves of *Miconia calvescens*

Ab *Guignardia citricarpa* Kiely; ascomata epiphylla, 90-285 µm diametro; asci 26.5-102.0 x 24.0-31.5 µm; ascosporeae ovoideus, 14.0-20.0 x 10.0-11.5 µm; appendice indistinctus; status anamorphicus *Leptodothiorella*, differens.

Disease (punctiform tar-spot): *Lesions* on living leaves, limited to black punctuations in subcircular agregates within green tissue when young, more visible abaxially, colonized tissue becomes discolored in older lesions with a central to subcentral gray necrotic area and a dark brown to black periphery abaxially and evenly grayish-brown to gray adaxially 3-12 mm diam; irregularly distributed on the lamina and occasionally coalescing and leading to the formation of cracks in the tissue.

Morphology: *Internal mycelium* inter and intracellular, branched, septate, pale brown. *External mycelium* absent. *Ascomata* ascostromatic, epiphyllous, semi-immersed, isolate, globose to subglobose, 90-285 µm diam, walls composed of dark brown *textura angularis*, 14-74 µm thick, much thicker and melanized on the upper part, smooth. *Dehiscence* ostiolate, central, one per ascoma, 33.5-61 µm. *Interthecial filaments* absent in mature ascomata. *Asci* bitunicate, clavate, 26.5-102 x 24-31.5 µm, eight spored, pedicelate. *Ascospores* inordinate, ovoid, 14-20 x 10-11.5 µm, asseptate, guttulate, hyaline, smooth, mucilaginous sheath very tenuous rarely perceptible.

Anamorphic/spermatial stage: ***Leptodothiorella* sp.**

Conidiomata pycnidial, epiphyllous, semi-immersed, isolate, globose to subglobose, 64-145 µm diam, wall, 10.5-89 µm thick, brown, smooth. *Dehiscence* as described for the ascomata. *Conidiophores* covering all the internal wall of the pycnidia, narrowly lageniform, 7.5-25.5 x 1.5-5.0 µm, 0-2 septate, unbranched, hyaline, smooth. *Conidiogenous cells* integrate, enteroblastic, cylindrical to lageniform, 6-13 x 1-4 µm. *Conidiogenous loci* one per cell, unthickened with a minute collarete. *Conidia* mucilaginous, enteroblastic, straight, dumb-bell-shaped, 4.5-5.5 x 1.0-2.0 µm, asseptate, biguttulate, hyaline, smooth.

Holotype: VIC 22211; Bosque Municipal, Águas da Prata-SP; 27/11/1998

Paratypes: VIC 22212, Águas da Prata-SP, 8 hune 2001; VIC 22218, Road Vila Abhraão-Dois Rios, Ilha Grande, Angra dos Reis-RJ, 13 January 2002;



Fig. 5. Tar-spot of *Miconia calvescens* caused by *Guignardia miconiae*.

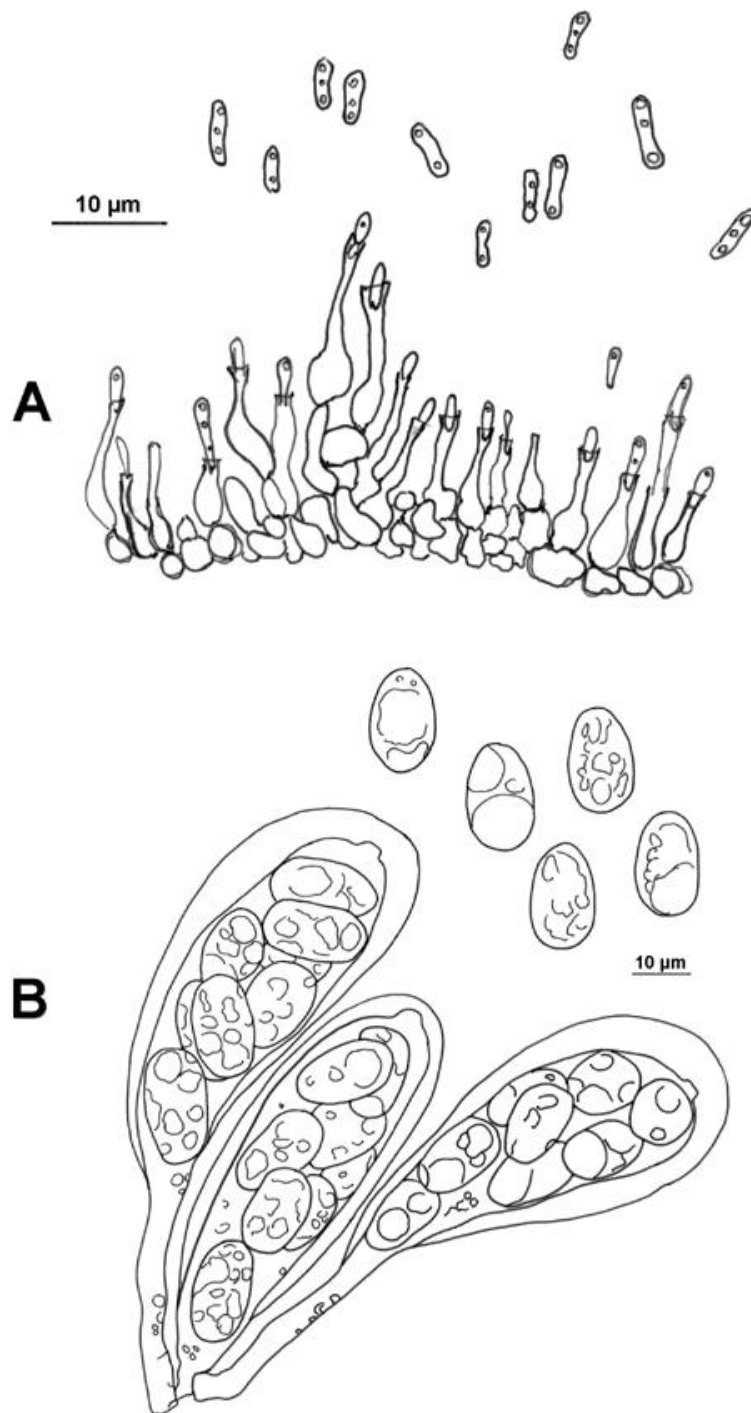


Fig. 6. *Guignardia miconiae*: A- conidiophores and conidia; B- asci and ascospores.

There are only two species of *Guignardia* described on *Miconia*: *Guignardia atropurpurea* Chardon and *Guignardia punctiformis* Chardon (Chardon *et al.* 1940). Both were described from specimen collected on *Miconia* sp. from Viçosa – MG – Brazil. This work was undertaken at the type location for both fungi but during six years of collecting diseases of *M. calvescens* in the region those fungi were never found. It is likely that these fungi have different species of *Miconia* as a host. *G. miconiae* differs from *G. punctiformis* by having larger asci (75-13-18 μm in *G. atropurpurea*) and ascospores that are of a different shape and size (long-elliptical and 17-21 x 7-8 μm). *G. punctiformis* produces smaller lesions on the host (4-6 mm diam), has wider asci (30-34 μm diam) and conidia of a different shape and size (ellipsoidal to sub-pyriform, 20-23 x 10-14 μm). No anamorphic state was described for either *G. atropurpurea* or *G. punctiformis*.

Guignardia miconiae was rare, only being found at two very distantly located sites (Ilha Grande in the state of Rio de Janeiro and Águas da Prata in the state of São Paulo). It has a typical hemibiotrophic habit, starting to produce its fruiting structures in green tissue that gradually yellows and become necrotic. In a recent visit to Ilha Grande damage observed to individual leaves was significant. Several attempts of isolating this fungus with different methods were made but without any success. This was unexpected as fungi in this genus are known to grow well in culture. An attempt to inoculate *M. calvescens* with a suspension obtained by squashing fresh ascomata of material from Ilha Grande also failed to yield symptoms. For the moment it is difficult to evaluate the biocontrol potential for this fungus.

Korunomyces prostratus C.D. S. Seixas & R.W. Barreto **sp. nov.** (Figs. 7, 8)

Ab *Korunomyces terminaliae* Hodges & Ferreira; propaguliphora prostrata, haud distinctus ab hyphae, 3-4 usque 5-8 μm (ad propagula base) diametro, propagula elementis 4.0-10.0 μm diametro, propagula elementis terminalibus 7-13 μm longum, differens.

Etym.: reference to the predominant formation of prostrate propagulophores and propagules.

Disease (leaf blight): *Lesions* necrotic, initially circular with a central grayish-brown centre and a brown periphery, becoming irregular with age with concentric dark brown peripheric rings often resulting in a scale-like pattern, often surrounded by a yellowish halo, coalescing and leading to an extensive leaf-blight; older parts of the lesions tend to crack leaving irregular holes on the leaves.

Morphology: *External mycelium* anfigenous, branched, septate, initially hyaline becoming yellow or orange later. *Internal mycelium* indistinct. *Propagulophores* often difficult to distinguish from ordinary hyphae, cylindrical, simple, length indeterminate, individual cells 11-27 x 3-4 μm , diam below propagules 5-8 μm , hyaline, smooth, point of rupture indistinct or absent. *Propagules* subglobose to irregular when mature, formed on the apex of usually prostrate hyphae or occasionally on erect propagulophores, multicellular, formed of primary branches with an initial dichotomous branching pattern becoming dendritic later, 69-273 x 64-272 μm , branch elements 4-10 μm diam, terminal elements 4-5 x 7-13 μm , initially hyaline becoming orange when mature, smooth. Combination of propagulophores and propagules not achene shaped.

In culture: relatively fast-growing (3.2-6.5 cm diam after 13 days); colonies of cottonose-wooly aerial mycelium showing marked diurnal zonation on PDA, dark orange with a dark-orange reverse; flattened aerial mycelium centrally surrounded by an area of sparse aerial mycelium and strongly irradiative superficial growth on CVA, white, cream to pale orange, reverse as for the surface; on PDA many germinated propagules observed at or near the surface of the medium, rarely along or at the apices of aerial hyphae; sterile.

Holotype: VIC 22213 Ilha Grande-RJ, 04/01/2000

Paratypes: VIC 22198, near Rio Pedra Fina, Ecuador, 10 may 2000; VIC 22219, Mational Park Napo-Galeras, Ecuador, 14 may 2000; VIC 22218, road Vila Abhraão-Dois Rios, Ilha Grande, Angra dos Reis-RJ, 13 January 2002.

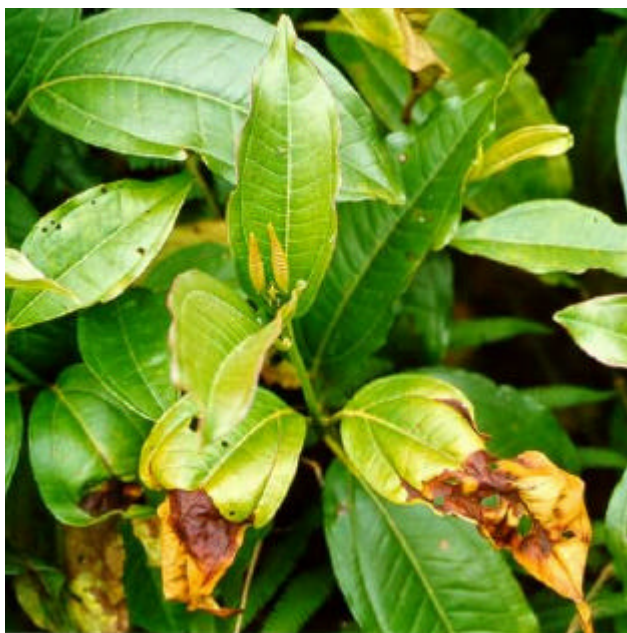


Fig 7. Foliage blight of *M. calvescens* caused by *Korunomyces prostratus*.

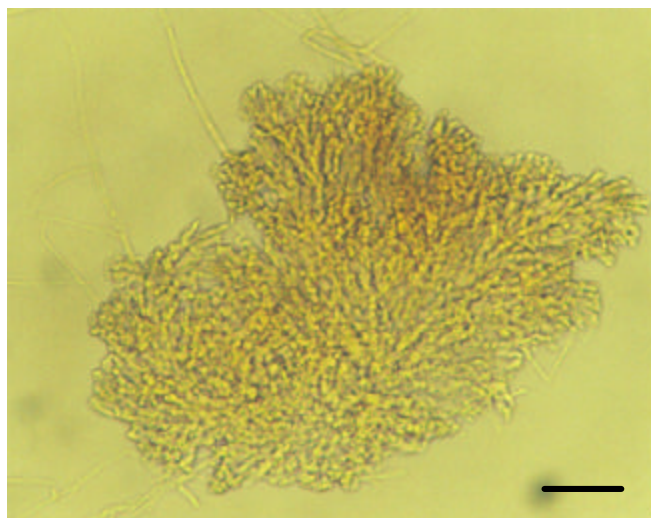


Fig 8. Propagule of *Korunomyces prostratus*. (Bar=50 μ m)

The genus *Korunomyces* was, until now, monotypic. *K. terminaliae* was proposed by Hodges & Ferreira (1981) for a fungus causing a leaf and stem blight on *Terminalia ivorensis* A. Chev. These authors discussed the similarity of this fungus with members of *Cristulariella*, *Papulaspora* and *Aegerita* and concluded that the fungus on *T. ivorensis* deserved the status of a new genus. Nothing has been published on this genus since then. The fungus found on *M.*

calvescens is similar to *K. terminaliae* but morphological differences are regarded here as sufficient to place it as separate species. Perhaps the most significant difference between the two species is the clear achene-like format and probable disperse function of the combination of propagule-propagulophore in *K. terminaliae* and the predominantly prostrate condition of propagules of *K. prostratus*. In the new species these structures are probably not functional as dispersal units and appear to work as infection pads instead. Dispersion in this species is probably dependent on propagule elements or some spore stage which wasn't observed during the present work. Observations of HCl-Giemsa microscopic mounts revealed that *K. prostratus* is multinucleate.

Korunomyces prostratus was found in several different locations in Brazil (states of Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais) and also in Costa Rica and Ecuador associated to the PU biotype of miconia. Leaf blight was often very damaging to the affected leaves but only rarely the number of diseased leaves per plant was high. Neither symptoms nor a perfect stage of the fungus were obtained with the inoculation of mycelial suspension on branches. The experiment involving detached leaves has shown that *K. prostratus* is (under such conditions) capable of causing necrosis on leaves of *M. calvescens*, *T. ivorensis* and *E. grandis* but not of *T. catappa*. That suggests a partial overlapping of the host-range of the two species of *Korunomyces*. *K. terminaliae* was capable of infecting three species of *Terminalia* but not *Eucalyptus grandis* (Hodges & Ferreira, 1981). This result also indicates that considerable care needs to be taken regarding the elucidation of the host-range of *K. prostratus* before its introduction as a classical biocontrol agent is considered. Nevertheless, if safety requirements are met and an adequate form of manipulating this fungus is developed, this fungus may prove useful as a biocontrol agent.

Pseudocercospora tamoneae (Chupp) U. Braun & Castañeda, *Cryptogamic Botany* 2/3: 294 (1991) (Figs. 9, 10)

Cercospora tamoneae Chupp, *A monograph of the fungus genus Cercospora*, p. 383, Ithaca: Published by the author, 1954.

Disease (leaf-spot): *Lesions* on living leaves, irregular, vein delimited, brown surrounded by a diffuse chlorotic halo, up to 13 x 7 mm.

Morphology: *Internal mycelium* intra and intercellular, 2 µm diam, branched, septate, pale-brown, smooth. *External mycelium* hypophyllous, poorly developed, septate, pale-brown, smooth. *Stromata* erumpent, initially subglobose, becoming cylindrical, 24-43.5 x 25-57 µm, composed of grayish-brown cells. *Conidiophores* amphiginous, either densely fasciculate (often more than 20 per fasciculum) or produced singly on external mycelium, cylindrical, straight to slightly sinuose, 15-57 x 2-4 µm, 0-4 septate, unbranched, pale-brown, smooth. *Conidiogenous cells* terminal and intercellular, integrated, holoblastic, proliferating sympodially, cylindrical, straight to slightly sinuose, 1-2 geniculated, 5-19.5 x 3-4 µm, pale-brown, smooth. *Conidiogenous loci* flattened, 2-3 µm wide, unthickened, not darkened. *Conidia* dry, isolate, holoblastic, subcylindrical tapering towards the apices, often slightly curved but sometimes straight, 53-90 x 3-5 µm, apex rounded, base subtruncate, 2-3 µm, 6-11 septate, scar unthickened and not darkened, guttulate, pale-brown, smooth.

Material examined: VIC 19294, on *Miconia jucunda* (DC.) Triana, Bosque da Barra, Barra da Tijuca, RJ, 30 September 1996; VIC 22214, on *Miconia* sp., Chapada dos Guimarães, MT, 11 October 1998; VIC 22215, on *Miconia* sp., Parintins, AM, 30 August 1997.



Fig 9. Symptoms of leaf spots caused by *Pseudocercospora tamonae* in *Miconia calvenscens*.

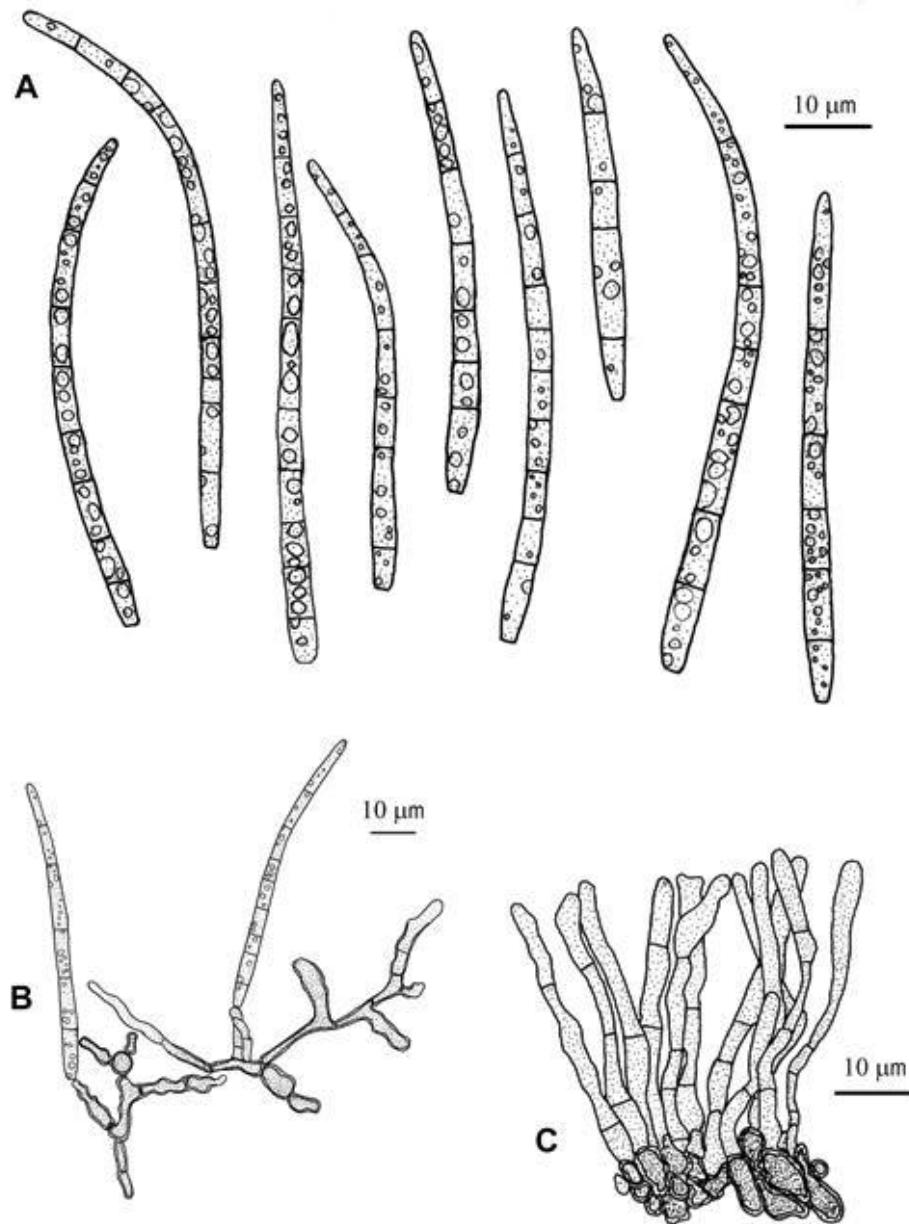


Fig. 10. *Pseudocercospora tamonae*: A- conidia, B- conidiophores on external mycelium, C- conidiophore fascicle.

Nineteen cercosporoid fungi have been described on the Melastomataceae: *Cercospora aciotidis* Chupp; *Cercostigmia curta* (Syd.) Braun; *Pseudocercospora dissotidis* (Chupp & Doidge) Crous & U. Braun; *Pseudocercospora erythrogena* (G.F. Atk.) U. Braun; *Pseudocercospora gracilentia* (H. Syd.) Deighton; *Pseudocercospora leandrae* (Syd.) U. Braun;

Cercospora melastomatis Patouillard; *Pseudocercospora melastombia* Chupp; *Pseudocercospora melastombin* (W. Yamam.) Deighton; *Cercospora miconiae* Fragoso & Ciferri; *Cercospora miconicola* Chupp; *Pseudocercospora mirandensis* (Chupp) R.F. Castañeda & U. Braun; *Cercospora monochaeti* Chupp & Muller; *Cercospora monochaetica* Chupp; *Pseudocercospora tamonae* (Chupp) U. Braun & R.F. Castañeda; *Pseudocercospora oxysporae* (A.K. Kar & M. Mandal) Deighton; *Pseudocercospora osbeckiae* (Kaapor, Lal & Munjal) Kamal; *Cercospora tibouchinae* Viégas; *Ramularia microlepieae* F. Stevens. Braun has recently reexamined many of those species but some still await a reevaluation under the new concepts for the taxa in this group (U. Braun 1995, U. Braun 1998). Additionally to those taxa, there is a record of a “*Cercospora*” on phylloplane of *Metrosideros polymorpha* Gaud. from Hawaii (Baker *et al.* 1979). Confirmation of this record and elucidation of the identity of the fungus, despite the relevance for this work, is not possible as no materials appear to have been deposited by the authors in a herbarium. Among the species listed above, six were recorded on hosts belonging to the genus *Miconia* (Chupp 1953, Farr *et al* 1989, Viégas 1961): *P. erythrogena*, *C. melastomatis*, *C. miconiae*, *C. miconicola*, *P. mirandensis* and *P. tamonae*. Type material of some relevant species was requested for comparison with the material from Brazil and original descriptions were studied. The cercosporoids specimens obtained from miconia in Brazil fit well within the descriptions and is very similar to the type specimen of *P. tamonae* and was therefore recognized as belonging to this taxon.

Degree of damage caused by *P. tamonae* was variable. It was once occurring causing a minor disease (angular leaf-spots) on a single plant of *M. jucunda*. In another occasion, it caused a severe disease of foliage of *Miconia* sp. at Chapada dos Guimarães. Another isolate of this fungus from Parintins was sent to HDOA Quarantine Lab for further study. Tests undertaken in Hawaii indicated that *P. tamonae* is capable of causing a severe disease on the local biotype of *M. calvescens*. Unfortunately it revealed that this fungus appear to have a wide host-range attacking *Psidium cattleianum* Sabine and other plant species. It also appears to be unable complete its cycle on the local biotype of *M. calvescens*. So far, under the controlled conditions which were used for the experiments was unable to sporulate on the inoculated plants.

Additional fungi on *Miconia*

***Phomopsis* sp.**

Lesions on living leaves, circular, elliptical or irregular, initially grayish-green, becoming gray and finally whitish, surrounded by a dark green narrow rim that becomes pale brown and slightly raised with age; necrotic tissue in older lesions easily torn and sometimes associated with central stromata remains (often sterile or insect eaten) sometimes together with stromata of *Coccodiella miconiae*, 1-5 mm diam. *Internal mycelium* inter and intracellular, 2-3.5 μm diam, ramified, septate, hyaline. *External mycelium* absent. *Conidiomata* eustromatic, immersed, separate, variable in shape but often subglobose (cupuliform when viewed in section), 292-459 μm high and 417-709 μm wide, upper part of wall of dark brown *textura angularis*, lower part pale-brown to hyaline and thinner, 3-9 cells / 9,5-18,5 μm thick, smooth. *Dehiscence* ostiolate, single, central, papillate, approximately 80 μm diam. *Conidiophores* originating from the walls, lining all the interior of the conidiomata, cylindrical, tapering towards the apices, 17.5-26.5 x 1.5-2 μm , 2-5 septate, unbranched or with one or few branches, hyaline, smooth. *Conidiogenous cells* terminal, integrated, enteroblastic, phialidic, and associated minute periclinal thickening, cylindrical tapering towards the apices, 4.5-13 x 2 μm , hyaline, smooth. *Conidiogenous loci* minute, terminal, unthickened, not darkened. *Conidia* in mucilagenous groups, of two kinds: α conidia, ellipsoid to fusiform, 4.5-9.5 x 2-2.5 μm , aseptate, hyaline, smooth, guttulate (often with two guttules); β conidia, filiform, hamate or sigmoid, 9.5-19 x 1 μm , aseptate, hyaline, smooth, eguttulate.

Material examined: all specime on *Miconia prasina* (Sw.) DC - VIC 19303, Xerém, road Rio - Petrópolis, RJ, 15 September 1997; VIC 19304, Frade, RJ, 24 February 1998; VIC 19305, São Romão (road Lumiar-Casimiro de Abreu), RJ, 24 February 1998; Reserva Biológica de Una, Una, BA, 22 November 1996; VIC 19298, road Lajinha - Mutum, MG, 16 December 1996.

Phomopsis is considered a difficult genus in taxonomical terms because of its size (Uecker 1988 listed over 800 species) and the considerable morphological similarity between the species. No species belonging to *Phomopsis* has been recorded in association with *Miconia* spp. nor to any other member of the Melastomataceae in the New World but the lack of host-specificity in this genus coupled with the lack of major morphologically distinct features discourages the recognition of a separate taxon for the fungus on miconia. The pathological status of *Phomopsis* sp. on miconia is doubtful. Level of damage observed in the field was limited and it is possible that this may not be a pathogen but a secondary invader or even an endophyte. That, associated to the fact that this fungus only occurred on *M. prasina* suggest that this fungus is of limited relevance to biocontrol.

***Pythium* sp.**

Disease (crown and root-rot): *Lesions* - general and sudden wilt of aerial parts accompanied by rot of plant base and roots.

Material examined: VIC 22216, Boca do Mato, Cachoeira do Macacú-RJ, 26 may 1998.

This straminipilous fungus was readily isolated from necrotic tissues but little attention was given to this fungus. This disease was found only once attacking two neighbouring *M. calvescens* plants, besides, pathogenic species of *Pythium* are well known as having wide host-ranges and hence inadequate for classical biological control.

Other fungi on *Miconia* sp.

