**METODOLOGIA DE PRODUÇÃO DE INÓCULO E EFEITO DE
PERÍODOS DE MOLHAMENTO FOLIAR E DA TEMPERATURA
NA INFECCÃO DE PLÂNTULAS DE *Senna obtusifolia* POR
*Alternaria cassiae***

ROBINSON LUIZ DE CAMPOS MACHADO PITELLI

Engenheiro Agrônomo

Orientadora : Profa. Dra. **LILIAN AMORIM**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Agronomia, Área de Concentração: Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Abril - 2002

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Pitelli, Robinson Luiz de Campos Machado

Metodologia de produção de inóculo e efeito de períodos de molhamento foliar e da temperatura na infecção de plântulas de *Senna obtusifolia* por *Alternaria cassiae* / Robinson Luiz de Campos Machado Pitelli. - - Piracicaba, 2002.

53 p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2002.
Bibliografia.

1. Controle biológico 2. Fedegoso 3. Fungos fitopatogênicos 4. Manejo integrado
I. Título

CDD 632.58

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

A

Meu pai **ROBINSON ANTONIO PITELLI**

Minha mãe **MARIA ANGÉLICA DE CAMPOS MACHADO PITELLI**

Minha irmã **ANGÉLICA MARIA DE CAMPOS MACHADO PITELLI**

Às pessoas que me amam e me apoiam, especialmente
meus pais e minha irmã, por serem meus pilares.

À minha avó, por ser a pessoa que me ensinou a
valorizar a vida e a importância da família.
À minha avó, por ser a pessoa que me ensinou a
valorizar a vida e a importância da família.
À minha avó, por ser a pessoa que me ensinou a
valorizar a vida e a importância da família.

DEDICO ESTA DISSERTAÇÃO.

Ao meu pai, Robinson Antonio Pitelli, por ser meu pai.

Ao meu pai, Robinson Antonio Pitelli, por ser meu pai.

À minha avó, por ser a pessoa que me ensinou a

valorizar a vida e a importância da família.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento especial à Professora Lilian Amorim cuja orientação, ensinamentos e amizade me guiaram na realização deste trabalho.

Agradecimento especial ao Professor Hiroshi Kimati pelos ensinamentos, idéias e amizade que tornaram possível a realização deste trabalho.

À FAPESP agradeço pelo incentivo oferecido à minha pesquisa e por tornar possível a realização deste trabalho.

À amiga Marise C. Martins agradeço pelos ensinamentos, amizade, confiança e incentivo durante meu estágio na Clínica Fitopatológica.

Aos amigos de Clínica Fitopatológica Ivan Hermman Fischer e Renata Rodrigues de Almeida agradeço pela amizade e companherismo.

À amiga Silvia de Afonseca Lourenço agradeço pela amizade e incentivo sempre presentes e pelo grande auxílio na concretização deste trabalho.

Às amigas Rosângela, Marina e Claudia agradeço pela grande auxílio oferecido no início de minha estada em Piracicaba.

Aos amigos Jéferson, Marina, Heloísa, Fernanda, Rodolfo e Pedro agradeço pela amizade e auxílio.

Aos colegas Marcel, Nilceli, Júlio, Silvio, Danilo, Luis, Luis Rabelo, Marília, David, Paulo, Solange, Alexandre, Ana Paula, Leonardo, Nelson, Elaine, Ana Carolina e Waldir agradeço pela amizade.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xii
SUMMARY	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 <i>Senna obtusifolia</i>	3
2.2 Uso de <i>Alternaria cassiae</i> no controle de <i>Senna obtusifolia</i>	4
2.3 Esporulação de <i>Alternaria</i> spp.	7
3 MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Efeito de diferentes meios de cultura sólidos na esporulação de <i>Alternaria cassiae</i>	10
3.2 Efeito de diferentes meios de cultura líquidos na esporulação de <i>Alternaria cassiae</i>	13
3.3 Efeito de diferentes períodos de molhamento foliar na infecção de plântulas de <i>Senna obtusifolia</i> por <i>Alternaria cassiae</i>	15
3.4 Efeito de diferentes períodos de molhamento foliar e da temperatura na infecção de plântulas de <i>Senna obtusifolia</i> por <i>Alternaria cassiae</i>	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 Efeito de diferentes meios de cultura sólidos na esporulação de <i>Alternaria cassiae</i>	18