Additionally to the fungi listed above specime of *Corticium* sp., *Phyllachora* sp., *Melanconium* sp., *Myrothecium* sp., and *Pestalotiopsis* sp. were collected on *M. calvescens* or other species of *Miconia*. None of these was regarded as being of interest for biocontrol and for the moment no further study was regarded as necessary on these fungi.

ACKNOWLEDGEMENTS

Funding from the Research Corporation of the University of Hawaii, supported this work. Useful suggestions on this manuscript were made by C. Smith. R.W. Barreto also acknowledges financial support from - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq.

REFERENCES

- Alfenas, A.C., Peters, I., Brune, W., Passador, G.C. (1991) *Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais*. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Arx von, J.A. (1957) Die arten der gattung *Colletotrichum* Cda. *Phytopathol. Z.* **29**, 413-468.
- Baker, G., Dunn, P.H. & Sakai, W.S. (1979) Fungus communities associated with leaf surfaces on endemic vascular plants in Hawaii. *Mycologia* **71**, 272-292.
- Barreto, R.W., Killgore, E., Sugiyama, L.S, Santos, C.D. (2000) Biological control of *Miconia calvescens*, the 'cancer vert' with fungal pathogens: present and prospects. In: THIRD INTERNATIONAL WEED SCIENCE CONGRESS, 2000, Foz do Iguaçu. Third International Weed Science Congress: Abstracts.
- Barreto, R.W., Seixas, C.D.S., 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 invasora (*Miconia calvescens*). In: 7 SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 2001, Poços de Caldas. VII Simpósio de Controle Biológico. Livro de Resumos. p.109-109.
- Baruch, Z.; Pattinson, R.R.; Goldstein, G. (2000) Responses to light and water availability of four invasive Melastomataceae in the Hawaiian islands. *Int. J. Plant Sci.* **161**(1):107-118.
- Braun, U. (1998) *A monograph of Cercospora, Ramularia and allied genera (Phytopathogenic Hyphomycetes)*. II. IHM-Verlag, Eching.

- Braun, U. (1995). Miscellaneous notes on phytopathogenic hyphomycetes.II. *Mycotaxon* **55**:223-241.
- Cannon, P. (1996) *Coccodiella arundinariae*. *Mycopathologia* **135**, 39-40.
- Chardon, C.E., Miller, J.H., Muller, A.S. (1940) Ascomycetes from the state of Minas Gerais (Brazil). *Mycologia* **32**:172-204.
- Chupp, C. (1953) *A monograph of the fungus genus Cercospora*. Published by the author: Ithaca.
- Csurhes, S., Edwards, R. (1998) *Potential environmental weeds in Australia*. Environmental Australia Diversity Group, Canberra.
- Csurhes, S.M. (1997) *Miconia calvescens* DC. (Melastomataceae) a potentiality invasive plant in Australia's tropical and sub-tropical rainforests. *Proceedings First Regional Conference on Miconia Control*, Papeete, Taiti, august.
- Farr, D., Bills, G.F., Chamuris, G.P. & Rossman, A.Y. (1989) *Fungi on plants and plant products in the United States*. APS Press, St. Paul.
- Gagné, B.H., Loope, L.L., Medeiros, A.C. & Anderson, S.J. (1992) *Miconia calvescens*: a threat to native forests of the Hawaiian Islands. *Pacific Science* **46**, 390-391.
- Herr, L. (1979) Practical nuclear staining procedures for Rhizoctonia- like fungi. *Phytopathology* **69**(9):958-961.
- Hodges, C.S. & Ferreira, F.A. (1981) *Korunomyces*, a new genus of fungi imperfecti from Brazil. *Mycologia* **23**, 334-342.
- Judd, W.S., Skean, J.D. Jr. (1991) Taxonomic studies in the *Miconiae* (Melastomataceae). VI. Generic realignments among terminal-flowered taxa. *Bull. Florida Mus.Nat.Hist., Biol. Sci.* **36**(2):25-84.
- Katumoto, K. (1968) On the genus *Coccodiella* Hara. *Journ. Jap. Bot.* **43**, 277-284.
- Killgore, E.M., Sugiyama, L.S., Barreto, R.W., Gardner, D.E. (1999) Evaluation of *Colletotrichum gloeosporioides* for biological control of *Miconia calvescens* in Hawaii. *Plant Disease*, **83**(10), p.964-964.
- Meyer, J. Y. and J. Florence. (1996) Tahiti's native endangered by the invasion of *Miconia calvescens* DC. (Melastomataceae). *Journal of Biogeography* **23**:775-781.
- Meyer, J.Y. (1996) Status of *Miconia calvescens* (Melastomataceae) in the Society Islands (French Polynesia). *Pacific Science* **50**, 66-78.

- Meyer, J.Y.; Malet, J.P. (1997) *Study and management of the alien invasive tree Miconia calvescens DC. (Melastomataceae) in the islands of Raiatea and Tahaa (Society Islands, French Polynesia): 1992-1996*. Manoa, Hawaii: Cooperative National Park Resources Studies Unit University of Hawai'i at Manoa, 56p. (Technical Report 111).
- Meyer, K. Welcome to the Melastomataceae homepage. In: <http://www.uni-mainz.de/FB/Biologie/Botanikspeziell/Melastomataceae/index.html>; 1998, 2p.
- Miller, J.H. & Burton, M.G. (1943) Study of *Bagnisiopsis* species on the *Melastomataceae*. *Mycologia* **35**, 312-334.
- Mordue, J.E.M. (1971) *Glomerella cingulata*. *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria* **315**, 1-2.
- Pereira, J.M., Barreto, R.W., Ellison, C. A., Maffia, L.A. (2002) *Corynespora cassicola* f.sp. *lantanae*: a potential biocontrol agent for *Lantana camara* from Brazil. *Biological Control* (no prelo).
- Renner, S.S. (1993) Phylogeny and classification of the *Melastomataceae* and *Memecylaceae*. *Nord. J. Bot.* **13**:519-540.
- Silveira, S.F. (1966) *Etiologia e controle da mela de estacas e da queima de folhas de eucalipto, causada por Rhizoctonia spp.* Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Dissertação (Doutorado em Fitopatologia).
- Sutton, B.C. (1980) *The Coelomycetes*. CMI: Kew.
- Uecker, F.A. (1988) A world list of *Phomopsis* names with notes on nomenclature, morphology and biology. *Mycologia Memoir* **13**, 1-231.
- Viégas, A.P. (1961) *Índice de Fungos da América do Sul*. Instituto Agronômico de Campinas: Campinas.

***Coccidiella miconiae*: um agente de biocontrole em potencial contra *Miconia calvenscens* (Melastomatacae)**

C.D.S. SEIXAS, R.W. BARRETO*, L.A. MAFFIA e B.S. VIEIRA

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 36571-000, Brasil.

*autor para correspondência (e-mail: rbarreto@mail.ufv.br)

Resumo. *Miconia calvenscens* é uma planta arbustiva originária da América Tropical que foi introduzida como ornamental em várias regiões do mundo e tornou-se uma séria invasora em ilhas do Pacífico, como a Polinésia Francesa e o Arquipélago Havaiano. O controle biológico clássico é reconhecido como a única opção para uma solução definitiva para o problema a longo prazo. Explorações em busca de fitopatógenos resultaram numa lista incluindo doze espécies de fungos fitopatogênicos, um fitoplasma e um nematóide associados a *M. calvenscens*. Entre os fungos, destaca-se *Coccidiella miconiae*, agente causal de uma doença severa, a “acne negra”. Resultados dos estudos sobre a biologia do fungo e epidemiologia da doença indicam que *C. miconiae* é um agente de difícil manipulação mas, dada a sua especificidade, ampla disseminação e à severidade da doença que provoca, pode-se considerá-lo um excelente candidato para uso no biocontrole.

Palavras-chave: controle biológico de invasoras, *Miconia calvenscens*, *Coccidiella miconiae*

Introdução

Várias espécies de plantas da família Melastomataceae estão entre as mais agressivas invasoras de ilhas do Pacífico, como o Havaí e o Taiti (Meyer e Florence, 1996). Uma das espécies, *Miconia calvenscens* DC., é considerada a pior das invasoras no Taiti; está na lista de plantas nocivas no Havaí desde 1992 (Meyer e Florence, 1996; Meyer e Malet, 1997) e seu cultivo

e comercialização estão proibidos em Queensland, na Austrália desde 1997 (Csurhes, 1997).

Miconia calvescens é nativa do sul do México ao sul do Brasil e norte da Argentina, sendo que no sul do México, norte da Guatemala, Belize, Costa Rica e Equador ocorre uma forma desta planta que apresenta folhas grandes (até 1m de comprimento), com a face adaxial verde escuro e a abaxial violeta, características que fizeram com que fosse introduzida nas regiões citadas e em outras regiões do mundo como planta ornamental (Meyer, 1996; Csurhes, 1997; Csurhes e Edwards, 1998). Aparentemente, o sucesso desta planta como invasora, nas regiões onde foi introduzida, resultou de características tais como: rápida taxa de crescimento; grande produção de sementes; dispersão eficiente; persistência de sementes no solo; tolerância ao sombreamento e ausência de inimigos naturais nas regiões onde foi introduzida (Meyer, 1996; Csurhes, 1997; Meyer, 1998a).

Além de alterar a composição de espécies e a estrutura e diversidade de comunidades das ilhas, as invasões biológicas provocam outras mudanças no ecossistema, como o regime de água e luz, o ciclo dos nutrientes no solo. No caso de *M. calvescens*, há suspeitas de que aumente a erosão e provoque deslizamentos de terra em locais com declividade acentuada (Vitousek, 1994; Meyer e Florence, 1996; Meyer, 1998b).

Em casos de invasões biológicas, o controle biológico de plantas invasoras tem sido a opção mais viável, por ter menor custo, não poluir o ambiente e ser mais segura (Harley & Forno, 1992). Uma das primeiras etapas num programa de biocontrole clássico é o levantamento de inimigos naturais da planta-alvo na sua região de origem (Schroeder, 1983). Desde 1995, após celebração de convênio entre a Fundação Arthur Bernardes (FUNARBE) da Universidade Federal de Viçosa e o Research Corporation of the University of Hawaii (RCUH) tem-se efetuado levantamento de fitopatógenos associados a *Miconia calvescens* no Brasil e em outros países da América do Sul e Central. Em 1997, o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *miconiae*, detectado na região de Leopoldina-MG, foi introduzido no Havaí e se estabeleceu promovendo controle parcial de *M. calvescens*.

Dentre os outros fungos fitopatogênicos detectados em *Miconia* durante as explorações, destacou-se *Coccodiella miconiae*, que foi encontrado

associado a *M. calvescens* no Brasil, Equador e na Costa Rica. Trata-se de um parasita obrigatório que causa a doença denominada acne negra, assim chamada pela presença de estromas negros do fungo na área lesionada acompanhada de protuberâncias amareladas sobre a folha. Diversas amostras de material deste fungo foram enviadas para a realização de estudos na unidade quarentenária do HDOA-Honolulu. Amostras provenientes de várias localidades do Brasil, Costa Rica e Equador foram enviadas. Estas amostras consistiram de folhas doentes herborizadas, folhas frescas e plantas vivas (mudas de raiz nua) infectadas. Nenhuma destas tentativas foi bem sucedida. Na maioria das vezes em que suspensões de estromas macerados foram aplicados sobre mudas do biotipo de miconia presente no Havaí, não se obteve qualquer sinal de infecção. Numa ocasião foram observadas pontuações amareladas adaxiais que caracterizam o início de infecção, mas não houve surgimento posterior de estromas. As quatro remessas, duas do Brasil, Uma da Costa Rica e uma do Equador, de plantas vivas infectadas falharam, seja por estresse das plantas durante a viagem ou pelo ataque intenso por um micoparasita aos estromas de *C. miconiae*, identificado como *Sagenomella* sp.. Um melhor entendimento sobre aspectos da biologia de *C. miconiae* emerge como um pré-requisito para a sua adequada manipulação.

O gênero foi estabelecido por K. Hara em 1911; quase todas as espécies são parasitas foliares e distribuídas na América do Sul e Central e uma espécie (*C. capparidis*) ocorre na Índia e Paquistão (Katamoto, 1968). Apesar da distribuição de *Coccodiella* spp. e de 25 espécies já terem sido descritas, pouco se sabe sobre a biologia dos fungos deste gênero, inclusive de *C. miconiae*. Sem o conhecimento básico sobre a biologia de um agente de controle biológico, a avaliação do seu potencial, sua manipulação e uso ficam inviabilizadas. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar aspectos da biologia do fungo e verificar a influência de fatores climáticos sobre a intensidade da doença no campo.

Material e Métodos

Inoculação de Coccidiella miconiae em Miconia calvescens

Obtiveram-se plantas de *M. calvescens* do biotipo do Brasil a partir de estacas enraizadas de plantas da região de Viçosa-MG, e plantas do biotipo do Havaí a partir de sementes germinadas enviadas por E. Killgore (Hawaii Department of Agriculture).

A partir do inóculo obtido de folhas doentes e coletadas na região de Viçosa-MG, empregaram-se quatro métodos de inoculação artificial para se obter sintomas de Acne Negra.

No primeiro método, duas plantas de cada biotipo foram inoculadas por pincelamento ou ejeção de esporos. Para o pincelamento, estromas de *C. miconiae*, que se destacavam facilmente da folha, foram selecionados e macerados em água destilada, e a suspensão obtida foi pincelada na superfície abaxial de todas as folhas de cada planta. No caso de ejeção, fragmentos de folhas de *M. calvescens* contendo estruturas de *C. miconiae* foram colados em pedaços de fita adesiva, os quais foram afixados sobre todas as folhas de cada planta a ser inoculada, de maneira que os estromas do fungo ficassem suspensos e com os ostíolos voltados para a face abaxial das folhas. As folhas inoculadas foram viradas delicadamente e mantidas por 96 horas amparadas com a face abaxial voltada para cima.

As plantas inoculadas foram mantidas em câmara de nevoeiro com nebulização intermitente, a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas (9 lâmpadas tipo “Luz do Dia” de 20W posicionadas a 1,20m de altura). Após 48 horas, foram transferidas para câmara de crescimento a 30°C, com fotoperíodo de 12 horas (9 lâmpadas tipo “Luz do Dia” de 40W posicionadas a 1,0m de altura) onde permaneceram por dois meses. Diariamente, inspecionavam-se as plantas para se detectar o aparecimento dos sintomas.

No segundo método, duas plantas foram inoculadas apenas por meio do pincelamento da suspensão de esporos, em ambas as faces das folhas. As plantas foram mantidas nas mesmas condições citadas anteriormente.

Na terceira tentativa, selecionaram-se estruturas assexuadas de *C. miconiae* para constituírem o inóculo. Antes de maceradas, as estruturas foram

mantidas em câmara úmida por 12 horas em temperatura ambiente. Os procedimentos posteriores foram os mesmos das tentativas anteriores.

Na quarta tentativa, o inóculo foi obtido de três maneiras a partir de estromas destacados: 1) de folhas doentes minutos após serem coletadas; 2) de folhas mantidas em geladeira a 10°C por dois dias e 3) de folhas mantidas em geladeira a 10°C por quatro dias (apenas estromas grandes foram destacados). Os estromas foram macerados em água destilada e a suspensão de ascósporos resultante foi pincelada em ambas as faces de folhas saudáveis. As plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro com nebulização intermitente, a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas (9 lâmpadas tipo “Luz do Dia” de 20W posicionadas a 1,20m de altura). Após 48 horas, foram transferidas para câmara de crescimento a 26°C, com fotoperíodo de 12 horas (9 lâmpadas tipo “Luz do Dia” de 40W posicionadas a 1,0m de altura) onde foram observadas diariamente para verificação do aparecimento de sintomas, durante dois meses. Paralelamente, prepararam-se duas lâminas com gotas pendentes a partir de cada suspensão usada nas inoculações, para quantificar germinação de ascósporos. As lâminas foram mantidas em câmara úmida, em incubadora a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas (19,3 μ mol/s). Após 24 horas, em cada lâmina avaliou-se a proporção de esporos germinados entre os primeiros 100 observados no exame microscópico das lâminas.

Além da tentativa de reprodução de sintomas da doença utilizando-se métodos artificiais de inoculação, 10 plantas do biotipo do Havaí, com 3 a 4 pares de folhas, plantadas em vasos, foram levadas para o campo e colocadas sob plantas do biotipo brasileiro, naturalmente infectadas por *C. miconiae*, e irrigadas semanalmente, na localidade de “Balsa Velha”, na área da Companhia Agrícola Florestal Santa Bárbara Ltda., no município de Dionísio-MG. As observações foram feitas a cada 3 semanas no período de setembro de 2001 a maio de 2002.

Ejeção de esporos sob diferentes temperaturas

Fragmentos de folhas doentes, coletadas em Viçosa-MG, contendo estruturas do patógeno, de tamanhos variados, foram fixados sobre uma camada de vaselina espalhada previamente no centro da face interna da tampa de placas de Petri contendo Ágar-água, de maneira que os ostíolos ficassem

voltados para a superfície do meio. As placas foram mantidas a 5, 15, 25 ou 35°C por 4, 8, 12, 24 ou 48 horas.

O ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições (uma placa/repetição). Vinte placas foram mantidas em cada temperatura e, a cada intervalo de tempo, quatro placas foram retiradas para avaliação. As placas foram observadas em microscópio ótico para verificar a presença de esporos na superfície do meio. Atribuíram-se notas de acordo com a quantidade de esporos ejetados: 0- ausência de esporos; 1- pouca deposição (esporos esparsos, difíceis de serem localizados); 2- deposição abundante (esporos numerosos, mas possíveis de serem contados); 3- deposição muito abundante (grande número de esporos, de contagem difícil).

Tempo de germinação de ascósporos

Este ensaio foi montado com folhas de *M. calvescens* coletadas em Viçosa-MG. Folhas novas e sadias foram inoculadas de duas maneiras: 1) estruturas de *C. miconiae* destacadas de folhas doentes foram maceradas em água destilada e a suspensão resultante foi pincelada sobre a superfície abaxial das folhas; e 2) fragmentos de folhas contendo estromas do fungo foram colados em um pedaço de fita adesiva, a qual foi afixada nas folhas sadias de modo que os estromas do fungo ficassem suspensos com os ostíolos voltados para a superfície abaxial de folhas sadias.

Cada folha inoculada foi colocada num saco plástico contendo chumaços de algodão umedecido em água e mantida a 25°C no escuro. Após 12, 24, 36, 48 ou 60 horas, uma folha foi retirada do saco plástico e fragmentos do limbo foliar que recebeu o inóculo foram submetidos à coloração e ao clareamento (Bruzzese e Hasan, 1983) e após observados sob microscópio ótico, para se avaliar a ocorrência de esporos germinados sobre folha e colonização do tecido foliar.

Este ensaio foi modificado e repetido, sendo que as folhas foram inoculadas apenas com suspensão de ascósporos, obtida a partir da maceração de estromas, pincelada na face adaxial e abaxial das folhas. Incubou-se a 27°C com fotoperíodo de 12 horas (19,3µmol/s) e avaliou-se o número de esporos germinados após 1, 2, 3, 4 ou 5 dias.

Germinação de ascósporos sob condições de temperatura baixa

As folhas para retirada dos estromas de *C. miconiae* foram mantidas em geladeira, a 5°C. Após 2, 4 ou 6 dias, retiraram-se folhas e selecionaram-se estromas grandes (com 1,5mm ou maiores) e pequenos (menores que 1,5mm), os quais foram macerados separadamente. Estromas retirados de folhas recém-colhidas foram usados como testemunha. Foram montadas lâminas com gotas pendentes das suspensões, mantidas em câmara úmida, a 20°C com fotoperíodo de 12 horas (19,3µmol/s). Após 48 horas, as lâminas foram montadas em lactofenol e observadas ao microscópio ótico (objetiva de 100x) para a contagem do percentual de esporos germinados dentre os primeiros 100 observados por lâmina.

Preservação de C. miconiae em folhas de M. calvenscens doentes

O objetivo deste ensaio foi determinar a melhor forma de armazenar folhas de *M. calvenscens* infectadas por *C. miconiae*, que menos afetasse a germinação de ascósporos.

Compararam-se os seguintes métodos de preservação das folhas a) temperatura ambiente por 6 dias; b) herborização por 6 dias; c) manutenção em sacos plásticos em temperatura ambiente por 2, 4 ou 6 dias e após cada período as folhas foram transferidas para 5°C por 2 dias; d) manutenção em geladeira a 10°C por 2, 4 ou 6 dias; e) herborização por 2, 4 ou 6 dias e após cada período as folhas foram transferidas para 5°C por 2 dias. Folhas recém-colhidas foram usadas como testemunhas.

Após cada tratamento, estromas grandes ($\geq 1,5\text{mm}$) de *C. miconiae* foram destacados das folhas, macerados em água destilada e lâminas com gotas pendentes foram preparadas e mantidas em câmara úmida, a 20°C com fotoperíodo de 12 horas (19,3µmol/s). Após 48 horas, contou-se o número de esporos germinados dentre os primeiros 100 observados em cada lâmina.

O ensaio foi montado em DIC com quatro repetições (uma lâmina com uma gota invertida/repetição).

Controle químico de Sagenomella sp., micoparasita de Coccodiella miconiae, e efeito de fungicidas na germinação de ascósporos do fitopatógeno

Foram montados três experimentos, que objetivaram: 1) controle químico de *Sagenomella sp.*; 2) definir dose e tempo de tratamento; 3) efeito do controle químico de *Sagenomella sp.* na germinação de ascósporos de *C. miconiae*.

Controle químico de Sagenomella spp.

Objetivou-se a seleção de produtos para controlar *Sagenomella sp.* sobre estromas de *C. miconiae*. Os produtos testados foram: benomyl (0,5g IA/L); chlorotalonil (2,25g IA/L); azoxistrobin (0,005g IA/L); tebuconazole (0,01g IA/L); captan (1,5g IA/L) e cloro. Cada produto foi utilizado na dose comercial e na metade dessa dose. No caso do cloro, que não tem dose comercial, estipularam-se as doses de 19,5g e 9,75g/IA/L respectivamente.

Em folhas de *M. calvescens* infectadas por *C. miconiae*, coletadas em Viçosa-MG, selecionaram-se, com auxílio de microscópio estereoscópico, estromas que apresentavam colonização de *Sagenomella sp.*. Vinte fragmentos de folhas contendo estromas foram colocados em um Erlenmeyer contendo a suspensão/solução do produto sob agitação. Após um minuto, os fragmentos foram colocados sobre papel de filtro para retirar o excesso de solução e transferidos, em grupos de quatro, para placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio CVA (Caldo de vegetais-ágar). As placas foram mantidas a 25°C com fotoperíodo de 12 horas (19,3µmol/s). A testemunha foi constituída de fragmentos que ficaram em água por um minuto.

Após 10 dias, contou-se o número de fragmentos por placa a partir dos quais não houve crescimento de *Sagenomella sp.* e transformou-se esse valor em porcentagem de controle.

O ensaio foi montado em DIC, em esquema fatorial com cinco repetições. Cada repetição foi constituída por uma placa de Petri com meio CVA, com quatro fragmentos, cada um contendo um estroma de *C. miconiae*.

Dose de produtos e tempo de tratamento para o controle de Sagenomella sp. sobre estromas de C. miconiae

Com os produtos selecionados na primeira etapa (benomyl e cloro), compararam-se os níveis de controle com as seguintes doses: comercial, metade da comercial e o dobro da comercial (0,5, 0,25 e 1,0gI/L de benomyl; 19,5, 9,75 e 39gI/L de cloro, respectivamente), nos tempos de tratamento de 1, 3, 9 e 15 minutos. Fragmentos mantidos em água estéril, sob agitação, por um minuto serviram como testemunha.

O ensaio foi montado em DIC, com 5 repetições. A montagem e avaliação deste ensaio foram as mesmas descritas no ítem anterior. Modificou-se apenas o tempo de avaliação, que foi realizada após 5 dias.

Germinação de ascósporos de C. miconiae em folhas tratadas com cloro

Folhas de *M. calvescens*, com estromas de *C. miconiae* aparentemente livres do micoparasita *Sagenomella* sp., foram tratadas com cloro na dose de 9,75g/L, por um minuto. Após o tratamento, estromas foram destacados, macerados em água destilada e pincelados sobre a face superior de folhas saudáveis e destacadas de micônia. Cada folha inoculada foi colocada separadamente, num saco plástico contendo um chumaço de algodão umedecido e mantida em incubadora a 25°C com fotoperíodo de 12 horas (19,3µmol/s). Após três dias, fragmentos das folhas foram removidos e submetidos à técnica de coloração e clareamento de Bruzzese e Hasan (1983), para a verificação da presença de esporos germinados.

O ensaio foi montado em DIC com dez repetições (uma folha/repetição). Este ensaio foi repetido com uma modificação. Ao invés do pincelamento de suspensão de *C. miconiae* sobre folhas destacadas, apenas montaram-se lâminas com gotas pendentes da suspensão de ascósporos, que foram mantidas em câmara úmida, a 20°C com fotoperíodo de 12 horas (19,3µmol/s). Após 24 horas, as lâminas foram montadas com lactofenol e observadas ao microscópio ótico para contagem do número de esporos germinados dentre os primeiros 100 observados em cada lâmina.

Intensidade da acne negra no campo

Este estudo foi conduzido em duas localidades do Estado de Minas Gerais, escolhidas em função da ocorrência natural de populações de *M. calvescens*: “Cristais” no município de Viçosa e “Balsa Velha” ou “Retirante” (próximo à margem do Rio Doce), na área da Companhia Agrícola Florestal Santa Bárbara Ltda. (CAF) no município de Dionísio.

Durante 12 meses, em intervalos de 3 semanas, foram avaliadas a incidência e a severidade da acne negra. Avaliaram-se, também, a ocorrência do anamorfo e de hiperparasitas do fungo. Os dados coletados foram correlacionados com as variáveis climáticas (temperatura, umidade relativa e precipitação) registradas em cada região, durante o período de avaliação.

Incidência da acne negra

A incidência da doença foi avaliada em ambos os locais. Ramos de plantas infectadas distribuídas pela área foram marcados até que se alcançassem pelo menos 200 folhas no total. Em intervalos de 3 semanas, foram registrados, para cada ramo, os seguintes dados: número total de folhas; número de folhas saudas e número de folhas infectadas por *C. miconiae*.

Severidade da acne negra

A severidade da doença foi avaliada apenas em Viçosa. Para tanto, utilizando-se etiquetas plásticas numeradas, foram marcadas 400 folhas em plantas distribuídas por toda a área. As avaliações foram feitas com intervalos de três semanas. Para estimar a severidade da doença, utilizou-se uma escala de notas: 1, 2, 3, 4 e 5, que correspondiam a 0-5, 6-10, 11-20, 21-40 e > 41% de área foliar doente, respectivamente.