4.2 Efeito de diferentes meios de cultura líquidos na esporulação de <i>Alternaria cassiae</i>	21
4.3 Efeito de diferentes períodos de molhamento foliar na infecção de plântulas de <i>Senna obtusifolia</i> por <i>Alternaria cassiae</i>	24
4.4 Efeito de diferentes períodos de molhamento foliar e da temperatura na infecção de plântulas de <i>Senna obtusifolia</i> por <i>Alternaria cassiae</i>	33
5 CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
APÊNDICES	49

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Efeito de períodos de molhamento foliar na evolução da incidência da doença causada por <i>Alternaria cassiae</i> em <i>Senna obtusifolia</i> . Dados do primeiro experimento: círculos representam médias de cinco repetições, barras representam o erro padrão da média, e linhas correspondem ao modelo de ajuste monomolecular	26
2 Efeito de períodos de molhamento foliar na evolução da incidência da doença causada por <i>Alternaria cassiae</i> em <i>Senna obtusifolia</i> . Dados do primeiro experimento: círculos representam médias de cinco repetições, barras representam o erro padrão da média, e linhas correspondem ao modelo de ajuste monomolecular	27
3 Efeito dos períodos de molhamento foliar sobre a desfolha relativa (%) de plântulas de <i>Senna obtusifolia</i> por <i>Alternaria cassiae</i> . Círculos pretos correspondem aos dados do primeiro experimento e círculos vermelhos, aos do segundo experimento. A linha representa o modelo de ajuste monomolecular	28
4 Efeito do período de molhamento foliar na matéria seca (g) das plantas fedegoso no primeiro (a) e segundo experimento (b) 14 dias após a inoculação	29
5 Progresso da mortalidade de plântulas de <i>Senna obtusifolia</i> inoculadas com <i>Alternaria cassiae</i> no primeiro experimento sob temperaturas de 20°C (a, b, c), 23°C (d, e, f) e 26° C (g, h, i) e períodos de molhamento foliar após a inoculação de 8 (a, d, g), 12 (b, e, h) e 16 (c, f, i) horas	34
6 Progresso da mortalidade de plântulas de <i>Senna obtusifolia</i> inoculadas com <i>Alternaria cassiae</i> no segundo experimento sob temperaturas de 20°C (a, b, c), 23°C (d, e, f) e 26° C (g, h, i)	

e períodos de molhamento foliar após a inoculação de 8 (a, d, g), 12 (b, e, h) e 16 (c, f, i) horas	35
7 Progresso da mortalidade de plântulas de <i>Senna obtusifolia</i> inoculadas com <i>Alternaria cassiae</i> no terceiro experimento sob temperaturas de 20°C (a, b, c), 23°C (d, e, f) e 26° C (g, h, i) e períodos de molhamento foliar após a inoculação de 8 (a, d, g), 12 (b, e, h) e 16 (c, f, i) horas	36
8 Efeito de diferentes temperaturas e períodos de molhamento foliar na mortalidade de plântulas de <i>Senna obtusifolia</i> infectadas por <i>Alternaria cassiae</i>	39
9 Efeito de diferentes temperaturas e períodos de molhamento foliar na matéria seca relativa de plântulas remanescentes de <i>Senna</i> <i>obtusifolia</i> após infecção por <i>Alternaria cassiae</i>	40

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Efeito de meios de cultura sólidos na esporulação de <i>Alternaria cassiae</i> em oito experimentos independentes.....	19
2 Efeito de meios de cultura líquidos na esporulação de <i>Alternaria cassiae</i> em quatro experimentos independentes.....	22
3 Efeito de períodos de estresse mecânico e de períodos de luz durante secagem do micélio cultivado em meio líquido de suco de tomate na esporulação de <i>Alternaria cassiae</i> em três experimentos independentes	22
4 Parâmetros estatísticos obtidos através das equações monomoleculares $y=b_1*(1-b_2*\exp((-b_3*X))$, onde y é a incidência da doença (folíolos mortos), x é o molhamento foliar (horas), R é o coeficiente de correlação e b1, b2 e b3 são parâmetros estimados pelo modelo	28
5 Parâmetros do modelo monomolecular ($y= b_1*(1-b_2*\exp(-b_3*x))$, onde y é a severidade da doença, b1, b2 e b3 são parâmetros estimados pelo modelo e x é a variável independente) ajustados às curvas de progresso da mortalidade de plântulas de <i>Senna obtusifolia</i> por <i>Alternaria cassiae</i> , sob as temperaturas de 20, 23 e 26° C e períodos de molhamento foliar após a inoculação de 8, 12 e 16 horas, no experimento 1.....	37
6 Parâmetros do modelo monomolecular ($y= b_1*(1-b_2*\exp(-b_3*x))$, onde y é a severidade da doença, b1, b2 e b3 são parâmetros estimados pelo modelo e x é a variável independente) ajustados às curvas de progresso da mortalidade de plântulas de <i>Senna obtusifolia</i> por <i>Alternaria cassiae</i> , sob as temperaturas de 20, 23 e 26° C e períodos de molhamento foliar após a inoculação de 8, 12 e 16 horas, no experimento 2.....	37