Ocorrência do anamorfo e de hiperparasitas de C. miconiae

Este estudo foi conduzido apenas na área de trabalho localizada em Dionísio-MG. Para tanto, a intervalos de 3 semanas, 15 folhas apresentando lesões de *C. miconiae* foram coletadas em plantas de *M. calvescens* diferentes daquelas que possuíam ramos e, ou, folhas marcadas. No laboratório, essas folhas foram observadas ao microscópio estereoscópico e anotadas a presença do anamorfo (*Hemidothis* sp.) e de hiperparasitas (sem distinção das espécies

presentes) em cada uma delas. Os dados coletados foram correlacionados com as variáveis climáticas registradas na região durante o período de avaliação.

Resultados

Inoculação de C. miconiae em M. calvescens

Nenhum dos métodos de inoculação artificial do patógeno resultou na produção de sintomas de acne negra em *M. calvescens*.

As plantas do biotipo do Havá introduzidas no campo sob plantas do biotipo brasileiro infectadas por *C. miconiae* não apresentaram sintomas da doença, mesmo após um período de 8 meses no campo.

Ejeção de esporos sob diferentes temperaturas

Após 4h de incubação, já havia deposição de esporos em amostras mantidas a 25 e 35°C, mas não a 5 e 15°C. Observou-se uma tendência de que os níveis mais elevados de deposição de esporos ejetados dos estromas ocorressem gradativamente mais tarde para amostras incubadas sob temperaturas mais baixas (8h a 35°C, 12h a 25°C, 24 h a 15°C e 48 h a 5°C). A maior ejeção de esporos ocorreu a 25°C após 48 horas (Quadro 1).

Quadro 1. Deposição de esporos ejetados de estromas de *Coccidiella miconiae* em ágar-água em diferentes temperaturas.

Tempo (h)	Temperatura (°C)			
	5	15	25	35
4	0(0) ^a	0(0)	0.5(0.5)	1.25(0.25)
8	0.25(0.25)	0.25(0.25)	0.75(0.25)	1.75(0.25)
12	0.25(0.25)	0.25(0.25)	1.75(0.25)	1.75(0.25)
24	0(0)	1.75(0.25)	2(0)	2(0)
48	1.25(0.48)	1.5(0.64)	2.75(0.25)	1.75(0.25)

^a: Média do tratamento (Desvio Padrão). 0= deposição nula; 1= pouca deposição; 2= deposição abundante (esporos numerosos, mas possíveis de serem contados); 3= deposição muito abundante (contagem difícil)

Tempo de germinação de ascósporos

Na primeira tentativa, não houve germinação de ascósporos em quaisquer dos tratamentos. Na repetição do ensaio, ocorreu germinação na face adaxial das folhas, após 24 horas, mas a porcentagem de ascósporos germinados foi muito baixa (0.1%).

Germinação de ascósporos sob condições de temperatura baixa

A porcentagem de germinação de ascósporos foi mais alta quando estes foram obtidos de ascocarpos grandes e quando mantidos a 5°C por 2 dias. Entretanto, após esse período houve um decréscimo na germinação (Figura 1). A tendência de germinação de ascósporos provenientes de ascocarpos grandes foi similar à dos provenientes de ascocarpos pequenos.

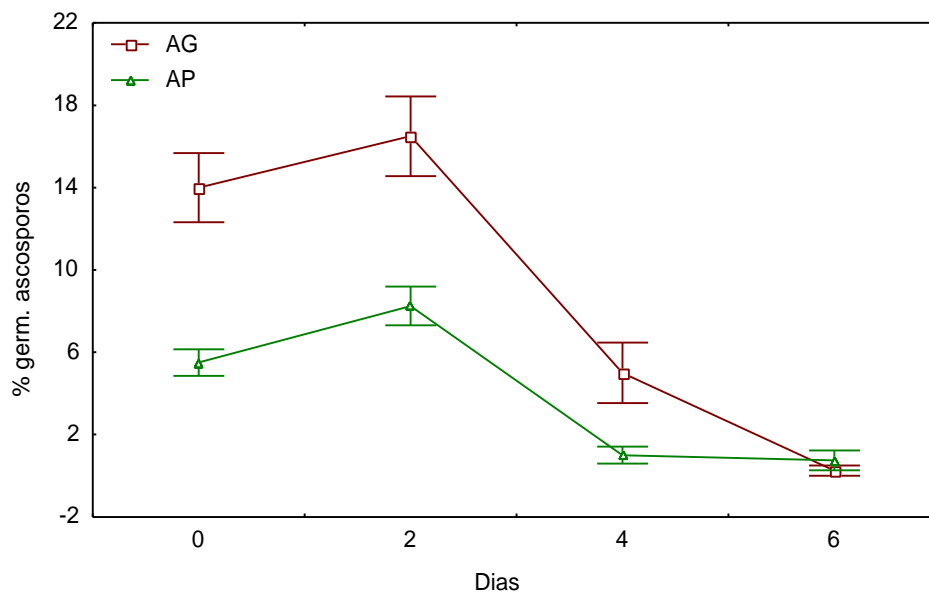


Figura 1. Germinação (%) de ascósporos de *Coccidiella miconiae* provenientes de ascocarpos grandes (AG) e pequenos (AP) após tratamento com temperatura de 5°C por diferentes períodos. Barra corresponde ao erro padrão da média.

Preservação de C. miconiae em folhas de M. calvenscens doentes

Os resultados indicaram que dentre os métodos testados para a preservação de folhas de *M. calvenscens* infectadas por *C. miconiae* o melhor foi a manutenção do material em saco plástico a 10°C. O fungo manteve-se

nestas condições por até 6 dias com nível de germinação ainda razoável (Quadro 2).

Quadro 2. Germinação de ascósporos de *Cocodiella miconiae* sob diferentes métodos de preservação de folhas de *Miconia calvenscens* doentes.

Tratamento	Germinação de esporos (%)			
	0 dias	2 dias	4 dias	6 dias
Testemunha ^b	46.8(14) ^a	-	-	-
Temperatura ambiente	- ^c	-	-	14.0(5.4)
Herborizado	-	-	-	4.5(1.3)
Temp. ambiente + 2 dias a 5°C	-	15(2.9)	9.3(1.3)	2.0(1.4)
10°C	-	31.0(11.6)	42.3(6.4)	32.5(8.3)
Herborização + 2 dias a 5°C	-	14.3(4.5)	3.0(4.1)	1.0(0.8)

^aMédia do tratamento (Desvio Padrão); ^b Folhas recém colhidas;

^c Tratamento não existente.

Controle químico de Sagenomella sp.

Os produtos mais eficientes contra *Sagenomella sp.* foram benomyl e cloro (Quadro 3).

Quadro 3. Porcentagem de controle de *Sagenomella* sp. sobre estromas de *Coccodiella miconiae* após tratamento com produtos químicos.

Produto	% de Controle	
	Concentração do produto	
	Comercial	Metade da comercial
azoxistrobin	5(10) ^a	10(20)
benomyl	20(18.71)	30(18.71)
captan	0(0)	0(0)
chlorotalonil	10(12.25)	5(10)
cloro	35(12.25)	50(15.81)
tebuconazole	0(0)	0(0)
Testemunha	0(0)	-

^a Média do tratamento (Desvio Padrão)

Dose e tempo de tratamento com benomyl e cloro para o controle de Sagenomella sp. sobre estromas de C. miconiae

Embora os produtos tenham tido efeitos semelhantes contra o micoparasita, o cloro foi ligeiramente mais eficiente que o benomyl. A dose de 9,75g de IA/L de cloro por 1 minuto foi suficiente para exercer o controle do micoparasita (Quadro 4).

Quadro 4. Porcentagem de controle de *Sagenomella* sp. sobre estromas de *C. miconiae* com diferentes concentrações e tempo de tratamento com cloro e benomyl .

Produto	Concentração	Tempo de tratamento (min)			
		1	3	9	15
benomyl	Comercial	90(20) ^a	60(12.25)	70(24.49)	45(10)
	Metade	40(25.5)	70(29.15)	75(15.81)	35(20)
	Dobro	60(25.5)	45(18.71)	65(20)	60(20)
cloro	Comercial	100(0)	100(0)	95(10)	100(0)
	Metade	95(10)	100(0)	90(20)	95(10)
	Dobro	95(10)	100(0)	90(12.25)	100(0)
Testemunha		0(0)	-	-	-

^aMédia do tratamento em 20 fragmentos (Desvio Padrão)

Germinação de ascósporos de C. miconiae após tratamento dos estromas com cloro

Não foi observada germinação de ascósporos quer nas folhas destacadas quer nas gotas pendentes, indicando que o cloro usado do modo testado tem efeito deletério sobre *C. miconiae*. A germinação em gotas pendentes do material não tratado foi, em média, de 10%.

Intensidade da acne negra no campo

Avaliaram-se a incidência e severidade da doença e obtiveram-se as variáveis climáticas registradas no período de avaliação em Viçosa-MG e Dionísio-MG (Figuras 4 e 5, respectivamente).

Em Viçosa-MG, não se obteve correlação da incidência da Acne Negra e qualquer das variáveis climáticas estimadas (temperatura, umidade relativa e precipitação) durante o período de avaliação. Entretanto, detectou-se correlação negativa da severidade com a temperatura (r variou de -0,51 a -0,84).

Em Dionísio-MG, a incidência da doença correlacionou-se negativamente à temperatura (r variou de -0,51 a -0,82).

Ocorrência do anamorfo e de hiperparasitas de C. miconiae

Os dados referentes à ocorrência do anamorfo e do hiperparasita durante o período de avaliação estão representados na Figura 5.

A incidência do anamorfo de *Cocodiella miconiae* e a incidência de hiperparasitas sobre estromas de *C. miconiae* não foram correlacionadas a quaisquer das variáveis climáticas estimadas.

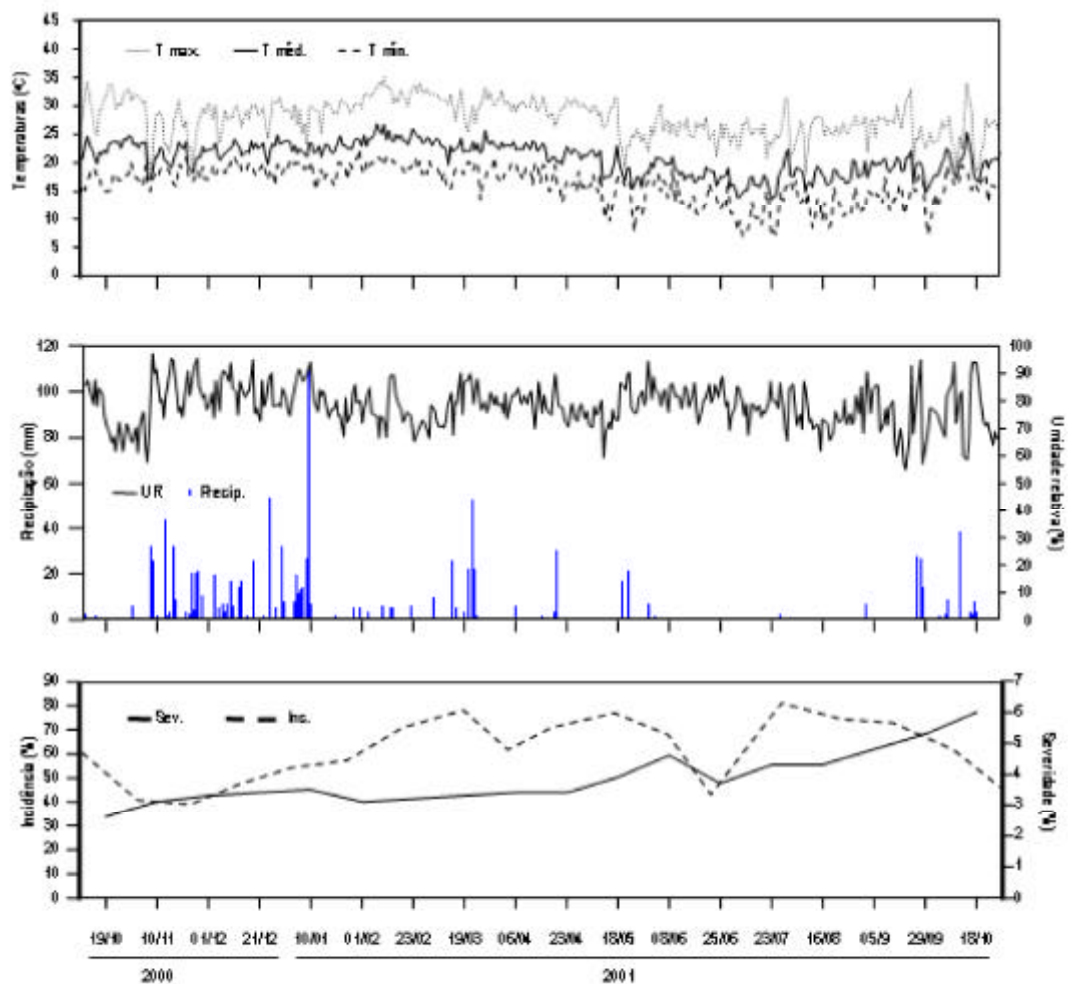


Figura 4. Variáveis climáticas registradas em Viçosa-MG no período de outubro de 2000 a outubro de 2001, progresso da acne negra causada por *Coccolidiella miconiae* em *Miconia calvenscens* no mesmo período.

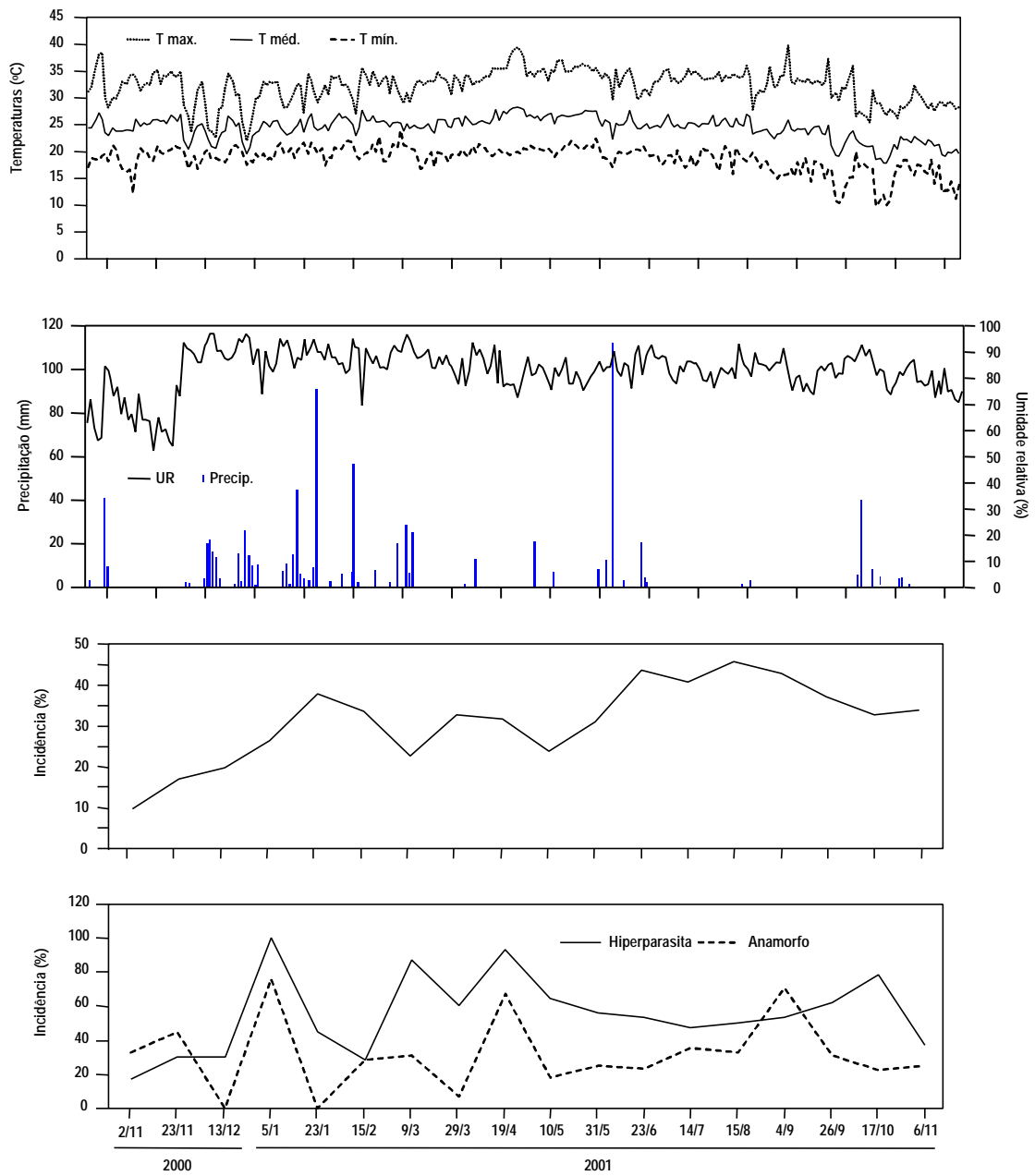


Figura 5. Variáveis climáticas registradas em Dionísio-MG, progresso da acne negra causada por *Miconia calvescens*, freqüência do anamorfo do fungo e de hiperparasitas sobre estromas de *Cocodiella miconiae*.

Discussão

Embora existam diversas espécies de *Cocodiella* descritas, inclusive associadas a melastomataceas (Katumoto, 1968), não há na literatura estudos sobre sua biologia e sobre as condições favoráveis para desenvolvimento do ciclo de vida e da doença. Portanto, os trabalhos aqui desenvolvidos não têm paralelo na literatura para auxiliar na interpretação e na discussão dos resultados obtidos. Vale lembrar que um dos objetivos do trabalho é exatamente gerar conhecimento básico sobre o fungo em questão. Portanto este é um trabalho essencialmente exploratório.

No campo, os sintomas da doença sempre estiveram associados à presença de estruturas do fungo *C. miconiae*, mas as inoculações sob condições controladas não resultaram em sintomas da doença. Apesar disso, não se tem dúvida de que *C. miconiae* seja o agente causal da acne negra, pois material enviado ao Havaí (HDOA) infectou as plantas do biotipo local, embora não tenham produzido estromas.

Tendo em vista o triângulo de doenças, três condições são indispensáveis para que ocorra doença: o hospedeiro deve ser suscetível, o patógeno deve ser virulento e estar em concentração de inóculo adequada e o ambiente deve ser favorável à infecção. Assim, a não ocorrência de doença nas condições deste trabalho pode ter sido por limitação de um ou mais destes fatores. O mais provável é que o ambiente tenha sido limitante para que ocorresse infecção, e alguma condição importante para a infecção provavelmente não foi fornecida. As plantas do biotipo do Brasil utilizadas na inoculação foram obtidas por estaquia, a partir de plantas da região de Viçosa-MG e de Dionísio-MG, locais onde a acne negra ocorre durante todo o ano, portanto, é praticamente certo que se tratavam de plantas suscetíveis ao patógeno. O inóculo utilizado foi preparado a partir de folhas infectadas recém-colhidas na região de Viçosa-MG, portanto, dificilmente não se trataria de uma população virulenta.

Outra possibilidade é a existência de especialização fisiológica de *C. miconiae*. Talvez as plantas inoculadas do biotipo do Brasil e do Havaí não fossem suscetíveis às aquelas populações do patógeno utilizada na inoculação. No campo, numa mesma área encontram-se plantas com alta intensidade de

doença e outras com baixa intensidade e até mesmo plantas que não apresentam sintomas da acne negra. Assim, é provável que as plantas e/ou o biotipo inoculado não foram compatíveis com o material genético inoculado. Vale ressaltar que como *M. calvescens* é uma planta selvagem, está em sua região de origem e apresenta fecundação cruzada, pode apresentar ampla variabilidade genética. Deste modo, a possibilidade de que *C. miconiae* não seja o patógeno responsável pela acne negra está afastada por várias razões: o fungo é reconhecidamente fitopatogênico e já foi relatado em diversas melastomatáceas, está sempre associado aos sintomas da doença e ocorreu infecção de plantas inoculadas em condições controladas no Havaí.

O material de *Miconia calvescens* infectado por *Cocodiella miconiae* enviado ao Havaí foi utilizado como inóculo. Plantas do biotipo do Havaí foram inoculadas por meio de aspersão de suspensão de ascósporos. Os primeiros sintomas apareceram três semanas após a inoculação, mas não houve formação de estromas, mesmo decorridos três meses da inoculação. O mesmo aconteceu quando plantas do Havaí foram colocadas em câmaras, juntamente com plantas do biotipo do Brasil infectadas por *C. miconiae*.

Cocodiella é um fungo pertencente ao filo Ascomycota, ordem Phyllachorales, família Phyllachoraceae. Também pertencem a esta família fungos do gênero *Phyllachora* (Hawksworth et al., 1995). Para *Phyllachora*, há alguns estudos na literatura sobre condições que influenciam ejeção, germinação de ascósporos, formação de apressórios, infecção, etc. (Orton, 1956; Parbery, 1963; Dittrich et al., 1991). Alguns resultados relatados por estes autores são semelhantes aos obtidos para *C. miconiae* neste estudo.

Para as espécies de *Phyllachora* associadas a gramíneas a umidade relativa alta é um fator importante para que ocorra a liberação dos ascósporos (Parbery, 1963). O autor não avaliou o efeito de temperatura. Para *C. miconiae* além da umidade, a temperatura também foi um fator importante na liberação de ascósporos. A 35°C acelerou-se o início da ejeção de ascósporos, mas após 12 horas o número de esporos ejetados, que era elevado, foi semelhante ao número a 25°C. Temperaturas mais baixas resultaram no retardamento do processo, a 5 e 15°C, a ejeção iniciou-se após 8 horas e mesmo após 48 horas o número de esporos ejetados ainda era baixo. Uma consequência prática da observação destes resultados é que a preservação

imediate de *C. miconiae* sob temperaturas mais baixas após sua coleta no campo é necessária para que o estoque de ascósporos nos peritécios não seja perdido prematuramente antes da chegada ao local de destino para inoculação em plantas-alvo.

Pelos resultados dos primeiros testes de germinação de ascósporos sobre folhas destacadas, a luz é um fator importante na germinação de ascósporos de *C. miconiae*. Entretanto, a germinação foi muito baixa e só ocorreu quando as folhas inoculadas foram mantidas sob fotoperíodo de 12 horas. Na condição de escuro constante não se observou nenhum esporo germinado. Na maioria dos trabalhos feitos com *Phyllachora* spp. não se testaram regimes de luz, mas nos testes feitos por Dittrich et al. (1991) com *Phyllachora maydis* a condição de fotoperíodo de 12 horas sempre esteve presente.

Maiores índices de germinação ocorreram quando se utilizou a técnica da gota invertida. Fato similar foi observado em *Phyllachora maydis* (Dittrich, 1991). O autor comenta que essa técnica simula melhor o processo natural de germinação de esporos, e que é mais conveniente e precisa do que outros métodos. Entretanto, para *C. miconiae*, provavelmente outros métodos precisam ser testados para se obter boa germinação de esporos.

Tentou-se aumentar o percentual de germinação de ascósporos, pois suspeitava-se de que houvesse algum tipo de dormência causando os baixos níveis de germinação. Em um teste preliminar, efetuou-se tratamento térmico de suspensões de ascósporos a 45-60°C durante 5 a 30 minutos, mas os percentuais de germinação obtidos foram nulos. Nos testes seguintes, usando temperaturas mais baixas, obtiveram-se melhores resultados, indicando que o fungo pode necessitar de um período com temperatura baixa para que a germinação de esporos ocorra e seja estimulada. Quando folhas com os ascostromas foram mantidas a 5°C por dois dias, a germinação passou de 14 para 16,5% (ascostromas grandes) em relação à testemunha. Entretanto, com 4 dias a germinação caiu para 5%, o que sugere que o período de pré-tratamento nessa temperatura não pode ser prolongado. No teste de preservação, os ascósporos obtidos a partir de ascostromas submetidos a 10°C apresentaram bom índice de germinação (32,5%) em relação à testemunha (46,8%) mesmo após 6 dias. Assim, é indispensável estudar o efeito da

temperatura na germinação de ascósporos e nas diferentes fases do ciclo de vida de *C. miconiae* pois, aparentemente, este fator é crítico para este processo.

Em teste preliminar, avaliou-se a eficiência da técnica da gota pendente sob várias temperaturas (10, 15, 20 22 e 25°C). Neste teste, a faixa ótima para germinação em *C. miconiae* pode ser de 20 a 22°C, comportamento diferente de espécies de *Phyllachora*. Para *Phyllachora* spp. associadas a gramíneas, a faixa ótima de temperatura para germinação é de 14 a 30°C (Parbery, 1963). Resultado semelhante foi encontrado para outras espécies do gênero (Orton, 1924, 1956); para *P. maydis*, o ideal está entre 10 e 20°C (Dittrich et al., 1991). Em gotas pendentes, após 4 horas já se observava germinação de ascósporos de *C. miconiae* a 10-25°C porém a freqüência era maior a 20-22°C. Os ascósporos germinados eram um pouco maiores, com comprimento de 8-16µm, sendo que o comprimento de um ascósporo normal (não germinado) é de 7-12µm, mas ao contrário de *Phyllachora punctum* (Orton, 1956) não mudam de forma.

Não foi observada a formação de apressório em *C. miconiae*, pois ascósporos a 20°C após 12 horas apresentavam tubos germinativos com 45µm de comprimento, 3 a 6 vezes maiores que o comprimento do ascósporo e não apresentavam apressório. Talvez seja necessário aumentar o tempo de avaliação para verificar a formação de apressórios em *C. miconiae*. Parbery (1963) e Dittrich et al. (1991) observaram a formação de apressórios após 48 horas para *Phyllachora* spp. associadas a gramíneas e para *P. maydis* respectivamente.

Os índices de germinação de ascósporos provenientes de ascostromas maiores foram superiores aos de ascósporos de ascostromas menores. Isto deve ocorrer em função do fato dos ascostromas maiores estarem maduros

Orton (1924, 1956) e Parbery (1991) notaram que os ascósporos de *Phyllachora* spp. germinavam enquanto ainda estavam no interior das ascas. Neste trabalho, este fato também foi observado para *C. miconiae*, e os tubos germinativos passavam através da parede das ascas. Isto pode ser uma simples resposta dos ascósporos ao método aplicado para a sua extração do interior dos estromas.

Resumindo, ascósporos de *C. miconiae* são liberados na presença de umidade e a temperaturas de 25-35°C; a germinação é favorecida por temperaturas de 20-22°C, fotoperíodo de 12 horas e água livre, como a maioria dos fitopatógenos (Campbell e Madden, 1989). Os ascósporos germinam mesmo estando ainda no interior das ascas. Entretanto, estudos mais detalhados, com populações maiores, são requeridos para definir bem os efeitos da temperatura em *C. miconiae*.

Durante as avaliações da acne negra no campo foi observado que é muito comum, por vezes até generalizada, a ocorrência de hiperparasitas sobre os estromas de *C. miconiae*, o que exige cuidados de limpeza antes de uma possível introdução do fungo no Havaí ou outra região. Tentou-se o controle químico desses micoparasitas, mas sem sucesso. Os produtos que apresentaram melhor resultado foram o benomyl e o cloro e, como os resultados com o cloro foram superiores, este foi o produto escolhido para estudos posteriores. Porém, quando estromas de *C. miconiae* foram tratados com o cloro, a germinação de ascósporos foi completamente inibida, indicando que o produto teve efeito deletério sobre o fungo nestas condições. O tempo de tratamento e dose poderiam ainda ser modificados em novos testes. Outros tratamentos dos estromas por formas físicas, como temperatura ou exposição a raios ultravioleta poderiam ainda ser tentados .

Os estudos de campo para avaliação da intensidade da doença foram conduzidos em áreas onde tanto a planta quanto o fungo já ocorriam naturalmente. Tanto em Viçosa-MG quanto em Dionísio-MG a doença ocorre durante todo o ano, mas em Viçosa, de maneira geral, as plantas parecem mais infectadas por *C. miconiae*. Assim, no início das avaliações em Viçosa a incidência da acne negra estava com valor relativamente alto (60,5%), enquanto em Dionísio o valor inicial foi mais baixo (9,6%). Em Viçosa, a incidência apresentou alguns picos, o primeiro em 19/06/2000 correspondente à condição de umidade relativa em torno de 70-75% e temperatura média em torno de 20°C. Na avaliação seguinte (08/04/2001) registrou-se uma queda na incidência. Na ocasião foi notado que várias plantas estavam em fase de floração. Quando estão nesta fase, as plantas de *M. calvescens* deixam de emitir novas folhas, com isso o valor da incidência não só deixa de aumentar , como começa a diminuir já que as folhas mais velhas tendem a cair e não há

novas folhas para serem infectadas. Após esse período nota-se uma tendência de elevação da incidência. Outro pico de incidência ocorre em 23/07/2001, quando a maioria das plantas voltou a emitir novas folhas. Esse pico correspondeu a 75 a 80% UR e temperatura média em torno de 15°C. Essas observações estão de acordo com o que foi verificado em laboratório: temperatura parece ser um fator muito importante para *C. miconiae*, no qual a temperatura baixa (5°C/2dias) estimulou a germinação de ascósporos. Entretanto, como observado em geral em outros patossistemas, a fenologia do hospedeiro também é fator determinante no progresso de epidemias (Campbell e Madden, 1989).

A severidade da doença, em Viçosa-MG, tendeu a aumentar ao longo do ano, mas o valor máximo foi de 6% na última avaliação (18/10/2001). Como já observado, (Dinoor, 1981) “populações naturais de plantas co-evoluem não somente com seus patógenos mas também com seu ambiente”. Assim, provavelmente a severidade deve ser mais influenciada pelo fato de se estar avaliando em condições naturais. A doença ocorre, mas talvez devido ao equilíbrio patógeno-hospedeiro pré-existente, a área foliar mantém um nível baixo de infecção. Outro ponto é o fato de que o fungo é um parasita essencialmente biotrófico, e portanto, para sua sobrevivência, não lhe seria estratégico matar seu hospedeiro. Ademais, ainda por ser um ambiente selvagem, plantas de outras espécies servem como uma barreira à dispersão de inóculo e à aloinfecção. Assim, a infecção que ocorre numa planta deve ser resultado, principalmente de autoinfecção.

Apesar dos picos que ocorreram na incidência, não foi encontrada correlação entre a incidência de acne negra em *M. calvescens* em Viçosa-MG e as variáveis climáticas. Considerando que já exista uma situação de equilíbrio patógeno-hospedeiro, é provável que a fenologia da planta seja realmente a maior responsável pelas oscilações na incidência. Entretanto, talvez se detectassem maior número de correlações significativas se se tivessem sido registradas as condições microclimáticas. No estudo, utilizaram-se dados coletados em estação climática distante em torno de 5 Km do local de avaliação.

A correlação negativa entre severidade da doença e temperatura em Viçosa-MG é coerente com o que foi encontrado durante os testes de

laboratório: temperaturas mais baixas favorecem a germinação de ascósporos e portanto, provavelmente, favorecem o aumento da intensidade da doença no campo. A severidade tende a ser menos influenciada pela fenologia da planta, pois apesar de ocorrer queda de folhas, infecções secundárias podem ocorrer na mesma folha aumentando a área infectada.

Em Dionísio-MG, também se observam alguns picos nas curvas de progresso, mas a tendência da incidência foi de aumentar ao longo do ano, com valores menores que os de Viçosa. O primeiro pico na incidência (37,8%) foi em 23/01/2001, umidade relativa acima de 80%, temperatura média em torno de 20-25°C. Após esse pico, a incidência começou a cair, pois a floração das plantas estava iniciando-se. O segundo pico (43,4%) e o terceiro pico (45,8%) ocorreram quando as variáveis climáticas apresentaram valores semelhantes aos do primeiro pico. O segundo pico coincidiu também com uma perda de 50% dos ramos que estavam sendo avaliados e o terceiro com uma remarcação dos ramos. Observou-se correlação negativa da incidência com a temperatura, o que reforça a importância da temperatura na infecção por *C. miconiae*.

A incidência do anamorfo de *C. miconiae* (*Hemidothis* sp.) foi verificada durante todo o ano, mas variou bastante, apresentando diversos picos durante o período: janeiro, março, abril e outubro. No período de maio a setembro a variação foi menor. A incidência de *Hemidothis* sp. não se correlacionou com nenhuma das variáveis climáticas. Embora tenha ocorrido durante todo o período de avaliação, a ocorrência do anamorfo não é tão comum como do teleomorfo. A incidência de hiperparasitas sobre estromas de *C. miconiae* seguiu tendência parecida com a do anamorfo, apresentando picos em janeiro abril e setembro. A incidência de micoparasitas também não se correlacionou com as variáveis climáticas.

Este estudo, essencialmente exploratório, forneceu algumas indicações dos fatores que devem ser melhor investigados em trabalhos posteriores: estudos mais detalhados sobre a influência da temperatura – teste de outras condições de incubação para plantas inoculadas artificialmente; no campo, avaliar novamente e por período mais longo a intensidade da doença, mas dessa vez registrando condições microclimáticas; estudos com populações do patógeno oriundas de áreas e regiões diferentes para que se possa verificar a

existência de especialização fisiológica. Assim, para que *C. miconiae* possa ser explorado como agente de biocontrole, as interações no triângulo de doença têm que ser melhor determinadas, como ocorre com qualquer fitopatógeno.

Agradecimentos

O trabalho foi realizado com apoio financeiro do convênio RCUH-FUNARBE e do CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Os autores agradecem ao Dr. Laércio Zambolim e ao Dr. Onkar dev Dhingra pelas sugestões; à Fernanda Testa Monteiro pelo apoio na execução do trabalho e à Companhia Agrícola Florestal Santa Bárbara LTDA. (CAF) por ter permitido que parte do trabalho fosse desenvolvido em sua propriedade.

Referências

- Bruzzese, E. and S.A. Hasan. 1983. A whole leaf clearing technique for host specificity studies of rust fungi. *Plant Pathology* 32: 335-338.
- Csurhes, S. M. 1997. *Miconia calvescens* DC. (*Melastomataceae*) a potentiality invasive plant in Australia's tropical and sub-tropical rainforests. Proceedings First Regional Conference on *Miconia* Control, Papeete, Tahiti, august.
- Csurhes, S. M. and R. Edwards. 1998. *Potential environmental weeds in Australia*. Environmental Australia Biodiversity Group, Canberra.
- Dinoor, A. Epidemics caused by fungal pathogens in wild and crops plants. In: J.M. Thresh (ed), *Pest, pathogens and vegetation*. Pitman Advanced Publishing Program, Boston. Pp.143-158.
- Dittrich, U., J. Hock, J. Kranz and B.L. Renfro. 1991. Germination of *Phyllachora maydis* ascospores and conidia of *Monographella maydis*. *Cryptogamic Botany* 2(2/3):214-218.
- Harley, K.L.S. and I.W. Forno. 1992. *Biological control of weeds, a handbook for practioners and students*. Inkata Press, Melbourne.
- Katumoto, K. 1968. On the genus *Coccodiella* Hara. *Journ. Jap. Bot.* 43(9):277-283.

- Meyer, J. Y. and J. Florence. 1996. Tahiti's native endangered by the invasion of *Miconia calvenscens* DC. (*Melastomataceae*). *Journal of Biogeography* 23:775-781.
- Meyer, J. Y. and J.P. Malet. 1997. *Study and management of the alien invasive tree Miconia calvenscens DC. (Melastomataceae) in the islands of Raiatea and Tahaa (Society Islands, French Polynesia): 1993-1996*. Cooperative National Park Resources Studies Unit University of Hawai'i at Manoa, Manoa, Hawaii. (Technical Report 111)
- Meyer, J.Y. 1996. Status of *Miconia calvenscens* (*Melastomataceae*), a dominant invasive tree in the Society Islands (French Polynesia). *Pacific Science* 50(1): 66-76.
- Meyer, J.Y. 1998a. Observations on the reproductive biology of *Miconia calvenscens* DC. (*Melastomataceae*), an alien invasive tree on the island of Tahiti (South Pacific Ocean). *Biotropica* 30(4): 609-624.
- Meyer, J.Y. 1998b. Polynesia's green cancer. *World Conservation* 2:7.
- Orton, C.R. 1956. The morphology and life history of *Phyllachora punctum*. *Phytopathology* 46(8):441-444.
- Orton, C.R. 1924. Studies in the morphology of the ascomycetes I. The estroma and the compound frutification of the Dothideaceae and others groups. *Mycologia* 16(1):49-95.
- Parbery, D.G. Studies on graminicolous species of *Phyllachora* Fckl. *Aust. J. Bot.* 11:117-130.
- Schroeder, D. 1983. Biological control of weeds. In: Fletcher, W.W. (ed.) Recent advances in weed research, CAB Publication, 42-78.
- Vitousek, P.M. 1994. Beyond global warming: ecology and global change. *Ecology* 75(7): 1861-1876.

Micoparasitas de *Coccodiella miconiae* em *Miconia calvescens* (Melastomataceae)

Claudine D.S. Seixas¹, Robert W. Barreto¹ & José Luiz Bezerra²

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 36.571-000 Viçosa, MG, Brasil; ² CEPLAC/CEPEC/SEFIT, Caixa Postal 7, 45.600-000, Itabuna, BA, Brasil

Resumo

Levantamentos exploratórios de fitopatógenos associados a *M. calvescens* para uso em controle biológico apontaram o fungo *Coccodiella miconiae* (no Brasil, Equador e Costa Rica) como tendo potencial para este fim. Observou-se também, no campo e no laboratório, a ocorrência de intenso e variado micoparasitismo dos estromas de *C. miconiae*. A presença destes fungos pode comprometer tentativas de introdução e a eficiência de *C. miconiae* como agente de controle biológico. O esclarecimento da identidade destes fungos foi o propósito deste trabalho. Folhas de *M. calvescens* infectadas por *C. miconiae* foram coletadas em Viçosa-MG, Dionísio-MG e no Equador. Os estromas de *C. miconiae* foram observados ao microscópio estereoscópico e os fungos encontrados sobre os estromas foram identificados. Os fungos encontrados com maior frequência foram: *Sagenomella alba* var.nov. *synematos*a; *Sagenomella dimorphica*; *Cladosporium oxysporum*; *Corynespora cassiicola*; *Redbia annulata* sp.nov. e *Paranectriella juruana*.

Palavras-chave: hiperparasitas, *Coccodiella miconiae*, controle biológico de plantas invasoras

Introdução

Miconia calvescens DC. é uma planta nativa da América do Sul e Central e, em outras regiões do mundo, particularmente em ilhas oceânicas, se tornou uma invasora que tem ameaçado a existência de ecossistemas inteiros (3, 10, 15, 17, 18, 19, 20).

Para casos como os das invasões biológicas de *M. calvescens*, o biocontrole é considerado a melhor, senão a única alternativa viável de controle

por causa do alto grau de invasão e o difícil acesso em muitas áreas invadidas (18).

Em 1995 iniciou-se um levantamento dos patógenos associados a *M. calvescens* em vários países das Américas do Sul e Central. Durante esse trabalho o fungo *Coccodiella miconiae* (Duby) Hino et Katumoto foi detectado associado a lesões foliares em *M. calvescens* no Brasil, Equador e Costa Rica. A doença foi denominada “Acne Negra” por causa dos estromas negros do fungo presentes na área lesionada, sempre na face abaxial das folhas e a presença de protuberâncias amareladas na face adaxial. No Equador e na Costa Rica o fungo foi encontrado associado ao biotipo de *M. calvescens* que possui folhas bicolors, responsável pelas introduções e invasão no Havaí e Taiti, e ao biotipo brasileiro que possui folhas menores e com as duas faces verdes.

Em condições naturais a doença causada por *Coccodiella miconiae* pode ser muito severa e desde a sua detecção este fungo tem sido considerado potencial agente de biocontrole de *M. calvescens*. Isto ocorre a despeito dos níveis elevados de parasitismo que têm sido observados sobre este fungo. Apesar das evidências de ataque de artrópodes aos estromas do fungo, o parasitismo por outros fungos parece ser o mais relevante. Várias espécies de fungos foram encontrados associados a estromas de *C. miconiae*. Tentativas de se manter colônias de *C. miconiae*, que é parasita obrigatório, em plantas vivas em quarentena no Havaí (HDOA-Quarantine Lab) falharam em virtude do ataque devastador de um destes micoparasitas, preliminarmente identificado como *Acremonium* sp. O papel limitante de micoparasitas sobre populações de fungos fitopatogênicos é bem conhecido e muitos estudos têm sido feitos visando a aplicação como agentes de controle biológico em patossistemas como: mofo cinzento de rosáceas (29, 30), vassoura-de-bruxa do cacauero (25), tombamentos e podridões (2, 5, 13, 22, 32) e outros. Estes estudos abordam sempre a perspectiva útil destes fungos. A nocividade de micoparasitas é amplamente reconhecida na produção de cogumelos (28).

A abordagem deste estudo envolve um outro aspecto indesejável e pouco explorado deste grupo de fungos. A presença desses micoparasitas pode comprometer novas tentativas de introdução desse fungo como agente de controle biológico de *M. calvescens* e sua eficiência de biocontrole.

O esclarecimento da identidade destes fungos é o propósito deste trabalho e é condição importante para que um método de controle possa ser proposto.

Material e métodos

Durante doze meses (de outubro de 2000 a novembro de 2001), folhas de *M. calvescens* foram coletadas em Dionísio-MG, na área da Companhia Agrícola Florestal Santa Bárbara Ltda. (CAF), num local conhecido como “Balsa Velha” ou “Retirante”, em intervalos de três semanas, para a observação da incidência de fungos associados aos estromas de *C. miconiae*. Algumas coletas independentes feitas no Brasil e no Equador foram incluídas neste estudo.

No laboratório, cada estroma presente nessas folhas foi examinado ao microscópio estereoscópico e quando detectada a presença de algum fungo sobre o estroma, lâminas semi-permanentes foram preparadas através de raspagens e, ou cortes em lactofenol para observação ao microscópio ótico. Também foram feitos isolamentos diretos, a partir das estruturas do fungo presentes sobre os estromas, em placas de Petri contendo meio de Caldo de Vegetais-Ágar (CVA) (23). As placas foram mantidas em incubadora a 25°C no escuro. Esses fungos foram preservados em sílica-gel conforme descrito por DHINGRA et al. (4).

Microculturas foram montadas a partir das culturas obtidas, para observação de maiores detalhes da morfologia. Essas lâminas juntamente com aquelas preparadas a partir de material fresco foram usadas para medir as estruturas e preparar ilustrações dos fungos. As ilustrações foram feitas com o auxílio de câmara clara acoplada a microscópio ótico Leika Laborlux.

Culturas em meio CVA-Caldo de vegetais-Ágar (23) e BDA, na condições de luz e escuro também foram descritas.

Resultados e discussão

Durante o período de avaliação, seis espécies de fungos foram encontradas com maior frequência associadas a estromas de *C. miconiae*. Os fungos encontrados são descritos abaixo:

Sagenomella alba Gams & Söderström var.nov. ***synematosa*** (Figuras 1 e 2)

Micélio externo formado sobre os estromas de *C. miconiae* e espalhando-se também sobre a superfície da folha em volta da lesão, composto de hifas ramificadas, hialinas, septadas, formando abundantes fiálides em sua superfície, apresentando gotas terminais de conídios mucilaginosos em montagem de material fresco, longas cadeias de conídios em microcultura. *Estromas* ausentes. *Conidióforos* ausentes. *Células conidiogênicas* fialídicas produzidas lateralmente sobre o micélio; enteroblásticas-fialídicas; filiformes, mais largas na base afinando em direção ao ápice; 27-57 x 1-3µm; hialinas. *Locus conidiogênicos* indistintos. *Conídios* mucilaginosos; catenulados formando cadeias basípetas; fusiformes a ovais; 3-4,5 x 1µm, ápice e base agudos; asseptados; hialinos; cicatriz conidial indistinta; egutulados; lisos.

Em cultura: Crescimento lento (2,5 a 2,8cm diâm. em 13 dias), apresenta em geral, micélio aéreo com aspecto cotonoso a flocoso denso, com a periferia úmida sem micélio aéreo, por vezes a colônia apresenta cordões densos com aparência mucilaginosa; coloração variando de branco a rosado, assim como o observado no reverso da colônia; esporulação abundante de aparência seca; zonação pouco perceptível.

Material examinado: VIC 22193; Dendrologia-UFV, Viçosa-MG, 17/08/2001

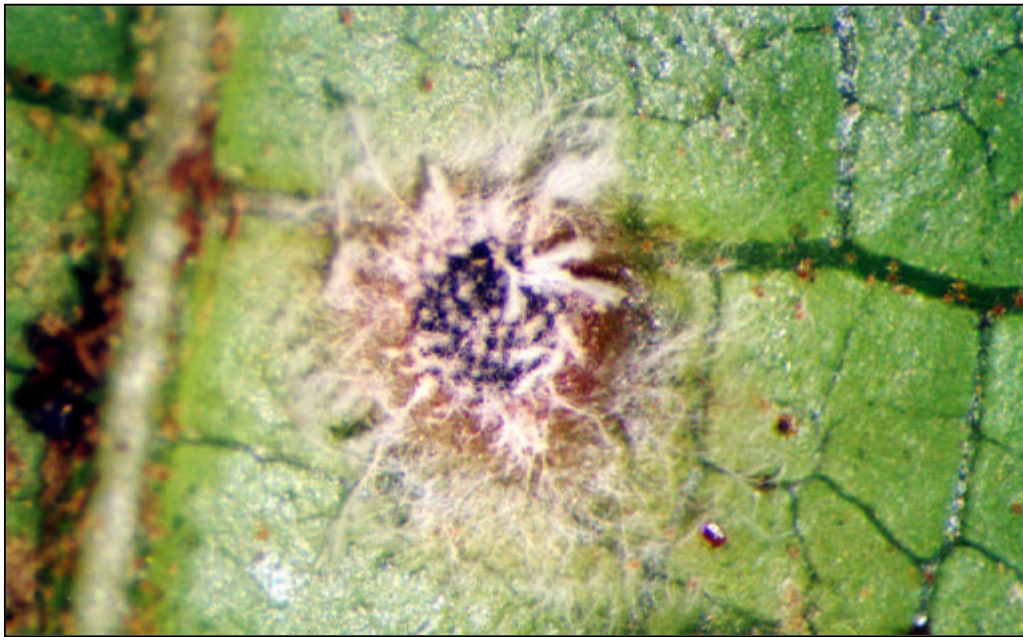


Figura 1. Estroma de Coccidiella miconiae parasitado por Sagenomella alba var. synematosa (19x).

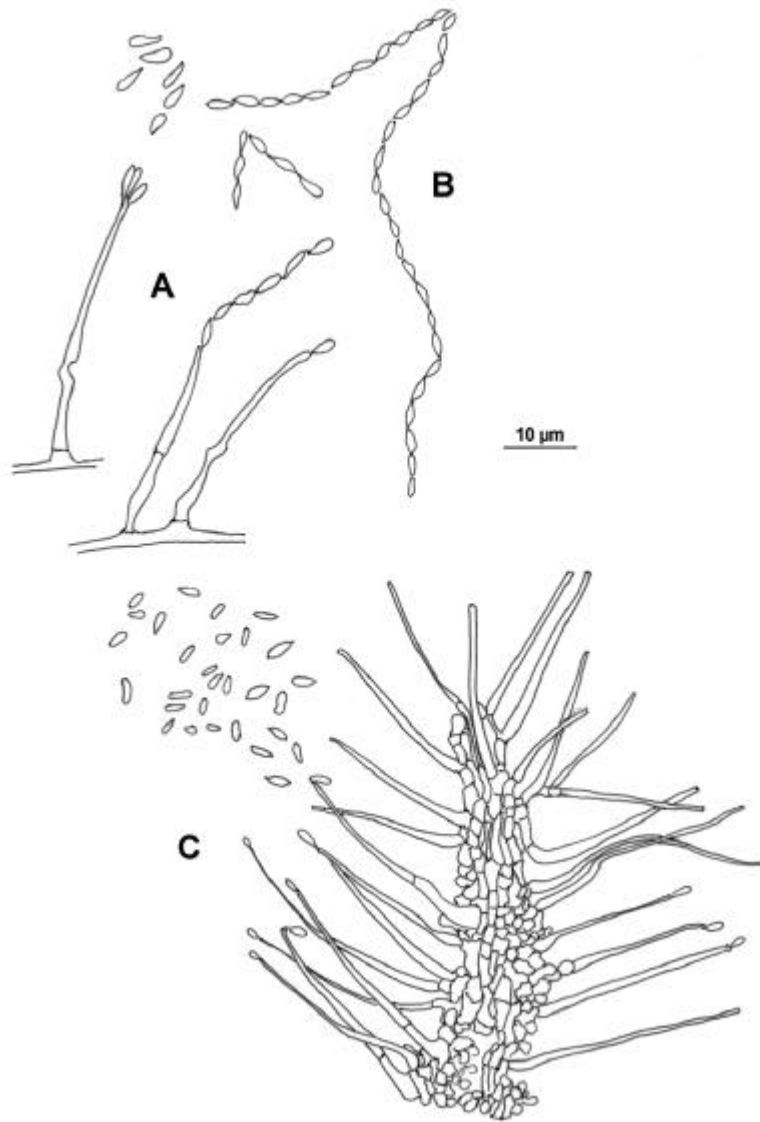


Figura 2. *Sagenomella alba* var. *synematosae*: fiálides com cadeias de conídios (A), cadeia de conídios (B), fiálides na superfície de cordões sinematosos e conídios (C).

Sagenomella dimorphica C.D.S. Seixas & R.W. Barreto **sp.nov.** (Figuras 3 e 4)

Ab *Sagenomella diversispora* (van Beyma) W. Gams, cellulae condiogena singularia, 25.0-65.0 x 2µm, hyalinae; a) conidia fusiformia, 3.0-6.0 x 1.5µm, hyalinae, laeves; b) conidia observe-ovalis, 3.0-6.0 x 2.0-3.0µm, hyalinae, laeves, differens.

Etim. Apresenta duas formas de conídios.

Micélio externo composto de hifas hialinas; septadas; ramificadas; superfície lisa. *Estromas* ausentes. *Células conidiogênicas* filídicas formadas isoladamente a partir do micélio; filiformes; 25.0-65.0 x 2.0 μ m; hialinas; lisas. *Locus conidiogênicos* terminais, diminutos. *Conídios* de dois tipos: a) mucilaginosos; catenulados formando cadeias basípetas; fusiformes; 3.0-6.0 x 1.0-1,5 μ m; asseptados; hialinos; egutulados; superfície lisa; b) secos; isolados; obovóides; 3.0-6.0 x 2.0-3.0 μ m; asseptados; hialinos; egutulados; superfície lisa (características dos conídios foram observadas em lâminas de microcultura).

Em cultura: Crescimento lento (1,8 a 3,5cm diâm. em 13 dias); área central de micélio aéreo e esparso, seguida de área relativamente extensa de micélio estritamente superficial com aspecto úmido, presença de porções deprimidas formando vincos partindo da área central e de depressão concêntrica formado halo extenso entre a porção central com micélio mais abundante e a periférica com micélio mais esparso. Coloração branca a rosada, tanto na superfície como no reverso; esporulação abundante; zonação diurna pouco perceptível.

Material examinado: VIC 22194, Dionísio-MG, 06/11/2001

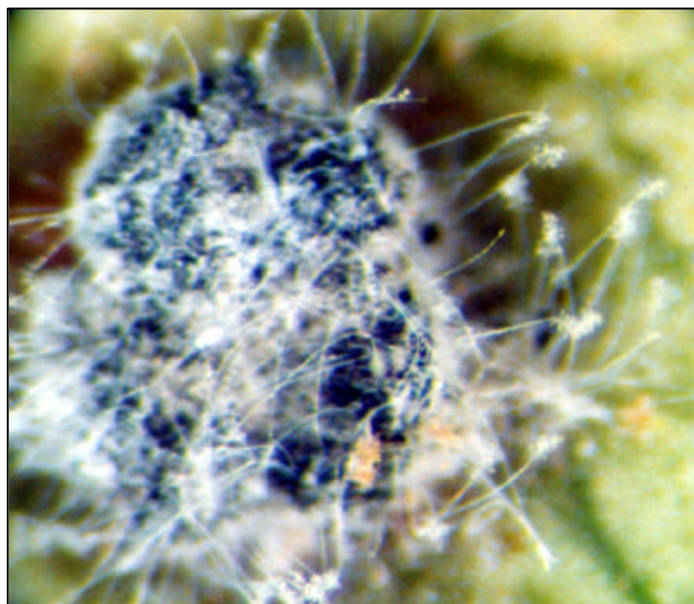


Figura 3. Estroma de *Coccidiella miconiae* parasitado por *Sagenomella dimorfica* (53x).