- 7 Parâmetros do modelo monomolecular ($y = b_1 * (1 - b_2 * \exp(-b_3 * x))$, onde y é a severidade da doença, b_1 , b_2 e b_3 são parâmetros estimados pelo modelo e x é a variável independente) ajustados às curvas de progresso da mortalidade de plântulas de *Senna obtusifolia* por *Alternaria cassiae*, sob as temperaturas de 17, 23 e 30° C e períodos de molhamento foliar após a inoculação de 8, 12 e 16 horas, no experimento 3..... 38
- 8 Parâmetros estatísticos obtidos pelos modelos de ajuste dos gráficos ao modelo $Z = b_1 + b_2 * x + b_3 * y + b_4 * x * y + b_5 * x^2 + b_6 * y^2$, onde z é a variável dependente, x é a temperatura (°C), y é o molhamento foliar (horas) e b_1 , b_2 , b_3 , b_4 , b_5 e b_6 são parâmetros estimados pelo modelo..... 40

METODOLOGIA DE PRODUÇÃO DE INÓCULO E EFEITO DE PERÍODOS DE MOLHAMENTO FOLIAR E DA TEMPERATURA NA INFECÇÃO DE PLÂNTULAS DE *Senna obtusifolia* POR *Alternaria cassiae*

Autor : ROBINSON LUIZ C. M. PITELLI

Orientador : Profª. Dra. LILIAN AMORIM

Resumo

Senna obtusifolia é uma planta daninha da família Leguminosae outrora conhecida como *Cassia obtusifolia*. Esta espécie, conhecida popularmente por fedegoso, pode ser encontrada nos EUA e nas regiões tropicais da América, Ásia e África. Embora seja muito comum em áreas agrícolas brasileiras, é altamente problemática apenas à cultura da soja na região Centro-oeste. O fungo *Alternaria cassiae* foi descoberto em 1960, mas apenas em 1981 foi demonstrado seu potencial como agente de controle biológico de plantas de *Senna obtusifolia*. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de baixo custo para esporulação massal de *Alternaria cassiae* e estudar o efeito de períodos de molhamento foliar e de diferentes temperaturas na infecção e colonização de *Senna obtusifolia* por *Alternaria cassiae*. A técnica de esporulação em meio sólido é baseada na raspagem do micélio aéreo e exposição do fungo a regimes de 12 horas de luz por 24 horas de escuro. O meio V8 sólido foi o melhor meio para esporulação do fungo seguido pelo meio de suco de tomate. Em meio líquido, a esporulação é induzida após trituração do micélio em liquificador seguido da secagem em placas forradas com papel de filtro as quais são submetidas a 12 horas de luz por 24 horas de escuro. O meio

de suco de tomate foi o melhor meio para esporulação do fungo em meio líquido. Plantas de fedegoso foram inoculadas com *A. cassiae* e submetidas a diferentes períodos de molhamento foliar (4, 6, 8, 12, 24 e 48h) sob temperatura constante de 25°C. A incidência da doença (número de folíolos mortos) foi maior em plantas submetidas a períodos prolongados de molhamento foliar aplicados imediatamente após a inoculação (24 e 48h). Plantas não submetidas a molhamento foliar após a inoculação não apresentaram sintomas. O acúmulo final de matéria seca das plantas diminuiu conforme aumentou o período de molhamento foliar. O efeito conjunto da temperatura e do período de molhamento foliar foi avaliado mediante inoculação de plantas de fedegoso com *A. cassiae* e incubação em cinco temperaturas (17, 20, 23, 26 e 30°C) e três períodos de molhamento foliar (8, 12 e 16h). Sob temperaturas mais baixas (17, 20 e 23°C), a incidência da doença (mortalidade relativa) foi mais alta com períodos de molhamento foliar de 8 e 12 horas quando comparada com temperaturas mais altas (26 e 30°C). Plantas submetidas a período de molhamento foliar de 16 horas não apresentaram diferenças quanto à temperatura de incubação, com exceção da temperatura de 30°C. O acúmulo final de matéria seca também apresenta a mesma tendência, ocorrendo portanto um maior acúmulo em temperaturas mais altas.