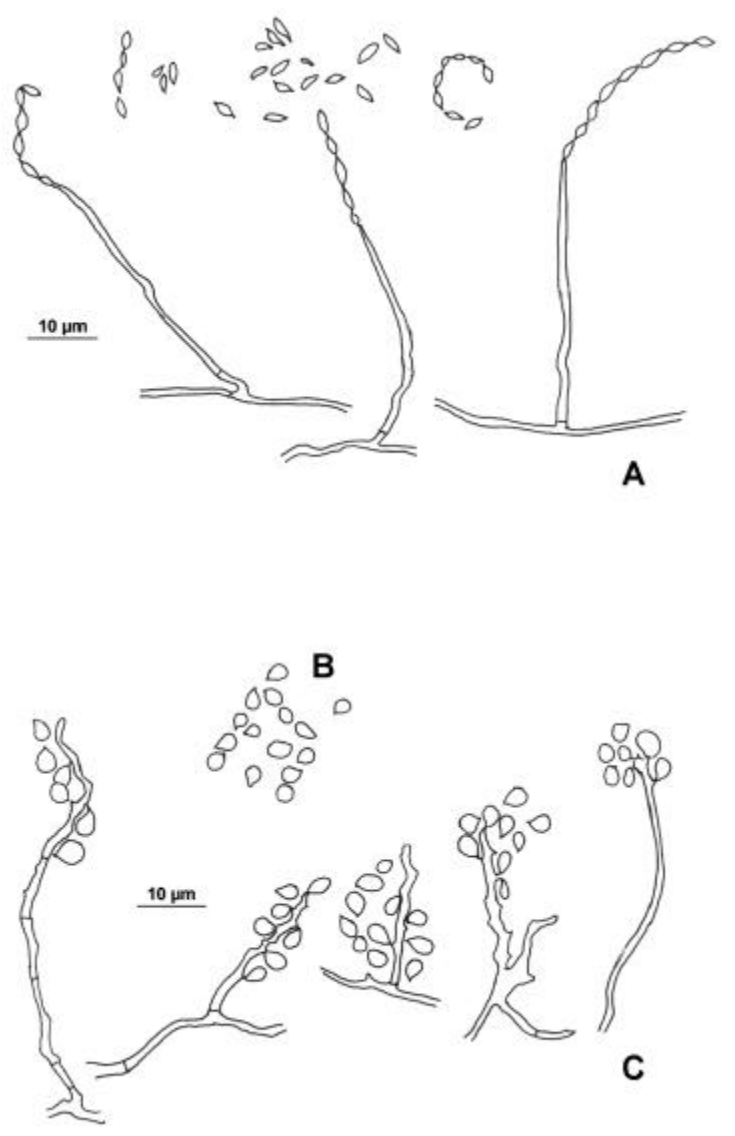


Figura 4. *Sagenomella dimorfica*: fiálides com cadeia de conídios fusiformes (A), conídios obovóides (B), fiálides com conídios obovóides (C).

Os fungos do gênero *Sagenomella* foram os mais freqüentemente encontrados sobre os estromas de *C. miconiae*. Na região de Viçosa-MG, na grande maioria das vezes, está presente *S. alba* var. *synematosa*. E, em Dionísio-MG o mais comum é *S. dimorfica*. O hiperparasitismo de *S. alba* var. *synematosa* parece ser favorecido pelo microclima, em algumas áreas em Viçosa-MG, a obtenção de um único estroma sadio é praticamente impossível.

O gênero *Sagenomella* foi criado por Gams (11) e é semelhante ao gênero *Acremonium*. Até o momento, há seis espécies descritas dentro de *Sagenomella*. Seguindo a chave proposta por Gams (11) o isolado de Viçosa-

MG (VIC 22193) pertence à espécie *S. alba*. Porém, o isolado apresenta cordões miceliais assemelhando-se a sinêmios, o que não está contemplado na descrição de *S. alba* apresentada pelo autor (11), assim parece mais adequado considerar o isolado de Viçosa como uma variedade de *S. alba*. Caso outras diferenças relevantes sejam encontradas entre *S. alba* e a variedade aqui descrita, caberá a elevação da variedade à categoria de espécie.

O isolado de Dionísio-MG (VIC 22194) é também morfologicamente similar a *S. alba*, seguindo-se a chave para espécies de *Sagenomella* (11). Todavia, na descrição de *S. alba* é mencionado que podem ser produzidos conídios fusiformes ou em forma de limão, mas não os dois tipos simultaneamente. Já uma outra espécie descrita por Gams (11), *S. diversispora* apresenta dois tipos de conídios porém estes são ornamentados. Portanto o isolado VIC 22194 não se encaixa bem em nenhuma das duas espécies, dessa forma parece mais conveniente nesse caso propor uma nova espécie: *S. dimorfica*.

Cladosporium oxysporum Berk & Curt *J. Linn. Soc.* 10(46): 362 (1868)
(Figuras 5 e 6)

Micélio externo ramificado; marrom claro; 2,5-5µm diâm.; septado; superfície lisa. *Estromas* ausentes. *Conidióforos* cilíndricos apresentando porções ligeiramente infladas ao longo do seu comprimento; ocasionalmente geniculados; apresentando proliferações enteroblásticas percorrentes; 210.0-440.0 x 5.0µm; 4-10 septos; não ramificados; castanhos; lisos. *Células conidiogênicas* terminais e intercalares; integradas; holoblásticas; subhialinas. *Locus conidiogênicos* conspicuos; 1-6/célula; protuberantes; espessados; escurecidos. *Conídios* secos; catenulados formando cadeias acrópetas; elipsóides a limoniformes, fusiformes ovóides, cilíndricos ou subcilíndricos; 3.0-17.0 x 2.0-3.0µm; 0-1 septo; cicatriz conidial ligeiramente espessada, escura; apresenta 1-4 cicatrizes proeminentes; subhialinos; egutulados; superfície lisa.

Em cultura: Crescimento lento (2,6 a 4,9cm diâm. em 13 dias); colônias pulverulentas com pontos pilosos e elevados; no centro comprimindo o meio

formando ondulações concêntricas ou que se irradiam a partir do centro; marrom-acinzentadas com tufo cinza e branco; reverso verde escuro a preto; esporulação abundante com aparência seca; zonação diurna pouco pronunciada.

Material examinado: VIC 22195; Dionísio-MG; 17/10/2001

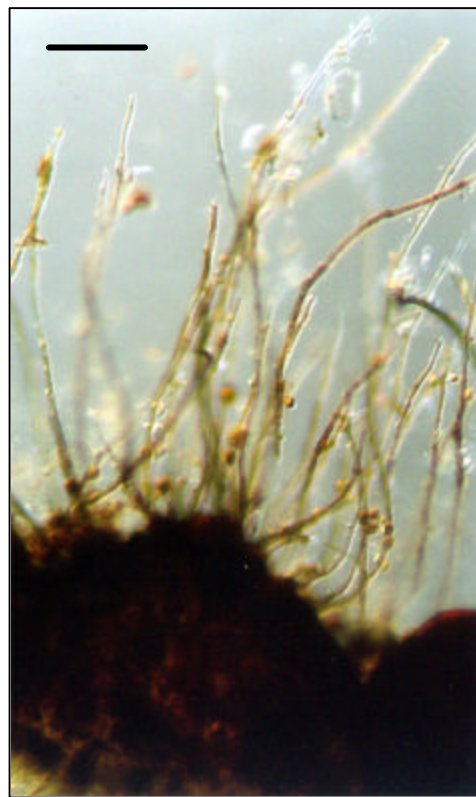


Figura 5. Conidióforos de *Cladosporium oxysporum* sobre estromas de *Coccidiella miconiae* (Barra= 20 μ m).

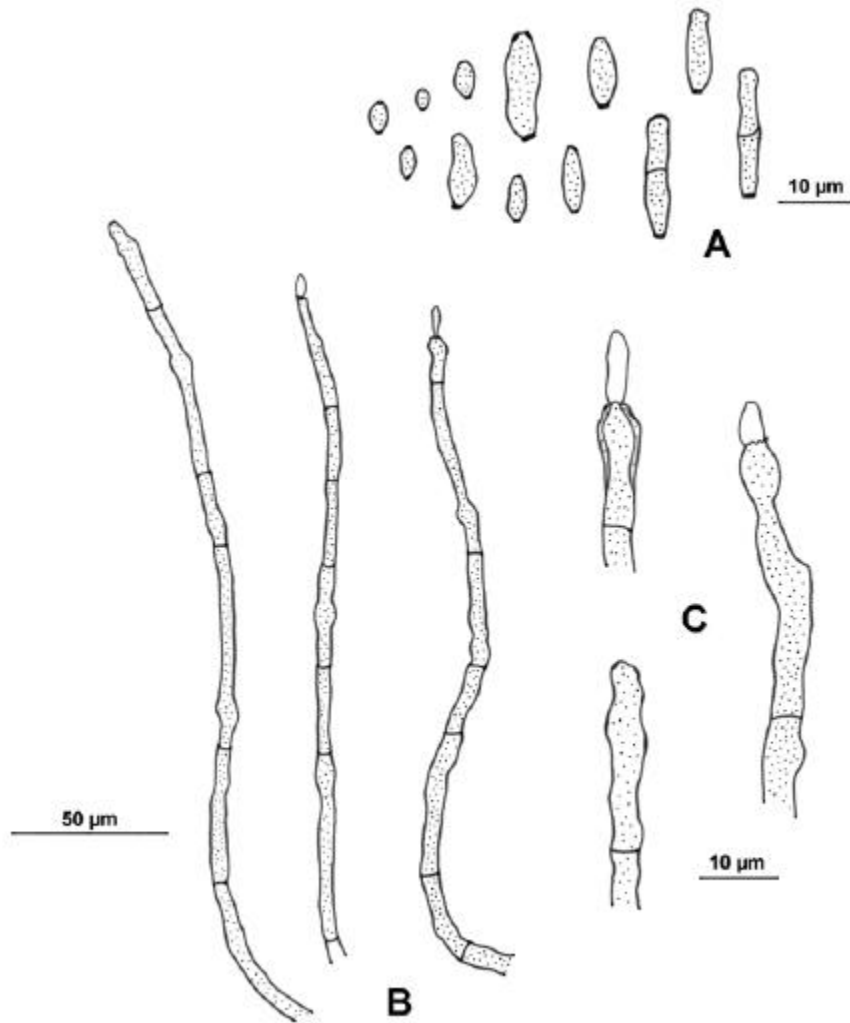


Figura 6. *Cladosporium oxysporum*: conídios (A), conidióforos (B), porção terminal dos conidióforos (C).

A comparação do isolado hiperparasita de *Cocodiella miconiae* (VIC 22195) com as espécies descritas por Ellis (7,8) indicou que a espécie de morfologia mais próxima é *C. oxysporum*. No entanto, as células conidiogênicas de *C. oxysporum* não são infladas e os conídios são maiores do que os observados no fungo VIC 22195. *Cladosporium oxysporum* é uma espécie comum e amplamente distribuída em tecido vegetal morto. Não foi encontrado relato deste fungo como micoparasita. O isolado foi enviado ao especialista no grupo para identificação, mas provisoriamente está sendo identificado como *Cladosporium oxysporum*.

Corynespora cassiicola (Berk. & Curt.) Wei *Mycological Papers* 34: 5 (1950)
(Figuras 7 e 8)

Micélio externo ausente. *Estromas* ausentes. *Conidióforos* presentes na superfície adaxial das folhas emergindo dos estromas de *C. miconiae*, formando uma cobertura rala acinzentada; isolados; retos a ligeiramente curvados; não ramificados; cilíndricos com a base relativamente inflada, podendo ser ligeiramente inflados nos pontos onde ocorreu proliferação percorrente; 0-2 porções infladas ou bulbosas; até 4 proliferações percorrentes; 99.0-199.0 x 4.0-10,5µm; 1-5 septos; coloração marrom por vezes passando a marrom claro próximo ao ápice; lisos. *Células conidiogênicas* tréticas, cilíndricas, 64.0-121,5 x 6,5-11,5µm, marrom claras; ocasionalmente com constrições no eixo do conidióforo sobretudo na base; proliferação percorrente. *Conídios* secos; catenulados formando cadeias acrópetas com 2-5 esporos em microcultura; obclavados a cilíndricos; 54.0-141.0 x 10,5-19.0µm; arredondados no ápice e truncados na base cujo diâmetro é 2,5-5.0µm; 4-11 pseudoseptos; cicatriz espessada, escura; marrom claros a subhialinos; egutulados; lisos.

Em cultura: crescimento rápido (9 cm diâmetro em 10 dias); micélio aéreo feltroso em BDA, lanoso em CVA, esparso quando cresce em fotoperíodo de 12 horas e denso no escuro; cinza claro a cinza, reverso de cinza escuro a preto; colônia com aspecto úmido; zonação diurna pouco perceptível; esporulação abundante.

Material examinado: VIC 22196, Dionísio-MG, 25/09/2001

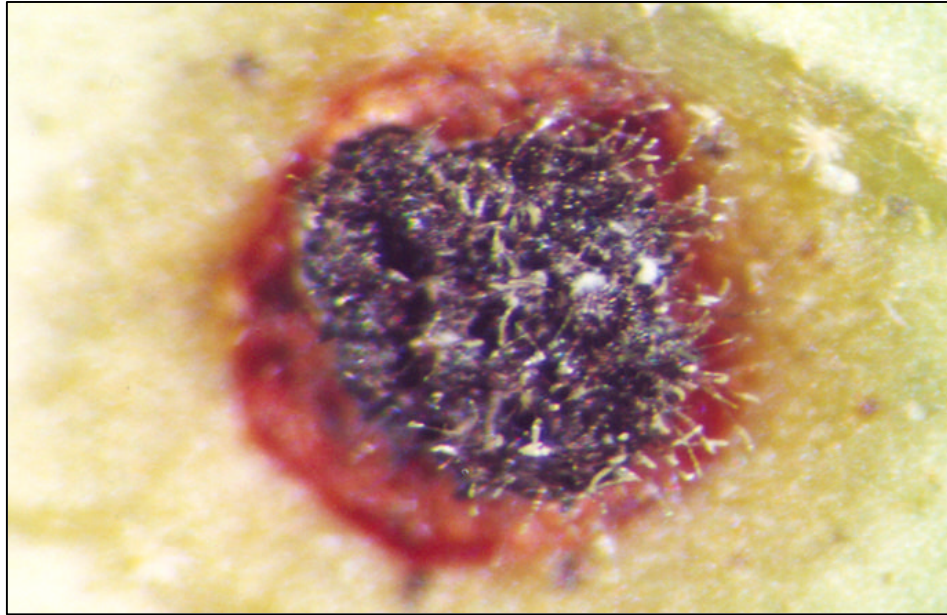


Figura 7. Estroma de *Coccidiella miconiae* parasitado por *Corynespora cassiicola* (48x).



Figura 8. *Corynespora cassiicola*: cadeia de conídios produzidos em microcultura (Barra= 50 μ m).

Corynespora foi o fungo de menor incidência como hiperparasita de *Coccidiella miconiae* durante o período de observação em Dionísio-MG.

As características do isolado obtido a partir de estromas de *C. miconiae* são bastante semelhantes às aquelas apontadas para *Corynespora cassiicola* (7) e diferem das descritas para outras espécies no gênero (6, 9, 16, 31). O comprimento de conídios e conidióforos observado para VIC 22196 se situa numa faixa inferior à descrita para *C. cassiicola*. Este, porém, é um caráter muito variável e não justificaria a segregação de um novo taxon.

Um estudo com isolados de *C. cassiicola* de 20 espécies de plantas de várias partes do mundo mostrou uma grande variação no tamanho dos conídios (21). Numa outra pesquisa a comparação entre os isolados de diferentes hospedeiros e localidades foi feita utilizando diferentes técnicas baseadas em PCR e ao final a conclusão foi de que não haviam diferenças genéticas detectáveis (26,27).

Redbia annulata C.D.S. Seixas & R.W. Barreto sp.nov. (Figuras 9 e 10)

Ab *Redbia puccinicola* Deighton & Pirozynski, conidiophora 15.5-61 x 2.0-4.0µm, 1-4 denticulatae conidia ad apicem rotundata, ad basem obconica vel rotundata, 6.5-15.5 x 3µm, verruculosa, differens.

Etim. Referência à protuberância em forma de anel que acompanha os septos.

Micélio externo ramificado; marrom claro; 1.5-3.0µm; septado; superfície lisa. *Estromas* ausentes. *Conidióforos* fasciculados ou produzidos isoladamente a partir do micélio superficial; ligeiramente curvados, por vezes sinuosos e geniculados; não ramificados; cilíndricos afinando abruptamente no ápice, 15,5-61.0 x 2.0-4.0µm; 0-6 septos; marrom claro, podendo chegar a quase hialino no ápice; lisos. *Células conidiogênicas* discretas; terminais e intercalares; holoblásticas; proliferação percorrente; raduliformes; 1-4 denticulos. *Conídios* secos; ápice arredondado e base obcônica a arredondada; 6,5-15,5 x 3.0µm; 1-3 septos (predominantemente 2 septos); subhialinos a acinzentados; cicatriz ligeiramente espessada, escura; egutulados, finamente verruculosos.

Em cultura: Crescimento muito lento (1,6 a 1,8cm diâm. em 13 dias), lanoso com estruturas semelhantes a setas e ocasionalmente estruturas sinematosas presentes; cinza, cinza escuro, cinza esverdeado ou castanho e reverso de coloração equivalente; zonação diurna ocasionalmente presente; sem esporulação.

Material examinado: VIC 22197, Dionísio-MG, 17/10/2001

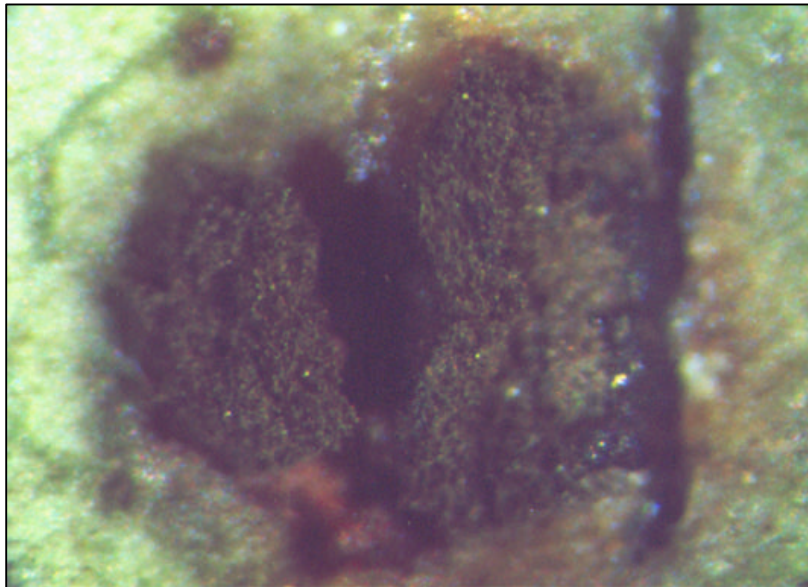


Figura 9. Redbia annulata sobre estroma de Cccodiella miconiae (62x).

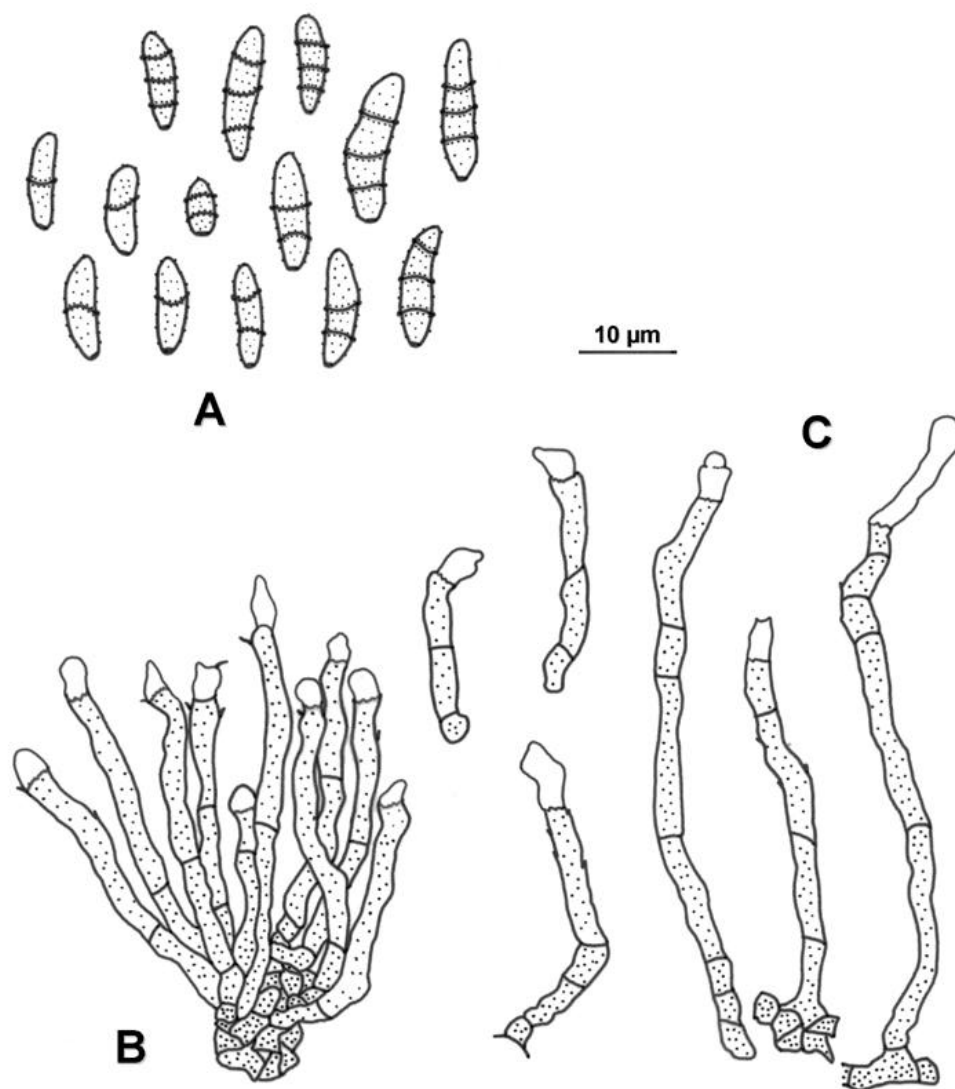


Figura 10. *Redbia annulata*: conídios (A), agrupamento de conidióforos (B), conidióforos isolados (C).

Há três espécies de *Redbia* descritas na literatura: *Redbia puccinicola* Deighton & Pirozynski que foi detectada em télias de *Puccinia holosericea* Cooke; *Redbia elegans* Pirozynski & Hodges (8) e *Redbia trichomambusta* R.W. Barreto (1). Aspectos da morfologia destes fungos e da nova espécie são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Características morfológicas de fungos do gênero *Redbia*.

Espécie	Conídios (c x l)	Conidióforos (c x l)	Superfície de conídios
<i>Redbia puccinicola</i>	10.0-22.0 x 3.0-4.5	>230.0 x 4.0-5.0	Lisa
<i>R. elegans</i>	15.0-35.0 x 4.0-5.0	>600.0 x 5.0-6.0	Verruculosa
<i>R. trichomambusta</i>	8.0-21.0 x 1.0-6.0	22.0-66.0 x 1.0-4.0	Lisa
<i>R. annulata</i>	6.5-15.5 x 3.0	15.5-61.0 x 2.0-4.0	Verruculosa

Além das diferenças observadas na Tabela 1, a superfície dos conídios de *R. annulata* é projetada na altura dos septos onde se observa uma ondulação em forma de anel que circunda os conídios. *Redbia annulata* e *R. puccinicola* são micoparasitas, enquanto *R. elegans* é um saprófita e *R. trichomambusta* foi encontrado associado a tricomas de *Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson, e as vezes, misturado a *Mycovellosiella perfoliata* (Ellis & Everh) Munt.-Cvetk.

Paranectriella juruana (Henn.) Henn. ex Piroz Kew Bull 31: 598 (1977) (Figuras 11 e 12) Syn. *Paranectria juruana* Henn. Hedwigia 43: 245 (1904)
Anamorfo: *Titaea acarifera* (Höhnelt) Damon J. Wash. Acad. Sci. 42: 367 (1952)

Micélio externo ausente. *Ascocarpos* pseudoperiteciais parcialmente imersos em um estroma composto de micélio frouxo branco cobrindo o estroma carbonáceo do fungo hospedeiro; subglobosos, textura angularis, parede com 10-13µm de espessura, células alongadas em seção longitudinal, 15.0 x 6.0µm; 150.0-310.0 x 50.0-300.0µm; deformados quando secos; brancos a amarelo claros; pêlos pseudoteciais abundantes, hifóides, cilíndricos, curvados a sinuosos, 0-2 septos, com porção terminal rombuda, 10.0-24.0 x 4.0-6.0µm. *Filamentos interciais*: pseudoparáfises filiformes, comprimento superior a 80.0µm, ramificadas, anastomosadas. *Ascas* bitunicadas; subclavadas; 60.0-80.0 x 9.0-10.0µm. *Ascósporos* bisseriados; elipsóides a fusiformes; 11.0-15.0 x 5.0-6.0µm; 3 septos; ligeiramente constrictos nos septos; hialinos; superfície lisa; apículo em ambas as extremidades, 5.0-6,5 x 1,5µm.

Material examinado: VIC 22198; Rio Pedra Fina, Equador; 10/05/2000

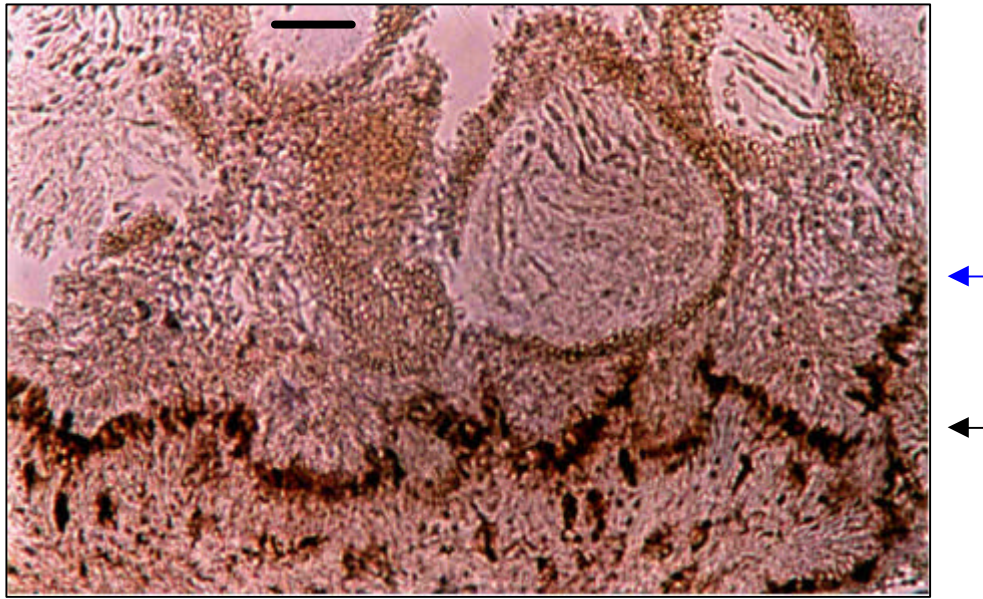


Figura 11. *Paranectriella juruana* (→) sobre estroma de *Cocodiella miconiae* (→) (Barra = 50 μ m).

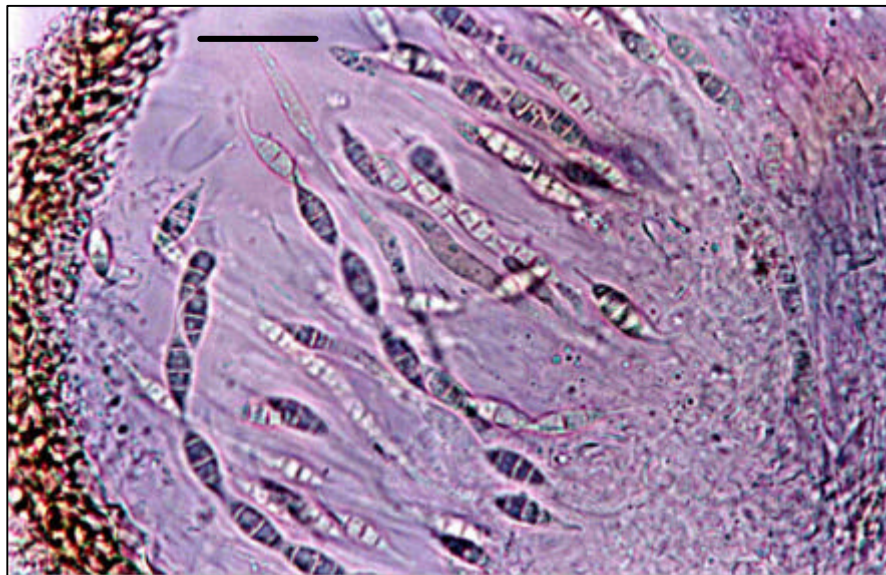


Figura 12. *Paranectriella juruana*: ascas e ascósporos (Barra = 20 μ m).

Dentro do gênero *Paranectriella* há várias espécies hiperparasitas de outros fungos (24, 14). A comparação das características morfológicas entre o isolado hiperparasita de *C. miconiae* proveniente do Equador e as demais espécies de *Paranectriella* indicou que se trata de um isolado de *P. juruana* apesar de algumas pequenas diferenças nos limites dos intervalos das medidas.

Discussão geral

Entre os seis fungos aqui apresentados, alguns representam espécies conhecidas, outros são novas taxa. Todos a exceção de *P. juruana*, são aqui relatados pela primeira vez como hiperparasitas de estromas de *C. miconiae*.

Coccidiella miconiae é um agente potencial para o biocontrole de *M. calvescens*. Apesar do intenso ataque de hiperparasitas a que é submetida em sua área de distribuição nativa, *C. miconiae* provoca um impacto visível na folhagem de *M. calvescens*. Acredita-se que na ausência destes hiperparasitas, como no caso da introdução do fungo em um programa de controle biológico clássico, o impacto do patógeno seria ainda mais acentuado. Cuidados com a limpeza do material para introdução são especialmente importantes neste caso. A presença de hiperparasitas associados à *C. miconiae* é, portanto, totalmente indesejável.

O reconhecimento da presença de tais hiperparasitas e sua identificação são os primeiros passos para sua exclusão.

Agradecimentos

O trabalho foi realizado com apoio financeiro do convênio RCUH-FUNARBE e do CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Os autores agradecem ao Dr. Ludwig Pfenning por suas sugestões.

Referências

1. Barreto RW, Evans H. The mycobiota of the weed *Chromolaena odorata* in southern Brazil particular reference to fungal pathogens for biological control. *Mycol. Res.* 1994; 98(10):1107-1116.
2. Cartwright RD, Webster RK, Wick CM. *Ascochyta mycoparasitica* sp.nov., a novel mycoparasite of *Sclerotium oryzae* in California rice fields. *Mycologia* 1997; 89(1):163-172.
3. Csurhes SM, Edwards R. Potential environmental weeds in Australia. Canberra: Environmental Australia Biodiversity Group, 1998.
4. Dhingra OD, Sinclair JB. Basic plant pathology methods. 2nd ed. Lewis Publishers, London, 1995.
5. Diamantopoulous A, Litkei J, Skopa C, Christias C. Effects of inhibitors of sclerotium formation on the sclerotial mycoparasite *Coniothyrium minutans* and its host *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycological Research* 2000; 104(12):1449-1452.
6. Ellis MB. Dematiaceous Hyphomycetes.I. *Mycological Papers* 1960; 76:19-36.
7. Ellis MB. Dematiaceous Hyphomycetes. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1971.
8. Ellis MB. More Dematiaceous Hyphomycetes. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1976.
9. Ellis MB. Some species of *Corynespora*. *Mycological Papers* 1957; 65(9):1-15.
10. Gagné BH, Loope LL, Medeiros AC, Anderson SJ. *Miconia calvescens*: a threat to native forests of the Hawaiian Islands. *Pacific Science* 1992; 46(3):390-391.
11. Gams W. Connected and disconnected chains of phialoconidia and *Sagenomella* gen. nov. segregated from *Acremonium*. *Persoonia* 1978; 10(1):97-112.
12. Holliday P. Fungus diseases of tropical crops. Cambridge: Cambridge University Press, 1980.
13. Huang HC, Kokko EG. *Trichothecium roseum*, a mycoparasite of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can.J.Bot.* 1993; 71:1631-1638.

14. Li LT, Hsieh WH. *Microcyclus pruni* sp. nov. hyperparasitized by *Paranectriella arcuata*. Botanical Bulletin of America Sinica 1991; 32(2):135-138.
15. Loope LL. *Miconia calvescens* D.C. *HNIS Report for Miconia calvescens*. Hawaiian Ecosystems at Risk Project, Hawaii; 1997.
16. Meenu, Kamal. New species of *Corynespora*. Mycological Research 1998; 102(3):344-346.
17. Meyer JY, Florence J. Tahiti's native endangered by the invasion of *Miconia calvescens* DC. (*Melastomataceae*). Journal of Biogeography 1996; 23:775-781.
18. Meyer JY, Malet JP. Study and management of the alien invasive tree *Miconia calvescens* DC. (*Melastomataceae*) in the islands of Raiatea and Tahaa (Society Islands, French Polynesia): 1993-1996. Manoa, Hawaii: Cooperative National Park Resources Studies Unit University of Hawai'i at Manoa; 1997. (Technical Report 111)
19. Meyer JY. Observations on the reproductive biology of *Miconia calvescens* DC. (*Melastomataceae*), an alien invasive tree on the island of Tahiti (South Pacific Ocean). Biotropica 1998; 30(4): 609-624.
20. Meyer JY. Status of *Miconia calvescens* (*Melastomataceae*) a dominant invasive tree in the Society Islands (French Polynesia). Pacific Science 1996; 50(1): 66-76.
21. Onesirosan PT, Arny D.C., Durbin RD. Host specificity of Nigerian and North American isolates of *Corynespora cassiicola*. Phytopathology 1974; 64(10): 1364-1367.
22. Pemberton CM, Davey RA, Webster J, Dick MW, Clark G. Infection of *Pythium* and *Phytophthora* species by *Olpidiopsis gracilis* (Oomycetes). Mycological Research 1990; 94(8):1081-1085.
23. Pereira, JM. A micobiota fitopatogênica associada à planta invasora *Lantana camara* L. com ênfase no Estado de Minas Gerais – Brasil. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brasil, 1997.
24. Rossman AY. The Tubeufiaceae and similar Loculoascomycetes. CAB International Mycological Institute, Slough, 1987.
25. Samuels GJ, Pardo-Schultheiss R, Hebbar KP, Lumsden RD, Bastos CN, Costa JC, Bezerra JL. *Trichoderma stromaticum* sp.nov., a parasite of the

- cacao witches broom pathogen. *Mycological Research* 2000; 104(6):760-764.
26. Silva WPK, Deverall BJ, Lyon BR. Molecular, physiological and pathological characterization of *Corynespora* leaf spot fungi from rubber plantations in Sri Lanka. *Plant Pathology* 1998; 47:267-277.
 27. Silva WPK, Multani DS, Deverall BJ, Lyon BR. RFLP and RAPD analyses in the identification and differentiation of isolates of the leaf spot fungus *Corynespora cassiicola*. *Aust. J. Bot.* 1995; 43:609-618.
 28. Stamets P, Chilton JS. *The mushroom cultivator*. Washington: Agarikon Press, 1983.
 29. Sutton JC, Peng G. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. *Phytopathology* 1993; 83: 615-621.
 30. Sutton JC, Li DW, Peng G, Yu H, Zhang P, Valdebenito-Sanhuenza RM. *Gliocladium roseum* : A versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Disease* 1997; 81: 316-328.
 31. Wei CT. Notes on *Corynespora*. *Mycological Papers* 1950; 34(30):1-9.
 32. Whipps JM, Budge SP, Mitchell SJ. Observations on sclerotial mycoparasites of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycological Research* 1993; 97(6):697-700.

***Ditylenchus drepanocercus* Goodey, 1953, Causador de
Mancha Angular em Folhas de *Miconia calvescens*
(Melastomataceae), como Potencial Agente de Biocontrole
Clássico¹**

C. D. S. Seixas, R.W. Barreto, L. G. Freitas, L.A. Maffia, R.D.L. Oliveira &
F.T. Monteiro²

Resumo: Identificou-se o agente causal da mancha angular de micônia, descreveram-se os sintomas e estudaram-se o método mais adequado de inoculação, a influência de variáveis climáticas no desenvolvimento da doença no campo e sua gama de hospedeiros. *Ditylenchus drepanocercus*, agente etiológico da doença, possui um apêndice em forma de foice na extremidade da cauda de indivíduos de ambos os sexos. As lesões foliares são angulares, delimitadas pelas nervuras. Os nematóides ficam alojados no parênquima lacunoso, cujas células aumentam de 7 a 13 vezes em tamanho. A intensidade da doença foi avaliada em duas localidades. Em Viçosa-MG, a incidência não se correlacionou com nenhuma das variáveis climáticas. Em Dionísio-MG a incidência se correlacionou negativamente com a temperatura e a severidade correlacionou-se positivamente com a umidade relativa e a temperatura. O método de inoculação que se mostrou mais adequado foi a aspersão de suspensão de nematóides em vários estádios de desenvolvimento, sobre folhas feridas previamente; o período de incubação foi de 20 dias. Além de *Miconia calvescens*, o nematóide foi patogênico a *M. prasina* e *M. phanerostila*.

¹ Trabalho realizado com o apoio financeiro do convênio RCUH-UFV e do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico).

²Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa-MG, Brasil.

Os autores agradecem ao Dr. Renato Goldemberg pela identificação de algumas espécies de melastomatáceas; ao Dr. Silamar Ferraz e à Dra. Regina Carneiro pelas críticas e sugestões, ao Bruno Sérgio Vieira pelo apoio na execução do trabalho e à Cia. Agrícola Florestal Santa Bárbara Ltda. (CAF) por ter permitido que parte do trabalho fosse desenvolvido em sua propriedade.

Miconia calvescens DC., planta da família Melastomataceae originária das Américas do Sul e Central, foi introduzida como ornamental em diversas regiões do mundo. Tornou-se uma invasora agressiva no Taiti, Havaí e outras ilhas do Pacífico (11, 18, 19, 20). Em outros locais, como a Austrália, já há restrições para sua comercialização e plantio (7).

Uma planta exótica é normalmente considerada como invasora quando já está amplamente disseminada e, ou, forma densos estandes, e o manejo destas invasoras começa, quase sempre, quando já é tarde demais para sua erradicação (19). Neste caso, o controle biológico torna-se a principal alternativa de manejo destas plantas (14). Projetos de controle biológico clássico de invasoras possuem várias etapas: a) determinação da necessidade de controle biológico da planta; b) buscas de inimigos naturais no local de origem da planta; c) seleção do(s) inimigo(s) mais efetivo(s); d) verificação da especificidade deste(s) organismo(s), para averiguar a segurança do seu uso; e) introdução e estabelecimento do(s) agente(s); f) avaliação do efeito destes agentes na população da invasora (30).

No Equador, Costa Rica, sul do México, norte da Guatemala e Belize, ocorre uma forma ou biotipo de *M. calvescens* que tem aparência distinta da que ocorre no Brasil. Este biotipo apresenta uma morfologia muito mais próxima da observada nas populações estabelecidas na Polinésia Francesa e Havaí. Suas plantas possuem folhas com até 1m de comprimento, com a face adaxial verde escuro e a abaxial arroxeada (20), que são mais carnosas e quebradiças. O biotipo que ocorre no Brasil apresenta folhas bicolors, apenas ocasionalmente, condição em geral restrita às folhas jovens. O comprimento das folhas chega a no máximo 0,39m (1, 17). Outra diferença relevante diz respeito à distribuição geográfica das duas formas: a forma “do Havaí” ocorre nas vertentes orientais dos Andes e Cordilheira Central (Costa Rica) em elevações, em geral, entre 600 e 1200m, enquanto a “brasileira” ocorre em geral restrita a altitudes inferiores a 700m e com ampla distribuição. Entretanto, os botânicos mantêm, até o momento, estas formas diferentes num mesmo taxon. *Miconia* Ruiz & Pavon é um gênero distinto, mas sua nomenclatura ainda é confusa e nenhuma revisão do gênero foi feita recentemente (15, 17).

Em 1995, um acordo de cooperação foi firmado entre o RCUH (Research Corporation of the University of Hawaii) e a FUNARBE (Fundação

Arthur Bernardes), para efetuar um levantamento preliminar de fungos fitopatogênicos associados a melastomatáceas nativas do Brasil que se tornaram invasoras no Havaí, entre elas *M. calvescens*. Em 1998, durante uma das viagens para coleta de material, nas vizinhanças de Manaus-AM, encontraram-se plantas de *M. calvescens* com lesões foliares angulares. Algumas folhas foram coletadas e levadas ao laboratório, e em cortes do tecido foliar lesionado examinados ao microscópio, detectaram-se nematóides associados às lesões. Posteriormente, esses nematóides foram também detectados em plantas de *M. calvescens* nos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro e também no exterior (Equador e Costa Rica). Na literatura, existem encontram-se vários relatos de nematóides parasitas de plantas invasoras e há estudos sobre o potencial de algumas espécies para controle biológico destas invasoras (22, 27, 28, 29, 31, 37, 38).

Na expectativa de que o nematóide encontrado associado às plantas de *M. calvescens* venha a ser utilizado como agente de biocontrole da invasora, este trabalho objetivou: identificar o nematóide, confirmar sua patogenicidade, verificar as condições favoráveis à ocorrência da doença no campo e investigar a gama de hospedeiros do nematóide.

Material e Métodos

Descrição dos sintomas e identificação do nematóide: para observar os sintomas e identificar o nematóide, folhas de *M. calvescens* apresentando lesões foram coletadas em Dionísio-MG e Viçosa-MG ao longo de um ano. Descreveram-se os sintomas a partir de observações diretas das lesões ao microscópio estereoscópico e de cortes ao microscópio ótico.

Para observar a aparência interna do tecido lesionado e a distribuição dos nematóides nas folhas, fragmentos de tecido lesionado foram recortados das folhas e seccionados com o auxílio de micrótomo de congelamento Leitz-Wetzlar, modelo Kryomat, com espessura ajustada para 25µm. As amostras foram montadas em lactofenol e observadas ao microscópio ótico.

Para a obtenção do nematóide, recortaram-se fragmentos folhas lesionadas as quais, colocadas em água com aeração contínua, produzida por bomba de aquário. Após 48 horas, usando-se peneiras de 0,84mm de malha

(20 mesh) sobre outra de 0,025mm de malha (500 mesh), os nematóides foram separados do material vegetal. Os indivíduos aparentemente vivos foram retirados com o auxílio de estilete de ponta fina, sob microscópio estereoscópico e transferidos para uma gota de água esterilizada sobre uma lâmina. Após colocação da lamínula e vedação com esmalte incolor, foram levadas ao microscópio ótico para que se pudesse efetuar as medições e observar as características morfológicas do nematóide. Examinaram-se 50 fêmeas e 20 machos; mediram-se os indivíduos com o auxílio de câmara clara acoplada a um microscópio ótico Leica Laborlux.

Estudos da população do nematóide no campo: este estudo foi conduzido em duas localidades do estado de Minas Gerais escolhidas em função da ocorrência natural de populações de *M. calvescens* e do nematóide: “Cristais” no município de Viçosa e “Balsa Velha”, também conhecido por “Retirante” (próximo à margem do Rio Doce), em área da Companhia Agrícola Florestal Santa Bárbara Ltda. (CAF) no município de Dionísio.

Durante 12 meses avaliaram-se a incidência e a severidade da doença causada pelo nematóide e se monitorou a população do nematóide.

Avaliação da Incidência em Dionísio-MG e Viçosa-MG: ramos de plantas infectadas dispersas pela área foram marcados até que o total de folhas presentes no conjunto de ramos fosse de 200 ou mais. A intervalos de 3 semanas, avaliaram-se, para cada ramo, o número total de folhas, o número de folhas sadias e o número de folhas infectadas pelo nematóide.

Avaliação da severidade em Dionísio-MG: para avaliar a severidade, marcaram-se 400 folhas em plantas distribuídas por toda a área utilizando etiquetas plásticas numeradas. A intervalos de três semanas, avaliou-se a severidade da doença utilizando-se uma escala de notas: 1, 2, 3, 4 e 5, que correspondiam à 0-5, 6-10, 11-20, 21-40 e >41% de área foliar doente, respectivamente.

Monitoramento da população do nematóide em Dionísio-MG: durante as avaliações de incidência e severidade, coletaram-se 15 folhas com lesões causadas pelo nematóide foram coletadas em plantas diferentes daquelas que possuíam ramos e,ou, folhas marcadas. No laboratório, essas folhas foram medidas (comprimento e largura) e pesadas. As lesões causadas pelo nematóide foram recortadas, pesadas e em seguida colocadas em água com

aeração contínua. Após por 48 horas, contaram-se os nematóides em Câmara de Peters.

Dados diários de temperatura, umidade relativa e precipitação no período de avaliação foram obtidos junto à empresa Companhia Agrícola Florestal Santa Bárbara Ltda. (CAF). Efetuaram-se análises de correlação das variáveis climáticas e a incidência da doença, severidade da doença e população do nematóide, durante o período de avaliação.

Inoculação do nematóide: plantas sadias de *M. calvescens* foram obtidas a partir de estacas e de mudas coletadas no campo em Viçosa-MG e em Dionísio-MG. Plantas do biotipo presente no Havaí foram produzidas a partir de plântulas enviadas por E. Killgore (Hawaii Department of Agriculture).

Três métodos de inoculação foram testados: aspersão (29, 22), injeção e deposição (22). No caso de aspersão e injeção o inóculo foi constituído de suspensão de nematóides, contendo ovos, juvenis de vários estádios e indivíduos adultos (639 indivíduos/ mL). Na aspersão, utilizou-se um atomizador, nas duas faces das folhas. Após aspergidas, as folhas foram perfuradas com uma agulha para provocar pequenos ferimentos. Na injeção, usou-se seringa hipodérmica e também inocularam-se ambas as faces das folhas. Na deposição, usaram-se como inóculo: a) fragmentos de lesões intactas colocadas sobre as folhas sadias umedecidas; b) macerado de fragmentos de lesões pincelado sobre ambas as superfícies das folhas; e c) 20 a 30 indivíduos colocados em gotícula de água sobre as folhas, com posterior ferimento com agulha (seis gotículas em cada folha). Para cada um dos três métodos de inoculação utilizaram-se duas plantas do biotipo de *M. calvescens* que ocorre no Brasil e duas do biotipo do Havaí, cada planta com três a quatro pares de folhas. Em todos os casos, após a inoculação, as plantas foram colocadas em câmara de nevoeiro com nebulização intermitente, a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas (9 lâmpadas tipo “Luz do Dia” de 20W, a 1,20m de altura) por 48 horas, e transferidas para câmara de crescimento a 26°C, com fotoperíodo de 12 horas (9 lâmpadas tipo “Luz do Dia” de 40W, a 1,0m de altura) onde permaneceram por dois meses para verificar o aparecimento de sintomas. Na inoculação por deposição de nematóides em gotículas de água, as plantas, após inoculadas, permaneceram fora da câmara de nevoeiro, até haver secamento das gotas, e então foram transferidas para a mesma.

Além da tentativa de reproduzir a doença por meio de métodos artificiais de inoculação, 10 plantas oriundas do Havaí, com três a quatro pares de folhas, cultivadas em vasos, foram colocadas sob plantas naturalmente infectadas na localidade de “Balsa Velha”, na mesma área onde se avaliou a intensidade de doença. Os vasos com as plantas foram enterrados sob a copa das plantas do biotipo brasileiro e deixadas no local por oito meses sendo irrigadas uma vez por semana.

Gama de hospedeiros ou teste de especificidade: para verificar a especificidade do nematóide, adotou-se um método indireto de avaliação. Coletaram-se amostras de plantas de diferentes espécies, gêneros e famílias nas vizinhanças de plantas de *M. calvescens* infectadas pelo nematóide. As coletas foram realizadas em Dionísio-MG (Quadro 1A) e Viçosa-MG (Quadro 1B) em duas épocas diferentes no ano de 2001. Em Dionísio, a primeira coleta foi em 15 de fevereiro e a segunda em 4 de setembro de 2001. Em Viçosa, a primeira coleta foi em 3 de março de 2001 e a segunda em 18 de setembro de 2001. Na coleta de amostras deu-se preferência à folhagem com aparência doente.

Subamostras de cada planta foram cortadas em fragmentos e colocadas, separadamente, em béquers com água destilada sob aeração forçada. A quantidade de folhas que compôs cada subamostra e o volume de água colocado em cada béquer variaram com o tipo e a textura das folhas de cada planta. Após 48h, retirou-se uma amostra de 10 mL de cada suspensão com uma pipeta, transferida para uma placa de Petri de 5 cm de diâmetro e levada ao microscópio estereoscópico para observação. Quando algum nematóide era detectado, este era transferido para uma lâmina e levado ao microscópio ótico para verificar se se tratava do nematóide parasita de *M. calvescens*. A principal característica morfológica utilizada para identificação do nematóide foi a terminação da cauda em forma de foice.

Para preservação de amostras do nematóide foram testados alguns métodos de fixação: FA 4:1, FAA, TAF, FG 4:1, FP 4:1, FA 4:10 (33).

Quadro 1- Plantas coletadas na localidade de “Balsa Velha” no município de Dionísio-MG para teste de especificidade do nematóide parasita de *M. calvescens*

Classe Magnoliopsida	
Subclasse Rosidae	
Ordem Myrtales	
Família	Espécie
Melastomastaceae	<i>Clidemia hirta</i> (L.) D. Don.
	<i>Leandra reversa</i> (DC.) Cogn.
	<i>Miconia calvescens</i> Schrank & Mart. ex DC. – biotipo brasileiro (população local)
	<i>Miconia calvescens</i> Schrank & Mart. ex DC. – biotipo havaiano (plantas introduzidas)
	<i>Miconia latecrenata</i> (DC.) Naudin
	<i>Miconia prasina</i> (Sw.) DC.
	<i>Miconia</i> sp.
	<i>Ossaea</i> sp.
	<i>Tibouchina granulosa</i> Cogn
	(não identificada)
Myrtaceae	<i>Eucalyptus</i> sp.
Lythraceae	<i>Cuphea</i> sp.
Ordem Fabales	
Fabaceae	<i>Erythrina speciosa</i> Andr.
	<i>Desmodium</i> sp.
Caesalpinaceae	<i>Piptadenia</i> sp.
Mimosaceae	<i>Mimosa</i> sp.
Ordem Apiales	
Apiaceae	<i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.
Ordem Euphorbiales	
Euphorbiaceae	<i>Chamaesyce hirta</i> (L.) Millsp.
	<i>Croton urucurana</i> Baill.
Ordem Linales	
Erythroxylaceae	<i>Erythroxylon</i> sp.

Ordem Sapindales	
Meliaceae	<i>Guarea macrophylla</i> Vahl.
Rutaceae	<i>Citrus</i> sp.
Ordem Geraniales	
Balsaminaceae	<i>Impatiens waleriana</i> Hook.f.
Subclasse Magnoliidae	
Ordem Laurales	
Lauraceae	<i>Nectandra</i> sp.
Monimiaceae	<i>Siparuna guianensis</i> Aubl.
Ordem Piperales	
Piperaceae	<i>Piper</i> sp.
	<i>Piper</i> sp.
Subclasse Hamamelidae	
Ordem Urticales	
Moraceae	<i>Ficus</i> sp.
Urticaceae	<i>Urtica</i> sp.
Cecropiaceae	<i>Cecropia</i> sp.
Subclasse Caryophyllidae	
Ordem Polygonales	
Polygonaceae	<i>Rumex</i> sp.
Subclasse Dilleniidae	
Ordem Malvales	
Malvaceae	<i>Sida rhombifolia</i> L.
Ordem Violales	
Cucurbitaceae	<i>Mormodica charantia</i> L.
Begoniaceae	<i>Begonia</i> sp.
Subclasse Asteridae	
Ordem Solanales	
Solanaceae	<i>Vassobia</i> sp.
	<i>Solanum viarum</i> Dunal
	<i>S. cernuum</i> Vell.
	<i>Cestrum</i> sp.

	<i>Cestrum</i> sp.
Ordem Lamiales	
Verbenaceae	<i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E. Br.
Lamiaceae	<i>Leonorus sibiricus</i> L.
	(não identificada)
Ordem Scrophulariales	
Acanthaceae	<i>Thumbergia alata</i> Bojer ex Sims
Bignoniaceae	(não identificada)
Ordem Asterales	
Asteraceae	<i>Chromolaena odorata</i> (L.) R.M. King & H. Robinson
	<i>Elephanthoppus mollis</i> Kunth
	<i>Mikania</i> sp.
	<i>Baccharis</i> sp.
Classe Liliopsida	
Subclasse Arecidae	
Ordem Arecales	
Arecaceae	(não identificada)
Subclasse Commelinidae	
Ordem Cyperales	
Cyperaceae	<i>Pycnus decumbens</i> T. Koyama
	<i>Scleria pterota</i> Presl.
Poaceae	<i>Eleusine indica</i> (L.) Gaertn.
	<i>Panicum maximum</i> Jacq.
Subclasse Zingiberidae	
Ordem Zingiberales	
Zingiberaceae	<i>Costus</i> sp.
Musaceae	<i>Musa paradisiaca</i> L.
Subclasse Liliidae	
Ordem Orchidales	
Orchidaceae	(espécie terrestre não identificada)

Quadro 1B- Plantas coletadas na localidade de “Cristais” no município de Viçosa-MG para teste de especificidade do nematóide parasita de *M. calvescens*

Classe Magnoliopsida	
Subclasse Rosidae	
Ordem Myrtales	
Família	Espécie
Melastomastaceae	<i>Clidemia hirta</i> (L.) D. Don.
	<i>Miconia calvescens</i> Schrank & Mart. ex DC.
	<i>Miconia ibaguensis</i> (Bonpl.) Triana
	<i>Miconia albicans</i> (Sw.) Triana
	<i>Miconia</i> sp.
	<i>Miconia</i> sp.
	<i>Tibouchina granulosa</i> Cogn
	<i>Tibouchina herbaceae</i> (DC.) Cogn.
Lithraceae	<i>Cuphea</i> sp.
Onagraceae	(não identificada)
Myrtaceae	<i>Psidium guajava</i> Linn.
Ordem Fabales	
Fabaceae	<i>Glycine wightii</i> (Graham ex Wightii & Arn) Verdc.
	<i>Indigofera</i> sp.
Caesalpinaceae	<i>Piptadenia</i> sp.
	<i>Bauhinia</i> sp.
	<i>Parapiptadenia</i> sp.
	<i>Senna macrathera</i> (Collad.) Irwin et Barn.
Ordem Rosales	
Rosaceae	<i>Rubus rosifolius</i> Sm.
	<i>Eriobotria japonica</i> Lindl.
Ordem Apiales	
Apiaceae	<i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.