**INOCULUM PRODUCTION METHODOLOGY AND EFFECT OF DEW
PERIOD AND TEMPERATURE ON *Senna obtusifolia* INFECTION BY
*Alternaria cassiae***

Author : ROBINSON LUIZ C. M. PITELLI

Adviser : Prof. Dr. LILIAN AMORIM

Summary

Senna obtusifolia is a weed from Leguminosae botanical family classified also as *Cassia obtusifolia*. This species, known popularly as sicklepod, can be found in USA and tropical regions of Africa, Asia and America. Although it is very common in Brazilian agriculture lands, the major problems occur in middle-west soybean production areas. The fungus *Alternaria cassiae* was discovered in 1960, but it's potential for biological control of sicklepod was only demonstrated in 1982. The objective of this research was to develop a cost effective method for sporulation of *Alternaria cassiae* and to study the effects of different dew periods and temperatures on infection of *S. obtusifolia* by *A. cassiae*. Sporulation in solid medium was based on removal of aerial mycelium and exposition of Petri dish to 12 hours of light and 24 hours of dark. The medium V8 agar gave the best sporulation being followed by tomato juice medium. In liquid medium, sporulation was induced after mowing the mycelium in a blender and disposing it on a Petri dish covered with filter paper that were submitted to 12 hours of light followed by 24 hours of dark. Tomato juice medium was the best liquid medium for *A. cassiae* sporulation. Sicklepod plants were inoculated with *A. cassiae* and

incubated under 25°C and different dew periods (4, 6, 8, 12, 24 and 48h). The disease incidence (number of dead leafs) was greater on plants under longer dew periods submitted just after inoculation (24 and 48h). Plants that were not submitted to dew periods did not show any symptoms. The final dry matter accumulation decreased as the dew period increased. The combined effects of dew periods and temperatures were evaluated by submitting sicklepod plants inoculated with *A. cassiae* to five different temperatures (17, 20, 23, 26 and 30°C) and three different dew periods (8, 12 and 16 hours). Under lower temperatures (17, 20 e 23°C) disease incidence (relative mortality) was greater at 8 and 12 hours of dew period when compared with higher temperatures (26 and 30°C). Plants submitted to 16 hours of dew period did not show differences between incubation temperatures, with exception of 30°C treatment. The final dry matter accumulation also showed the same tendency, with greater accumulation under higher temperatures.

1 INTRODUÇÃO

Os crescentes problemas ocorridos a nível mundial devido ao impacto ambiental causado pela utilização excessiva de defensivos agrícolas têm estimulado governos de várias regiões do mundo a investir no desenvolvimento de técnicas alternativas de controle de plantas invasoras de agroecossistemas (Pitelli, 1998). Neste contexto, o controle biológico de plantas daninhas por fitopatógenos representa uma alternativa segura sob o ponto de vista ambiental para o manejo de plantas invasoras. O controle biológico de plantas daninhas foi definido por Watson (1991) como sendo “uma técnica que utiliza organismos vivos para controlar ou reduzir a população de uma espécie indesejável de planta daninha”. Três estratégias têm sido adotadas na utilização de agentes de controle biológico para o controle de plantas daninhas: a estratégia clássica, que consiste na liberação de um patógeno ou predador em uma área infestada, de modo que este se estabeleça no ambiente e se auto-perpetue; a estratégia inundativa ou do bioherbicida, que se baseia na inoculação de doses massais de inóculo quando a planta se encontra em um estágio de crescimento particularmente suscetível; a estratégia aumentativa, na qual após a liberação do agente biológico, o inóculo é periodicamente aumentado pela re-introdução do agente em pontos determinados, visando atingir níveis significativos de doença a partir de um número de plantas infectadas. A estratégia que será abordada neste trabalho será a estratégia inundativa ou do bioherbicida.