Ordem Euphorbiales	
Euphorbiaceae	<i>Chamaesyce hirta</i> (L.) Millsp.
	<i>C. heterophylla</i> L.
	<i>Manihot esculenta</i> Crantz
Ordem Linales	
Erythroxylaceae	<i>Erythroxylon</i> sp.
	<i>Erythroxylon</i> sp.
Ordem Sapindales	
Anacardiaceae	<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi
Rutaceae	<i>Citrus</i> sp.
Subclasse Magnoliidae	
Ordem Laurales	
Lauraceae	<i>Persea americana</i> Mill.
Ordem Piperales	
Piperaceae	<i>Piper</i> sp.
	<i>Ottonia leptostachia</i> Kuth.
Subclasse Hamamelidae	
Ordem Urticales	
Moraceae	<i>Ficus</i> sp.
Urticaceae	<i>Morus alba</i> Linn.
Cecropiaceae	<i>Cecropia</i> sp.
Subclasse Caryophyllidae	
Ordem Caryophyllades	
Nyctaginaceae	<i>Bougainvillea</i> sp.
Amaranthaceae	<i>Alternanthera brasiliana</i> Kuntze
Ordem Polygonales	
Polygonaceae	<i>Antigonon leptopus</i> Hook. Et Arn.
Subclasse Dilleniidae	
Ordem Malvales	
Malvaceae	<i>Pavonia communis</i> A. St.-Hil.
	<i>Sida carpinifolia</i> L.f.
Sterculiaceae	<i>Astrapaea</i> sp.

Ordem Violales	
Passifloraceae	<i>Passiflora</i> sp.
Cucurbitaceae	<i>Mormodica charantia</i> L.
	<i>Cucurbita</i> sp.
Subclasse Asteridae	
Ordem Solanales	
Solanaceae	<i>Cestrum</i> sp.
	<i>Solanum maritimum</i> Meyen ex Nees
	<i>S. cernuum</i> Vell.
Convolvulaceae	<i>Ipomaea cairica</i> (L.) Sweet
Ordem Lamiales	
Verbenaceae	<i>Lantana</i> sp.
	<i>Aegiphila sellowiana</i> Cham.
Lamiaceae	<i>Hyptis</i> sp.
Ordem Scrophulariales	
Acanthaceae	<i>Thumbergia alata</i> Bojer ex Sims
	(não identificada)
Bignoniaceae	(não identificada)
Ordem Rubiales	
Rubiaceae	<i>Coffea arabica</i> L.
	<i>Richardia brasiliensis</i> Gomes
	<i>Spermacoe</i> sp.
Ordem Asterales	
Asteraceae	<i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC.
	<i>Chromolaena odorata</i> (L.) R.M. King & H. Robinson
	<i>Elephanthoppus mollis</i> Kunth
	<i>Vernonia</i> sp.
Classe Liliopsida	
Subclasse Arecidae	
Ordem Arecales	
Arecaceae	(não identificada)

Subclasse Commelinidae	
Ordem Commelinales	
Commelinaceae	<i>Tradescantia</i> sp.
	<i>T. zebrina</i> Hort. ex Bosse
Ordem Cyperales	
Poaceae	<i>Pennisetum purpureum</i> Schum.
	<i>Zea mays</i> L.
Ordem Typhales	
Typhaceae	<i>Typha</i> sp.
Subclasse Zingiberidae	
Ordem Zingiberales	
Maranthaceae	<i>Calathea</i> sp.
Subclasse Liliidae	
Ordem Liliales	
Iridaceae	<i>Iris</i> sp.
Ordem Orchidales	
Orchidaceae	(não identificada)

Resultados

Descrição dos sintomas e identificação do nematóide: as lesões provocadas pelo nematóide (Figura 1) ocorreram apenas nas folhas e são angulares, delimitadas pelas nervuras; inicialmente são amarelo claro e vão se tornando amarelo mais intenso até ocorrer a necrose do tecido. As lesões variam de 1 a 5cm², e podem coalescer, ocasionalmente, atingindo grandes porções do limbo foliar. Em sua grande maioria, as lesões são melhor visualizadas na face abaxial das folhas mais velhas, sendo extremamente rara a ocorrência de lesões em folhas novas. É muito comum a presença de lesões associadas a injúrias no limbo foliar provocadas por insetos ou outros agentes (Figura 2). Quando observadas ao microscópio estereoscópico, nota-se que a área lesionada é ligeiramente elevada em relação à superfície foliar não lesionada; pela observação de cortes ao microscópio ótico verificou-se que os nematóides estão alojados no parênquima lacunoso, cujas células sofrem hipertrofia, aumentam de 7 a 13 vezes

em tamanho (Figura 3). Os nematóides estavam presentes em grande número em cada lesão, mas encontravam-se restritos à área lesionada (Figura 4).

O fixativo que apresentou melhor resultado foi o TAF. Amostras têm sido mantidas nesse fixativo. As observações da morfologia e as medidas das estruturas foram realizadas em indivíduos vivos.



Figura 1- Sintomas da Mancha Angular causada por Ditylenchus drepanocercus em Miconia calvenscens.



Figura 2. Lesão provocada por Ditylenchus drepanocercus em Miconia calvenscens associada a uma injúria.

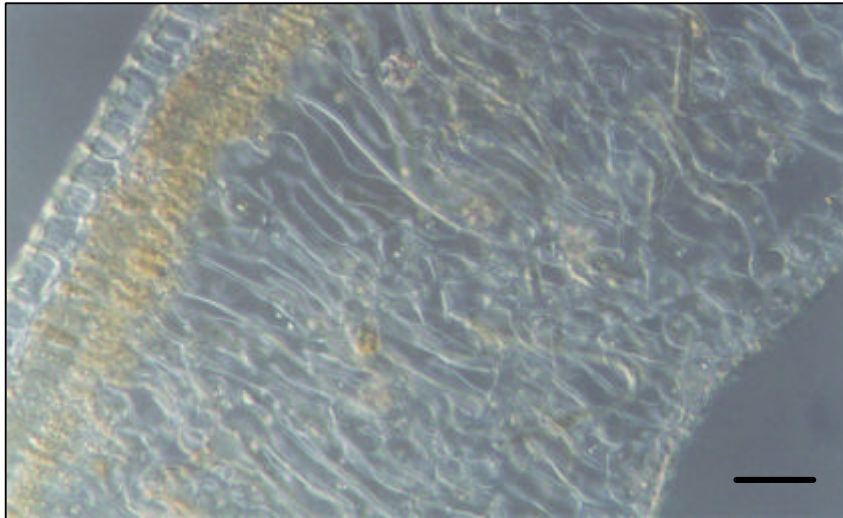


Figura 3. Corte de uma lesão foliar provocada por *Ditylenchus drepanocercus* em *Miconia calvenscens*. Células do parênquima lacunoso na área lesionada sofrem hipertrofia. Barra= 50 μ m

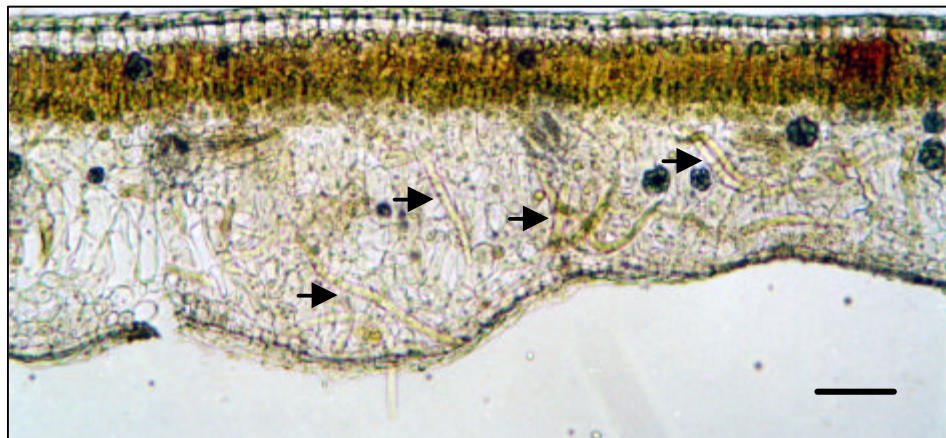


Figura 4. Corte de uma lesão foliar provocada por *Ditylenchus drepanocercus* em *Miconia calvenscens*. Note a presença de vários nematóides numa mesma lesão (setas). Barra= 50 μ m

O nematóide parasita de *M. calvenscens* foi identificado como pertencente ao gênero *Ditylenchus* Filipjev por apresentar as seguintes características: cutícula fina e estriada; região labial achatada e ligeiramente mais estreita que o corpo; estilete delicado com nódulos pequenos; abertura da glândula esofágica dorsal localizada 1-3 μ m após os nódulos do estilete;

esôfago tilencóide com o metacorpo inconspícuo e difícil de ser detectado, lúmen levemente mais refrativo no procorpo que no ístmo ou no bulbo basal. Fêmeas monodelfas e prodelfas, com saco pós-uterino presente, relação entre a distância da região anterior a vulva e o comprimento total da fêmea (V) variando de 71 a 84%; machos menores e menos numerosos que as fêmeas, possuindo gubernáculo e bursa. A característica mais marcante do nematóide encontrado em *M. calvescens* é a presença de um apêndice em forma de foice na extremidade da cauda dos indivíduos adultos de ambos os sexos (Figura 5).



Figura 5. Cauda de *Ditylenchus drepanocercus* em *Miconia calvescens*. Note a presença de apêndice em forma de foice na extremidade da cauda (seta). Barra= 10 μ m

As dimensões do nematóide associado às lesões em *M. calvescens* estão no Quadro 2, em paralelo às medidas de *Ditylenchus drepanocercus* Goodey, 1953 conforme a descrição original. Esta é a única espécie de *Ditylenchus* descrita e aceita até o momento na literatura (10, 4), que possui apêndice semelhante ao de *M. calvescens*.

Quadro 2. Dimensões de fêmeas e machos de *Ditylenchus drepanocercus* associado a *M. calvescens* e de *Ditylenchus drepanocercus* segundo Goodey, 1953

Característica morfológica		Nematóide de <i>Miconia</i>		<i>Ditylenchus drepanocercus</i> Goodey, 1953	
		Fêmea (50)	Macho (20)	Fêmea	Macho
Comprimento (μ)	Corpo	416-697	364-585	455-545	420-492
	Esôfago	100-177	67-155	-	-
	Estilete	6-11	6,67-8.98	8-9	8-9
	Cauda	21-45	22-40	-	-
	Fim da cabeça à vulva	270-458	-	-	-
	Espículos	-	7-10	-	±10
Diâmetro (μ)	Meio do corpo	8-15	9,5-11,5	-	-
	Altura do ânus	5-9,5	8-10,5	-	-
	Altura da vulva	7-13,5	-	-	-
a ¹		32-66,5	36-54	33-62	38,8-58
b ²		3-4,5	2,5-6	4-5,3	3,74-4,6
c ³		8-25	10,5-22	16,2-18	14,5-17,3
V ⁴ (%)		71-84	-	75-80	-
T ⁵ (%)		-	1,5-3,5	-	-
s ⁶		1-2	1-1,5	-	-

1- a = comprimento do corpo/diâmetro (meio) do corpo;

2- b = compr. do corpo/compr. do esôfago

3- c = compr. do corpo/compr. da cauda

4- V = distância entre a região anterior do corpo até a vulva/ compr. do corpo x 100

5- T= tamanho dos espículos/compr. do corpo x 100

6- s= tamanho do estilete/diâmetro na altura da base do estilete

Avaliação da incidência em Viçosa-MG: os dados de incidência coletados durante o período de avaliação estão apresentados na Figura 5, juntamente com as variáveis climáticas registradas em Viçosa-MG no mesmo período. Pela análise estatística, nenhum dos fatores climáticos, temperatura, umidade relativa e precipitação, correlacionaram-se significativamente com a incidência da doença causada pelo nematóide em Viçosa, durante o período avaliado.

Avaliação da incidência e severidade em Dionísio-MG: os dados de incidência e severidade coletados durante o período de avaliação estão apresentados na

Figura 6 juntamente com as variáveis climáticas registradas em Dionísio-MG no mesmo período. A incidência correlacionou-se positivamente à temperatura, enquanto a umidade relativa e a precipitação não se correlacionaram à incidência durante o período. A temperatura correlacionou-se negativamente à incidência. A severidade também foi correlacionada à umidade relativa e à temperatura e não à precipitação. Porém, nesse caso, a correlação da severidade tanto com a umidade relativa quanto com a temperatura foi positiva.

Monitoramento da população do nematóide: os dados referentes a flutuação da população de *D. drepanocercus* durante o período de avaliação estão apresentados na Figura 6. Nenhum dos fatores climáticos correlacionou-se significativamente à flutuação da população durante o período avaliado.

Inoculação do nematóide: o único método adequado à inoculação artificial foi a aspersão da suspensão contendo nematóides nas várias fases de desenvolvimento. Os sintomas foram observados 20 dias após a inoculação na planta do biotipo do Brasil; apenas uma lesão foi detectada, a qual foi recortada e mantida em água aerada por 24 horas, quando a suspensão foi observada em microscópio estereoscópico e a presença do nematóide foi detectada. Para confirmação, três indivíduos foram transferidos com o auxílio de estilete de ponta flexível, para uma gota de água, numa lâmina e observados ao microscópio ótico.

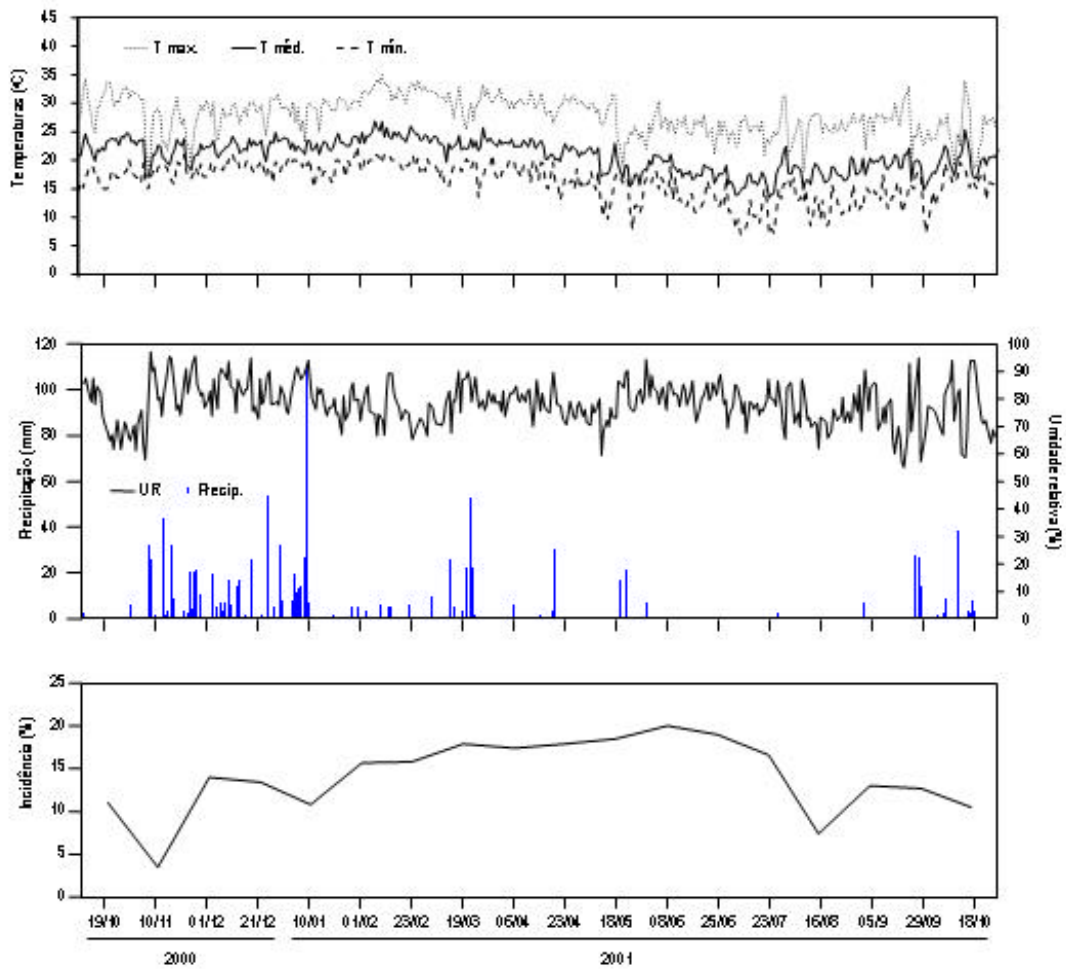


Figura 6. Variáveis climáticas registradas na região de Viçosa-MG e incidência da mancha angular causada por *Ditylenchus drepanocercus* em *Miconia calvescens* no período de novembro de 2000 a novembro de 2001.

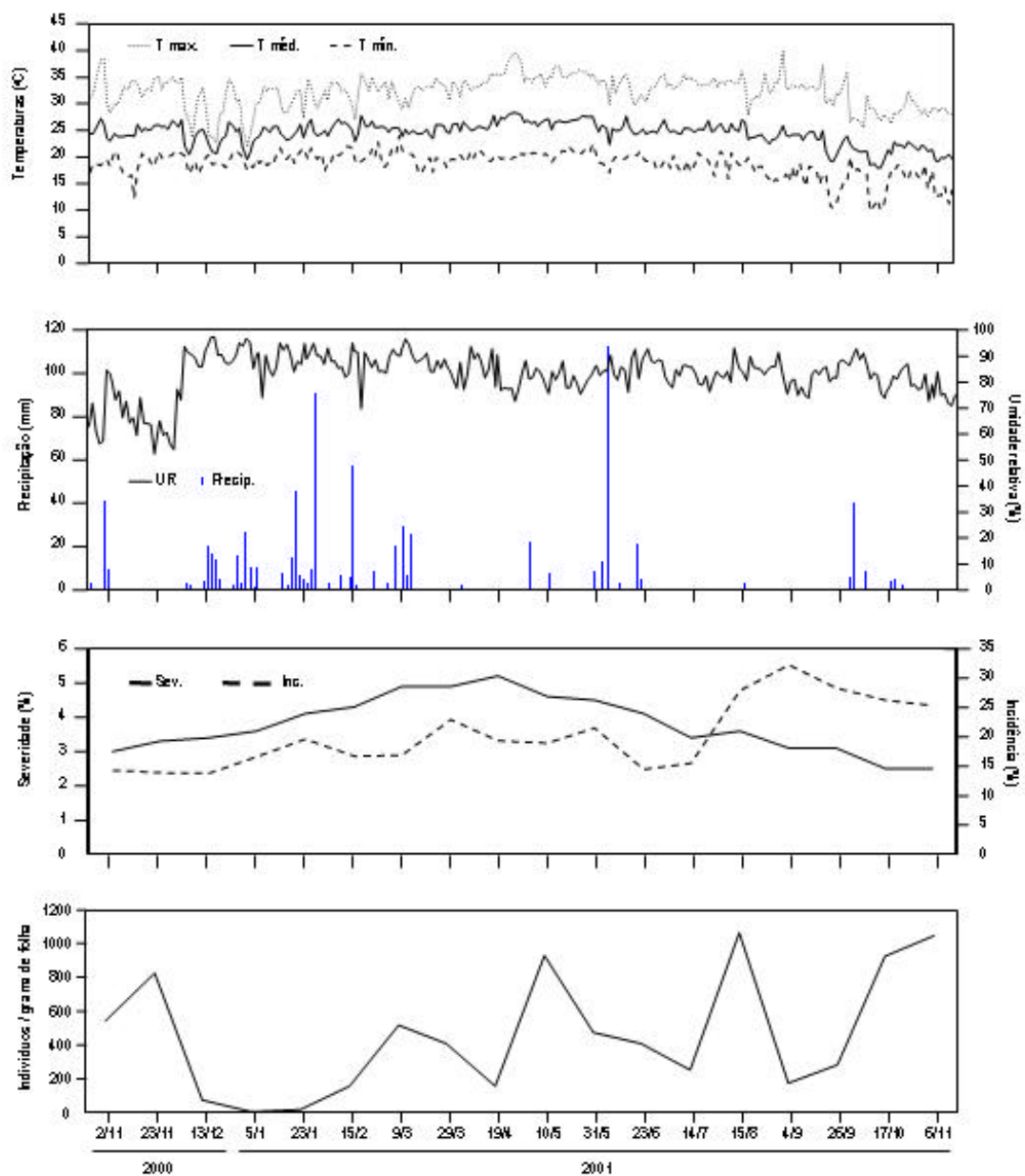


Figura 7. Variáveis climáticas registradas na região de Dionísio-MG; incidência e severidade da mancha angular causada por *Ditylenchus drepanocercus* em *Miconia calvescens*, flutuação populacional do nematóide no período de novembro de 2000 a novembro de 2001.

As plantas do biotipo do Havaí introduzidas no campo sob plantas do biotipo brasileiro infectadas pelo nematóide não apresentaram sintomas de ataque do nematóide mesmo após oito meses nessa condição.

Teste de especificidade: o nematóide foi detectado em *M. calvescens* em Viçosa-MG e em Dionísio-MG nas duas épocas de coleta e em *Miconia prasina* (Sw.) DC., coletada apenas em Dionísio-MG nas duas épocas de avaliação. Na Amazônia, este nematóide foi detectado em *M. phanerostila* Pilg.. Material coletado das plantas do biotipo do Havaí colocadas na área não foram atacadas.

Discussão

Nematóides causando sintomas foliares não são incomuns. Algumas espécies que provocam galhas em folhas e/ou ramos foram estudadas para o biocontrole de plantas invasoras, como por exemplo, *Nothanguina phyllobia* para controle de *Solanum elaeagnifolium* Cav. (22); *Subanguina picridis* para *Acroptilon repens* (L.) DC. (38); *Orrina phyllobia* também para *Solanum elaeagnifolium* Cav. (28); *Anguina amsinckiae* para *Amsinckia* spp. (27). Entretanto, lesões foliares como as causadas pelo nematóide parasita de *Miconia calvescens* (MPMc) não são comuns, podendo-se citar apenas o relato de Goodey (13). Outros exemplos de nematóide que causam lesões em folhas são: *Aphelenchoides besseyi* Christie que causa a Ponta Branca no arroz, (23, 41, 3); *Ditylenchus dipsaci* Filipjev causador do Amarelão em alho e cebola (2); *Aphelenchoides fragariae* (Ritzema Bos) Christie no morango (16) e *A. ritzemabosi* (Schwartz) Steiner & Buhner em crisântemo (5).

O NPMc apresenta morfologia geral e a maioria das medidas equivalentes àquelas encontradas por Goodey (13), os intervalos se sobrepõem, à exceção apenas de “b” (Quadro 2). Goodey (13) considera como características básicas para a distinção da espécie por ele descrita, o tamanho muito pequeno do corpo e o apêndice na extremidade da cauda em forma de foice. O NPMc possui essas duas características, portanto as diferenças encontradas nas medidas não são relevantes o suficiente para que se proponha uma nova espécie. Assim, acredita-se que *D. drepanocercus* é o agente etiológico da mancha angular em *M. calvescens*.

Ao descrever *D. drepanocercus*, Goodey (13) não citou claramente o número de indivíduos examinados, mas o número foi pequeno tendo em vista as dificuldades citadas pelo autor na obtenção de indivíduos vivos. Esta pode ser uma das explicações para as diferenças biométricas entre o nematóide descrito por Goodey (1953) e o NPMc. Além disso, as dimensões dos nematóides podem variar em função da fonte de alimentação ou hospedeiro e das condições ambientais (12, 32, 34, 40). O comprimento de indivíduos de *Ditylenchus destructor* que cresceram com nível baixo ou zero de potássio e zero de fósforo foi menor que aqueles que cresceram em outros níveis desses nutrientes (32). Populações de *Subanguina picridis*, causador de galhas em folhas e ramos de plantas da tribo Cynareae, obtidas de diferentes plantas hospedeiras, foram variáveis em medidas e detalhes estruturais, no entanto, não foram encontradas diferenças discrepantes entre as populações que justificassem a separação em seis espécies diferentes como era considerado até então (40). Goodey (12) comenta que uma espécie é essencialmente um grupo dinâmico de indivíduos e, portanto, as características anatômicas e estruturais devem ser utilizadas com critério na separação de espécies.

Mais de 500 angiospermas, entre mono e dicotiledôneas são conhecidas como hospedeiras de nematóides do gênero *Ditylenchus*. No entanto, *D. drepanocercus* é considerada uma espécie com alta especificidade de hospedeiro (34), havendo apenas um relato, na Índia, em folhas de *Evodia roxburghiana* Benth., planta da família Rutaceae (13), ordem Sapindales (6). Mais de 50 anos depois, em outro continente, a espécie é detectada parasitando folhas de *M. calvescens*, planta da família Melastomataceae, ordem Myrtales. Pela avaliação indireta da especificidade de *D. drepanocercus*, sugere-se que as populações neotropicais deste nematóide parecem ser restritas a espécies do gênero *Miconia*. A distribuição descontínua deste nematóide parece ser surpreendente, mas talvez seja reflexo de uma simples deficiência geral de estudos sobre nematóides fitoparasitas de plantas não domesticadas.

O nematóide *Subanguina picridis* foi bastante estudado como agente de biocontrole para *Acroptilon repens* (L.) DC., importante invasora em várias regiões dos Estados Unidos e Canadá (38, 39, 40, 25, 26, 24). Segundo o teste de gama de hospedeiros o nematóide é capaz de infectar outras plantas além

da planta-alvo. Mesmo assim, os estudos continuaram porque a planta-alvo foi considerada como a única altamente suscetível ao nematóide (39). No Canadá a introdução do nematóide foi autorizada para testes em parcelas experimentais (38, 40).

Os procedimentos hoje amplamente utilizados para verificação de especificidade são baseados em Wapshere (36), consistindo na exposição ao potencial agente de biocontrole de grupos de plantas-teste selecionadas. Estes testes são conduzidos em condições controladas com plantas cultivadas em vasos. Neste trabalho, adotou-se um procedimento inovador: ao invés de inocular plantas em vasos, selecionaram-se espécies de plantas de vários gêneros e famílias, com particular atenção a membros da família Melastomataceae, que ocorriam nas vizinhanças de populações de *M. calvescens* atacadas pelo nematóide. Este método para verificação da especificidade de um organismo, candidato a agente de biocontrole, tem como vantagens dispensar um conhecimento prévio aprofundado sobre a biologia dos organismos envolvidos, as condições favoráveis ao seu desenvolvimento, o método de inoculação apropriado, etc. No caso específico deste nematóide de *M. calvescens*, isso é importante, pois não há estudos anteriores sobre seu ciclo de vida e nem do ciclo da doença. Parte-se da pressuposição de que qualquer outra planta na mesma área está constantemente exposta ao possível ataque deste nematóide. Se o nematóide não estabelece populações passíveis de observação e recuperação sobre estas plantas, elas podem ser consideradas como não hospedeiras. Outra vantagem é que, para realizar este teste, não se depende da disponibilidade de mudas das plantas-teste ou de ter que se esperar pelo seu crescimento ou recebimento (quando a lista de plantas-teste é definida e as plantas são fornecidas pelas autoridades da região interessada na introdução do agente de biocontrole). Como desvantagens deste método têm-se, as dificuldades advindas da necessidade de esclarecimento da identidade das espécies de plantas envolvidas no teste; restrição do teste às espécies já estabelecidas na área de estudo, o que pode resultar numa coleção inadequada e pouco representativa para funcionar como teste centrífugo-filogenético. A lista de plantas-teste disponíveis na área pode não atender às exigências estipuladas pelas autoridades quarentenárias do país de introdução. De qualquer forma, esta pode ser uma maneira rápida e

prática de se ter uma idéia da especificidade de um organismo sobre o qual não se tenha conhecimento prévio. Aparentemente, não há registro anterior do uso deste método em controle biológico.