Bioherbicidas podem ser definidos como agentes de controle biológico aplicados na população das plantas daninhas do mesmo modo que herbicidas químicos. A diferença é que no caso de um bioherbicida, o ingrediente ativo é um microorganismo vivo. Diversos microorganismos, agentes de controle biológico, têm sido estudados

visando sua utilização como bioherbicidas, incluindo o fungo *Alternaria cassiae* Jurair & Khan (1960) que tem demonstrado potencial para controle biológico de fedegoso (*Senna obtusifolia* L.).

O conhecimento de um método de intensa produção de inóculo e das condições ambientais favoráveis para o processo de infecção de agentes fitopatogênicos de controle de plantas daninhas são de grande importância para se estabelecer um programa eficiente de controle biológico. No caso específico do isolado de *Alternaria cassiae* coletado no Brasil, não há informações sobre as condições ambientais ideais para infecção e poucos são os trabalhos sobre produção massal de inóculo. Os objetivos deste trabalho foram : 1) a elaboração de um método prático e eficiente de produção massal de conídios de *Alternaria cassiae*, tendo como variável principal a constituição do meio de cultura; 2) avaliação dos efeitos de diferentes períodos de molhamento foliar e da temperatura na infecção de plântulas de *Senna obtusifolia* pelo isolado brasileiro de *Alternaria cassiae*. O conhecimento destes parâmetros epidemiológicos e destas técnicas de esporulação serão importantes para a utilização, no Brasil, do controle biológico de *Senna obtusifolia* como medida complementar num programa de manejo integrado de plantas daninhas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Senna obtusifolia*

Senna obtusifolia (L.) Irwin & Barneby é uma designação atualizada da planta daninha outrora conhecida como *Cassia obtusifolia* L. A designação atual foi derivada de uma revisão geral da taxonomia e sistemática da família Leguminosae realizada por pesquisadores do Kew Botanic Garden da Inglaterra (Kissmann & Groth, 1992). Segundo Irwin (1960), esta espécie, conhecida popularmente por fedegoso, pode ser encontrada nos EUA e nas regiões tropicais da América, Ásia e África.

Teem et al. (1980) relataram que, nos Estados Unidos, o fedegoso tem distribuição generalizada desde a Flórida até a Pensilvania, Illinois e Michigan e região oeste do Texas, Oklahoma e Kansas. No final da década de 70, foi considerada como planta daninha problemática em onze estados do sudeste americano. Em 1983, o fedegoso foi considerado como a quinta planta daninha mais importante daquela região (McWhorter & Sciumbato, 1988). No Brasil, *S. obtusifolia* é conhecida por vários nomes populares, destacando-se fedegoso e cafezinho. Esta planta está amplamente distribuída, sendo encontrada por todo o território nacional infestando principalmente pastagens e terrenos baldios (Lorenzi, 1991). Embora seja muito comum em áreas agrícolas, é altamente problemática apenas à cultura da soja na região Centro-oeste (Kissmann & Groth, 1992). A utilização de herbicidas seletivos é destacada por Pitelli (1992) como a principal causa do aumento da importância do fedegoso na cultura da soja. A maior ocorrência na região Centro-oeste provavelmente seja devido à existência de um grande banco de sementes no solo, pois, anteriormente à cultura da soja, as pastagens daquela região eram altamente infestadas por esta planta daninha.

A grande importância do fedegoso como planta daninha deve-se a várias características que favorecem seu estabelecimento em áreas agrícolas. Teem et al. (1980) demonstraram que plântulas foram capazes de emergir do solo, após 9 dias, numa semeadura de até 12,7 cm de profundidade. Das sementes postas a germinar a 2,5 cm de profundidade, 63% deram origem a plântulas em 3 dias. Este comportamento constitui uma vantagem para essa planta daninha, pois as sementes são capazes de iniciar sua germinação em grandes profundidades sem entrar em contato com herbicidas pré-emergentes e herbicidas incorporados ao solo. Além disso, a rapidez e a alta porcentagem de germinação e de emergência das plântulas permitem antecipação e melhor ocupação dos recursos disponíveis no agroecossistema em relação à planta cultivada. As sementes de *S. obtusifolia* possuem alta impermeabilidade à água (Creel et al., 1968), permitindo que sua germinação ocorra de forma descontínua. As plantas são altamente prolíferas, produzindo de 800 a 12000 sementes por planta, dependendo do local, precipitação, biotipo e densidade (English & Oliver, 1981; Issac et al. 1989).