O método mais promissor de inoculação do nematóide foi a aspersão de suspensão contendo nematóides em vários estádios, acompanhada da promoção de ferimentos nas folhas inoculadas. Como não se sabe em que estágio(s) o nematóide penetra na folha, o fato de se ter empregado, suspensão com indivíduos de vários estádios contribuiu certamente para o seu sucesso. No caso da deposição de gotículas com nematóides, os indivíduos transferidos estavam aparentemente em fase mais adiantada de desenvolvimento. Os ferimentos também parecem ser importantes, pois em outra ocasião, uma inoculação feita pela aspersão em órgãos sem ferimentos não resultou em sintomas. Na deposição de macerado de lesões, apesar de se ter indivíduos em diversos estádios, os sintomas podem não ter ocorrido pela ausência de ferimentos. Ao microscópio estereoscópico, é comum observarem-se as lesões de nematóide associadas a alguma injúria no tecido foliar. Talvez *D. drepanocercus* não tenha a capacidade ou não seja eficiente em penetrar diretamente no tecido foliar.

O fato de *D. drepanocercus* ter infectado as plantas do biotipo do Brasil e não as do biotipo do Havaí sugere a existência de especialização fisiológica nesse patossistema. É interessante notar que esse nematóide foi observado no Equador e na Costa Rica, em plantas do biotipo que ocorre no Havaí. Esse resultado negativo da inoculação pode ser resultante da especificidade elevada do nematóide ou a uma elevada diferença genética, provavelmente em nível de espécie, entre as populações de *Miconia* do Brasil e aquelas do Havaí.

Ditylenchus drepanocercus é um endoparasita. Cortes de lesões (Figura 3) mostraram que os indivíduos ficam alojados no parênquima lacunoso. Este nematóide não resiste à dessecação por muito tempo, pois quando folhas herborizadas com sintomas foram colocadas em água com aeração contínua para extração, nenhum indivíduo vivo foi recuperado. Entretanto, quando as folhas com lesões foram mantidas em temperatura baixa (10°C), mesmo após sete dias, indivíduos vivos foram recuperados do material. O mesmo ocorre com outra espécie deste gênero, *D. destructor*, que não sobrevive em umidades relativas inferiores a 40% (34).

O ciclo de vida de diferentes espécies de nematóides varia de cinco dias no mínimo a um ano ou mais e são influenciados primariamente pela temperatura e qualidade do substrato (21). Neste trabalho, não foi possível determinar a duração do ciclo de vida de *D. drepanocercus*. Na lesão obtida após 20 dias da inoculação artificial detectaram-se alguns indivíduos aparentemente em estádios mais avançados, já com o apêndice na extremidade da cauda, o qual não existe em indivíduos no início do desenvolvimento, e não foram detectados ovos, que foram vistos em alguns cortes de lesões obtidos de folhas, naturalmente infectadas, coletadas no campo. É possível que estes indivíduos fossem simplesmente os colonizadores iniciais daquele tecido.

Quanto à influência dos fatores climáticos é importante mencionar que as avaliações de incidência e severidade, tanto em Viçosa quanto em Dionísio, foram feitas no campo, em áreas onde a planta ocorria naturalmente e estas não foram inoculadas, o que foi avaliado, portanto, foi a ocorrência natural do nematóide no campo. Ademais, as variáveis climatológicas obtidas foram medidas a no mínimo 5000m e podem não refletir o microclima do local onde se efetuaram as avaliações. Vale lembrar, ainda que não há informação disponível sobre a biologia e condições favoráveis para este nematóide o que dificulta a interpretação e a discussão dos resultados aqui obtidos.

Em Viçosa, a doença ocorreu durante todo o ano, mas os valores de incidência, de maneira geral, não foram muito altos. O maior valor foi de 20% em 08/06/2001. Ocorreram duas quedas acentuadas na incidência. A primeira em 10/11/2000 (de 11% na avaliação anterior para 3,5%) e a segunda em 16/08/2001 (de 16,6% para 7,4%). Da avaliação de 19/10/2000 para a de 10/11 ocorreu um aumento no número de folhas (de 200 para 226), porém os sintomas da mancha angular são observados nas folhas mais velhas, isto pode ter refletido nesse valor mais baixo de incidência em 10/11. A umidade relativa no período anterior a esta avaliação estava na faixa de 50 a 70% e a temperatura média entre 20 a 25°C. Por ocasião da segunda queda no valor da incidência, em 16/08/2001, ocorreu uma diminuição no número de folhas (de 169 na avaliação anterior para 148 em 16/08), nesse caso o que pode ter ocorrido é a queda de folhas mais velhas com sintomas. No período anterior a esta avaliação a umidade relativa estava variando de 65 a 85% e a temperatura

média de 15 a 23°C. Ademais, estas quedas podem estar relacionadas ao período sem chuva, seco que as antecedem.

Não houve correlação entre as variáveis climáticas e a incidência da doença em Viçosa. Quando os ramos foram marcados, a doença já estava presente, hospedeiro suscetível e patógeno virulento já estavam interagindo e o ambiente era, e tudo indica, continuou favorável durante todo o período em que transcorreu o estudo. Variações devem ter ocorrido em função da fisiologia e fenologia do hospedeiro. Quando florescem, as plantas de *M. calvescens* deixam de emitir novas folhas, então num primeiro momento a incidência se manteria constante, mas depois, com a queda das folhas mais velhas, a incidência deveria cair. Vale lembrar que os sintomas são vistos basicamente nas folhas mais velhas. Quando os períodos de florescimento e frutificação passam, a planta volta a emitir novas folhas e a incidência volta a se elevar. Em Viçosa, de janeiro a maio a encontravam-se a maioria das plantas florindo e formando frutos, em agosto ainda havia algumas plantas com frutos maduros.

Em Dionísio-MG, o valor máximo da incidência da mancha angular foi de 32,2% em 04/09/2001. No período que antecedeu essa avaliação, os valores de umidade relativa variaram de 80 a 90% e a temperatura média de 20 a 25°C. De maneira geral, a incidência apresentou tendência de aumento durante o ano mas com a ocorrência de alguns picos não muito acentuados. O período de florescimento de *M. calvescens* em Dionísio foi de novembro a maio. A temperatura correlacionou-se negativamente com a incidência. Este efeito da temperatura sobre a incidência pode ser indireto, em condições de temperaturas altas a umidade relativa diminui e afeta a dispersão do nematóide. Como o nematóide é sensível à dessecação, condições de umidade relativa baixa poderiam estar provocando a morte de indivíduos nessa etapa do ciclo da doença. Os valores de severidade foram, de maneira geral, muito baixos durante todo o período, variando de 2,5 a 5,2%. A tendência da severidade, durante o ano avaliado, foi de aumentar de 02/11/2001 (primeira avaliação) até 19/04/2001, quando atingiu o valor máximo de 5,2% e depois cair chegando a 2,5% na última avaliação. A severidade correlacionou-se positivamente com umidade relativa e temperatura. Normalmente nematóides são favorecidos por temperaturas mais altas que encurtam o ciclo de vida (9).

Com isso haveriam maior número de gerações por período de tempo, aumentado assim a severidade da doença. Se umidade relativa alta favorece a dispersão, indiretamente vai estar favorecendo a severidade pois estará proporcionando condições para o surgimento de novas lesões.

A população do nematóide oscilou bastante durante o ano. Os menores valores registrados de número de indivíduos/grama de folhas ocorreram no período de 13/12/2000 a 23/01/2001 e os maiores valores ocorreram em 15/08/2001 e em 06/11/2001, que foi a última avaliação. Nesse caso, era esperado que houvesse relação com umidade relativa e temperatura, que são considerados, entre os fatores abióticos que governam o tamanho de populações de nematóides, os mais importantes (35, 21, 42). Mas como o patógeno já ocorria naturalmente na área associado à sua planta hospedeira, provavelmente já existia um equilíbrio entre eles. Isso poderia explicar o fato de não ter havido correlação entre as variáveis climáticas e os níveis de população registrados durante o período de avaliação. Segundo Dinoor (8), populações naturais de plantas co-evoluem não somente com seus patógenos mas também com seu ambiente.

Durante as contagens de indivíduos, foi observado que o número de machos é muito inferior ao de fêmeas, condição comum para espécies que têm machos (21).

Apesar de haver ainda muitas lacunas a serem preenchidas no conhecimento sobre *D. drepanocercus* e sua interação com *M. calvescens*, mas as observações feitas neste estudo sugerem que esse nematóide pode ter algum potencial como agente de biocontrole para esta invasora. Há semelhanças entre as condições climáticas no Havaí e no Brasil e, provavelmente, lá, o nematóide não encontraria limitações para se estabelecer; os indícios apontam para uma limitada gama de hospedeiros o que faria com que sua introdução fosse considerada segura. Seguramente, antes de uma eventual introdução alguns obstáculos importantes têm que ser superados, como estudos mais completos sobre sua especificidade; biotipo infectivo do nematóide; método mais eficaz de inoculação e de preservação do inóculo.

Literatura Citada

- 1- BAUMGRATZ, J.F.A. 1980. Miconias do município do Rio de Janeiro - Seção *Miconia* DC. (Melastomataceae). *Rodriguésia* 32(55):73-95.
- 2- BECKER, W.F. 2000. Doenças causadas por nematóides em alho e cebola. Pp. 83-102 in L. Zambolim, F.X.R. Vale, H. Costa, eds. Controle de Doenças de Plantas, Hortaliças. Viçosa-MG, Brasil: Suprema Gráfica e Editora.
- 3- BEDENDO, I.P. 1997. Doenças do arroz (*Oryza sativa* L.). Pp.85-99. São Paulo: Editora Agronômica Ceres.
- 4- BRZESKI, M. W. 1991. Review of the genus *Ditylenchus* Filipjev, 1936 (Nematoda: Anguinidae). *Revue Nématol.* 14(1):9-59.
- 5- CALDARI JÚNIOR, P., J.C. de Freitas, J.A.M. Rezende. 1997. Doenças das plantas ornamentais. Pp.594-615 in H. Kimati, L. Amorim, A. Bergamin Filho, L.E.A. Camargo, J.A.M. Rezende. Manual de fitopatologia. Piracicaba-SP, Brasil: Ceres.
- 6- CRONQUIST, A. 1988. The evolution and classification of flowering plants. 2nd ed. Pp.503-517. New York: The New York Botanical Garden.
- 7- CSURHES, S. M. 1997. *Miconia calvescens* DC. (Melastomataceae) a potentiality invasive plant in Australia's tropical and sub-tropical rainforests. Proceedings First Regional Conference on *Miconia* Control, Papeete, Tahiti, august.
- 8- DINOOR, A. 1981. Epidemics caused by fungal pathogens in wild and crops plants. Pp.143-158 in J.M. Thresh, ed. Pest, pathogens and vegetation. Boston: Pitman Advanced Publishing Program.
- 9- DROPKIN, V. H. 1980. Introduction to Plant Nematology. New York: John Wiley & Sons.
- 10- FORTUNER, R. 1982. On the genus *Ditylenchus* Filipjev, 1936 (Nematoda: Tylenchida). *Revue Nématol.* 5(1):17-38.
- 11- GAGNÉ, B. H., L. L. Loope, A. C. Medeiros, S. J. Anderson. 1992. *Miconia calvescens*: a threat to native forests of the Hawaiian Islands. *Pacific Science* 46(3):390-391.
- 12- GOODEY, J.B. 1952. The influence of the host on the dimensions of plant parasitic nematode, *Ditylenchus destructor*. *Ann. Appl. Biol.* 39:221-229.

- 13- GOODEY, T. 1953. On two new species of nematodes associated with leaf-blotch in *Evodia roxburghiana* an Indian evergreen tree. Thapar Commen. Vol. 95:95-104.
- 14- HARLEY, K. L. S., and I. W. Forno. 1992. Biological control of weeds, a handbook for practioners and students. Melbourne: Inkata Press.
- 15- HOWARD, R.A., and E. A. Kellogg. 1986. Nomenclatural notes on *Miconia* (Melastomataceae). Journal of the Arnold Arboretum 67:233-255.
- 16- MAAS, J.L. (ed.). 1998. Compendium of strawberry diseases (2nd ed.) St. Paul: APS Press. Pp. 76-81.
- 17- MARTINS, A.B., J. Semir, R. Goldenberg, and E. Martins. 1996. O gênero *Miconia* Ruiz & Pav. (Melastomataceae) no Estado de São Paulo. Acta bot. bras. 10(2): 267-316.
- 18- MEYER, J. Y., and J. Florence. 1996. Tahiti's native endangered by the invasion of *Miconia calvescens* DC. (Melastomataceae). Journal of Biogeography 23:775-781.
- 19- MEYER, J. Y., and J.P. Malet. 1997. Study and management of the alien invasive tree *Miconia calvescens* DC. (Melastomataceae) in the islands of Raiatea and Tahaa (Society Islands, French Polynesia): 1993-1996. Manoa, Hawaii: Cooperative National Park Resources Studies Unit University os Hawai'i at Manoa. (Technical Report 111)
- 20- MEYER, J. Y. 1996. Status of *Miconia calvescens* (Melastomataceae) a dominant invasive tree in the Society Islands (French Polynesia). Pacific Science 50(1):66-76.
- 21- NORTON, D.N., and T.L. Niblack. 1991. Biology and ecology of nematodes. Pp. 47-72 in W.R. Nickle, ed. Manual of agricultural nematology. New York: Marcel Dekker, Inc.
- 22- ORR, C. C., J. R. Abernathy, and E. B. Hudspeth. 1975. *Nothanguina phyllobia*, a nematode parasite of Silverleaf nightshade. Plant Disease Reporter 59(5):416-418.
- 23- OU, S.H. 1987. Rice diseases. 2nd ed. Pp. 337-361. Slough: CAB.
- 24- OU, X., and A.K. Watson. 1993. Mass culture of *Subanguina picridis* and its biological efficacy on *Acroptilon repens*. Journal of Nematology 25(1):89-94.

- 25- OU, X., and WATSON, A.K. 1992. In vitro culture of *Subanguina pecridis* in *Acroptilon repens* callus, excised roots, and shoot tissues. *Journal of Nematology* 24(1):199-204.
- 26- OU, X., and WATSON, A.K. 1993. Effects of temperature, shoot age, and medium on gall induction by *Subanguina picridis* in vitro. *Journal of Nematology* 25(1):95-100.
- 27- PANTONE, D.J. 1987. Host range of *Anguina amsinckiae* within the genus *Amsinckia*. *Revue Nématol.* 10(1):117-119.
- 28- PARKER, P.E. 1986. Nematode control of Silverleaf Nightshade (*Solanum elaeagnifolium*); a Biological Control Pilot Project. *Weed Science* 34(Suppl. 1):33-34.
- 29- ROBINSON, A.F., C. C. Orr, and J. R. Abernathy. 1978. Distribution of *Nothanguina phyllobia* and its potential control agent for Silver-leaf Nightshade. *Journal of Nematology* 10(4):362-366.
- 30- SCHROEDER, D. 1983. Biological control of weeds. Pp.42-78 in W. W. Fletcher, ed. *Recent advances in weed research*. CAB Publication.
- 31- SKINNER, J.A., C. C. Orr, and A. F. Robinson. 1980. Histopathogenesis of the galls induced by *Nothanguina phyllobia* in *Solanum elaeagnifolium*. *Journal of Nematology* 12(2):141-150.
- 32- SMART, G.C., Jr., and H.M. Darling. 1963. Pathogenic variation and nutritional requirements of *Ditylenchus destructor*. *Phytopathology* 53(4):374-381.
- 33- SOUTHEY, J.F. 1978. *Plant nematology*. London: GDI. 3rd Min. Of Agric., Fisheries & Food. Her Majesty Stationary Office.
- 34- STURHAN D., and M.W Brzeski. 1991. Stem and bulbs nematodes, *Ditylenchus* spp. Pp. 423-464 in W.R. Nickle, ed. *Manual of agricultural nematology*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- 35- WALLACE, H.R. 1973. *Nematode ecology & plant disease*. New York: Crane, Russak & Company Inc.
- 36- WAPSHERE, A.J. 1974. A strategy for evaluating the safety of organisms for biological weed control. *Ann. Appl. Biol.* 77:201-211.
- 37- WAPSHERE, A.J. 1988. Prospects for the biological control of Silver-leaf Nightshade, *Solanum elaeagnifolium*, in Australia. *Aust. J. Agric. Res.* 39:187-197.

- 38- WATSON, A.K. 1986. Biology of *Subanguina picridis*, a potential biological control agent of Russian knapweed. 1986. Journal of Nematology 18(2):149-154.
- 39- WATSON, A.K. 1986. Host range of, and plant reaction to, *Subanguina picridis*. Journal of Nematology 18(1):112-120.
- 40- WATSON, A.K. 1986. Morphological and biological parameters of the knapweed nematode, *Subanguina picridis*. Journal of Nematology 18(2):154-158.
- 41- WEBSTER, R.K., and P.S. Gunnell, eds. 1992. Compendium of rice diseases. St. Paul: APS Press.
- 42- WHITEHEAD, A.G. 1997. Plant nematode control. Wallingford: CAB International.

First report of a phytoplasma-associated witches' broom disease of *Miconia calvescens* in Brazil

C. D. Santos-Seixas, R.W. Barreto* and K. Matsuoka

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 36571-000, Brazil

* rbarreto@mail.ufv.br

Velvet tree (*Miconia calvescens* DC.), a medium size, evergreen tree in the melastome family (Melastomaceae), is native to rain forests of South and Central America. Following its introduction into tropical oceanic island habitats, this species has invaded forested areas. Today, it is regarded as the worst invasive plant species in French Polynesia (Meyer, 1994) and Hawaii (Gagne *et al.* 1996) and threatens the biodiversity of both archipelagos. Since 1995, surveys for diseases have been conducted to identify potential biocontrol agents of velvet tree for introduction into Hawaii. One such pathogen has been introduced (Killgore *et al.* 1999) and others are being evaluated in Brazil and Hawaii.

A 'rosette stunting' was observed affecting young velvet trees growing at Cachoeiras do Macacú, Ilha Grande (State of Rio de Janeiro) and Viçosa (State of Minas Gerais). Plants exhibited shortened internodes, small pink-coloured leaves with long marginal hairs and witches'-brooms (Figs. 1-2). Mealybugs and leafhoppers were also found in association with these plants (Fig. 3). Symptomatology and failure to culture fungi or bacteria from affected plant tissues suggested that *M. calvescens* witches'-broom might be a phytoplasma disease.



Fig. 1. *Miconia calvenscens*: unaffected plant (left) and diseased plant (right).

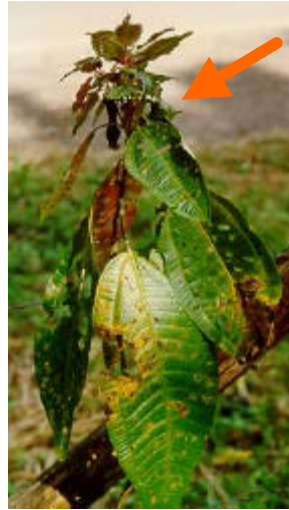


Fig. 2. Plant showing abnormal (arrowed) apical growth.



Fig. 3. Extensive mealybug colonization of *M. calvenscens* accompanied by witches' broom symptoms.

Fresh tissue samples (petioles and main leaf vein) collected from six symptomatic plants and one symptomless plant were prepared for transmission electron microscopy (TEM) as described by Matsuoka & Carvalho (1987). Phytoplasmas, appearing as spherical to ovoid structures of variable sizes, were consistently observed in phloem sieve tubes in diseased plant samples but not in symptomless plant samples by TEM (Fig. 4). These observations are the first to implicate phytoplasma as the likely etiological agent of *M. calvenscens* witches'-broom disease in Brazil.

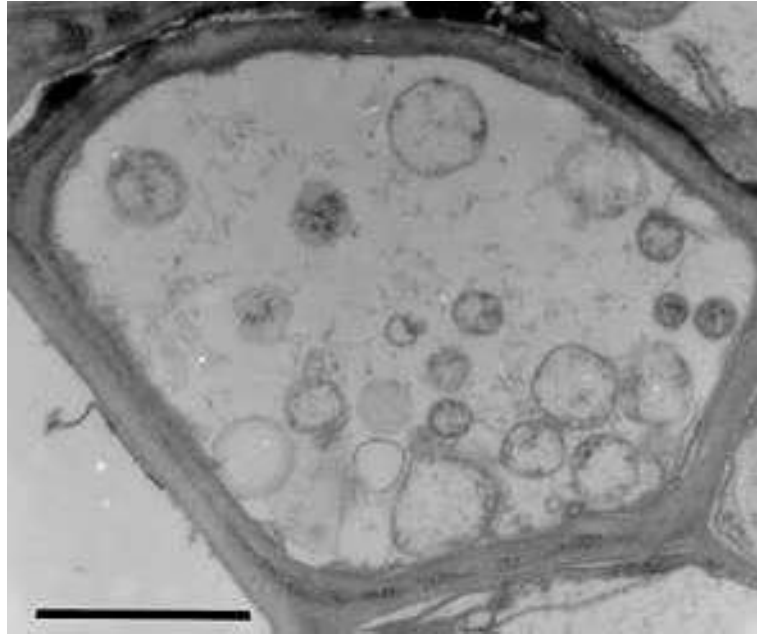


Fig. 4. Phytoplasma colonizing a phloem sieve tube element of *M. calvescens* (Bar = 1 μ m).

In July 2000, a mature velvet tree with initial symptoms of witches' broom disease was found on the campus of the Universidade Federal de Viçosa. Within one year it became moribund and a few remaining shoots were completely broomed. Although the disease is extremely damaging, practical difficulties related to the biotrophic nature of phytoplasmas and their spread by insect vectors are likely to limit its potential use for biocontrol of velvet tree.

References

- Gagne BH, Loope LL, Medeiros AC, Anderson SJ, 1992. *Miconia calvescens*: a threat to native forests of the Hawaiian Islands. *Pacific Science* 46, 390-391.
- Killgore EM, Sugiyama LS, Barreto RW, Gardner, DE, 1999. Evaluation of *Colletotrichum gloeosporioides* for biological control of *Miconia calvescens* in Hawaii. *Plant Disease*, v.83, n.10, p.964-964.
- Matsuoka K, Carvalho MG, 1987. Mycoplasma-like organisms associated with kaki decline in Brazil. *Plant Pathology* 36: 417-419.
- Meyer JY, 1996. Status of *Miconia calvescens* (Melastomataceae) in the Society Islands (French Polynesia). *Pacific Science* 50, 66-78.

CONCLUSÕES GERAIS

- A partir do levantamento, constataram-se os seguintes fitopatógenos em *Miconia calvescens*: fungos - *Coccolliella miconiae* (acne negra), *Corticium* sp., *Guignardia miconiae* sp.nov. (mancha de pixe), *Korunomyces prostratus* sp.nov. (queima foliar), *Melanconium* sp., *Myrothecium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Phomopsis* sp., *Phyllachora* sp., *Pseudocercospora tamonae*, *Pythium* sp.; nematóide - *Ditylenchus drepanocercus* (mancha angular); fitoplasma (envassouramento).
- Nenhum dos métodos de inoculação de *C. miconiae* utilizados resultou em sintomas de acne negra em plantas de *M. calvescens* do biotipo do Brasil e do Havaí.
- As plantas do biotipo do Havaí mantidas no campo não apresentaram sintomas da acne negra, mancha angular ou queima foliar mesmo decorridos 8 meses de exposição ao inóculo dos patógenos. A única doença que se manifestou nestas plantas foi a antracnose (*Glomerella cingulata*).
- Os ascósporos de *C. miconiae* são liberados na presença de umidade e a liberação ocorre na faixa de 5-35°C, mas é maior a temperaturas de 25-35°C.
- A germinação dos ascósporos é favorecida por temperaturas de 20-22°C, presença de luz e água livre.
- A germinação dos ascósporos aumentou quando as folhas foram mantidas após colheita sob temperatura de 5°C por 2 dias.
- Os ascósporos de *C. miconiae* mantêm bom índice de germinação quando folhas infectadas de *M. calvescens* são armazenadas a 10°C por no máximo 6 dias.

- A acne negra ocorre durante todo o ano na região de Viçosa-MG e de Dionísio-MG.
- Em Dionísio-MG, a incidência da Acne Negra correlacionou-se negativamente com a temperatura.
- Em Viçosa-MG, a incidência da Acne Negra não correlacionou-se com nenhuma das variáveis climáticas estimadas. A severidade correlacionou-se negativamente com a temperatura.
- O anamorfo de *C. miconiae* (*Hemidothis* sp.) foi observado durante todo o ano. Sua ocorrência não se correlacionou com as variáveis climáticas estimadas.
- Hiperparasitas sobre estromas de *C. miconiae* ocorreram durante todo o período avaliado. Não houve correlação entre a incidência de hiperparasitas e as variáveis climáticas estimadas.
- Os fungos mais comumente encontrados associados a estromas de *C. miconiae* e supostamente atuando como micoparasitas foram: *Sagenomella alba* var.nov. *synematosa*, *Sagenomella dimorfica* sp.nov., *Cladosporium oxysporum*, *Corynespora cassiicola*, *Redbia annulata* e *Paranectriella juruana*.
- O agente causal da mancha angular em *M. calvescens* é o nematóide *Ditylenchus drepanocercus* Goodey (1953).
- Os nematóides se alojam no parênquima lacunoso provocando hipertrofia das células.
- Em Viçosa-MG, a incidência da mancha angular causada por *D. drepanocercus* não se correlacionou com as variáveis climáticas estimadas no período avaliado.

- Em Dionísio-MG, a incidência da mancha angular causada por *D. drepanocercus* correlacionou-se positivamente com a temperatura e a umidade relativa no período avaliado.
- A flutuação da população de *Ditylenchus drepanocercus*, durante o período avaliado, não se correlacionou com nenhuma das variáveis climáticas estimadas.
- O método mais adequado de inoculação de *D. drepanocercus* foi a aspersão de suspensão contendo indivíduos de diversos estádios de desenvolvimento em folhas feridas previamente.
- O período de incubação de *D. drepanocercus* foi de 20 dias.
- O nematóide infectou, além de *Miconia calvescens*, *Miconia prasina* e *M. phanerostila*.
- O agente causal do envassouramento de *M. calvescens* é um fitoplasma.