Murray et al. (1976) observaram que sementes de fedegoso sob condições de baixa umidade do substrato (-9 bars) atingiram até 21% de germinação, enquanto que sementes de soja, nas mesmas condições, não conseguiram germinar, o que constitui outra vantagem na ocupação dos solos agrícolas, geralmente arados e gradeados em condições de baixa umidade. Logo após o preparo do solo, o fedegoso pode iniciar seu processo germinativo, sem exigência de uma chuva adicional.

Muitos trabalhos têm feito referência aos efeitos da interferência do fedegoso na produtividade da soja. Thurlow & Buchanan (1972) observaram uma relação linear negativa entre a densidade de *S. obtusifolia* e a produtividade da soja. A presença de uma planta de fedegoso por metro quadrado foi capaz de reduzir a produção da soja em 3,7%. Bozsa (1989) observou perda de 30% na produção da soja pela interferência de 3,3 plantas de fedegoso por metro linear, semeadas próximas ao sulco da soja, simulando os escapes do controle mecânico.

2.2 Uso de *Alternaria cassiae* no controle de *Senna obtusifolia*

A espécie *Alternaria cassiae* foi primeiramente descoberta no Paquistão, em 1960 e classificada por Jurair & Khan. Nos Estados Unidos este patógeno foi isolado de plântulas de *Senna obtusifolia* (L.) Irwin & Barneby doentes que foram cultivadas em casa-de-vegetação a partir de uma coleção de sementes coletadas no verão de 1977 nas proximidades de Richton, Estado do Mississippi (Walker, 1982). Mas apenas em 1981 foi demonstrado seu potencial como agente de controle biológico de plantas de *Senna obtusifolia* (Bannon, 1988).

Walker (1982) avaliou a especificidade de *Alternaria cassiae* com relação ao hospedeiro. Suspensões de conídios de *A. cassiae* foram pulverizadas em 30 espécies pertencentes a 9 famílias botânicas diferentes entre os estádios de folhas cotiledonares e primeiro par de folhas verdadeiras. Dentre as espécies testadas estão incluídas plantas de girassol (*Helianthus annuus*), melão (*Cucumis melo*), melancia (*Citrillus lanatus*), milho (*Zea mays*), amendoim (*Arachis hypogaea*), soja (*Glycine max*), algodão (*Gossypium hirsutum*) e tomate (*Lycopersicon esculentum*), entre outras. O autor verificou que apenas plantas de *Senna obtusifolia* e *Crotalaria spectabilis* foram suscetíveis ao patógeno. A maioria das plântulas de fedegoso morreu após 2 a 7 dias. O patógeno causou lesões necróticas de 1 a 5 mm de diâmetro nas folhas e ramos dois dias após a inoculação. As lesões aumentaram com o tempo e causaram cancos severos nos ramos e desfolha após 7 dias.

A susceptibilidade do fedegoso (*Senna obtusifolia*) ao patógeno, quando aplicado na concentração de 10^5 conídios/mL, é alta quando a planta se encontra entre os estádios de folhas cotiledonares e primeiro par de folhas verdadeiras, ocorrendo mortalidade de 96% das plantas inoculadas (Walker & Ridley, 1982). Após este estágio, ocorre queda da susceptibilidade da planta. No trabalho de Walker e Ridley (1982) indivíduos inoculados no estágio de quatro folhas sofreram apenas redução do acúmulo de matéria seca. Estudando o efeito do período de orvalho na infecção de plântulas de fedegoso pelo isolado americano de *A. cassiae*, estes autores observaram que uma redução de 95% a 100% no número de plantas ocorria quando estas eram inoculadas com suspensão de 10^5 conídios/mL e submetidas a um período de 8 horas de câmara úmida. Com relação à concentração de inóculo necessária para um controle efetivo da

planta daninha, um controle superior a 90% foi obtido somente quando se inoculou uma suspensão de conídios igual ou superior a 10^4 conídios/mL. A suspensão de conídios em todos os experimentos era pulverizada até o ponto de escorrimento superficial. Utilizando um período de orvalho de 8 horas, os autores verificaram que o máximo de controle de plântulas de fedegoso ocorreu quando a temperatura durante o período de orvalho estava compreendida entre 20 e 30°C. Houve uma dramática redução no dano causado por *A. cassiae* nas temperaturas menores de 20°C e/ou maiores que 30°C.

Charudattan et al. (1986) estudaram a eficácia de *Alternaria cassiae* como bioherbicida em testes regionais no campo. O trabalho foi realizado em cinco estados americanos (Arkansas, Florida, Mississippi, Carolina do Norte e Carolina do Sul) onde infestações naturais ou semeadas de fedegoso foram pulverizadas com suspensão de 10^6 esporos/mL quando as plantas encontravam-se entre os estádios de folhas cotiledonares e primeiro par de folhas verdadeiras. Foram realizadas duas aplicações do patógeno espaçadas de uma semana e foram realizadas comparações entre as duas aplicações com respeito ao número de plantas controladas ou severamente atacadas por m² de área amostrada. O fungo causou um controle superior a 70% na primeira aplicação em todos os campos, com exceção do Estado de Arkansas onde um período de veranico tornou as condições não ideais para a infecção. Na segunda aplicação do fungo houve um controle superior a 80% da população da planta daninha em todos os estados. Estes resultados comprovaram que a espécie *Alternaria cassiae* é efetiva no controle do fedegoso em diferentes condições ambientais e tipos de solo. O fungo demonstrou ser um excelente agente de controle biológico e um candidato ideal a bioherbicida.

Van Dyke & Haning (1983) avaliaram o efeito de aplicações foliares de *Alternaria cassiae* em *Senna obtusifolia* em testes regionais realizados em condições de campo. Os autores pulverizaram uma suspensão de 10^6 conídios/mL de *A. cassiae* sobre uma população de *S. obtusifolia* de uma cultura de soja e observaram que após 15 dias, 100% das plântulas estavam infectadas e 96% apresentavam-se praticamente mortas. Em outro ensaio, o patógeno foi pulverizado sequencialmente num intervalo de 7 dias e ocorreu 99% de morte das plântulas num prazo de 14 dias. A seletividade para a cultura da soja foi completa.

Walker & Boyette (1986), estudando o efeito da sequência de períodos de orvalho no biocontrole de *S. obtusifolia* por *A. cassiae*, demonstraram que um único período de 6 a 8 horas de orvalho é necessário para que ocorra de 90 a 100% de mortalidade em plântulas de fedegoso. Estes autores, avaliaram também o efeito do atraso no período de orvalho (8 horas de orvalho) após inoculação do patógeno, verificando que uma maior mortalidade de plântulas de fedegoso ocorreu quando o molhamento foliar era fornecido até dois dias após inoculação. Quando o orvalho era atrasado 3 ou mais dias, havia uma significativa redução no número de plântulas mortas.

Pitelli et al. (1998) avaliaram o efeito do adensamento de plantio da soja no controle biológico de fedegoso por *Alternaria cassiae* e *Pseudocercospora nigrigans*. Os autores não verificaram efeito da densidade de plantio da soja no controle da planta daninha pelos fungos. Em todas as densidades testadas, a espécie *Alternaria cassiae* foi mais efetiva no controle da planta daninha do que *P. nigrigans*.

Outras espécies de *Alternaria* também requerem um período mínimo maior que seis horas de orvalho para que a infecção seja bem sucedida. Green & Bailey (2000) demonstraram que a formação de apressório em *Alternaria cirsinoxia* ocorreu igualmente nas temperaturas de 10, 15, 25 e 30°C desde que fosse fornecido um período mínimo de orvalho de 8 horas. Walker (1981) demonstrou que *Alternaria macrospora* necessita de um período de orvalho de 6 horas para causar infecção em 100% das plantas de *Anoda cristata* inoculadas por pulverização de suspensão de conídios ($2,5 \times 10^5$ conídios/mL). As plantas foram inoculadas no estágio de folhas cotiledonares e primeiro par de folhas verdadeiras, em que a planta se encontra mais suscetível ao patógeno.

2.3 Esporulação de *Alternaria* spp.

Um requisito essencial para a escolha de um patógeno candidato a bioherbicida é sua capacidade de produzir, com relativa facilidade, estruturas infectivas que, no caso de *A. cassiae*, são os conídios. Aparentemente todas as espécies de *Alternaria*, em particular as espécies patogênicas, contêm isolados que diferem entre si quanto ao número de esporos produzidos e quanto aos requerimentos para indução de esporulação.

Alguns isolados mantêm seu potencial esporulativo por anos, enquanto outros cessam sua produção de esporos após um curto período de tempo em meio de cultura. A maioria dos isolados não esporula “in vitro” sem uma forte indução com luz UV ou luz do sol, enquanto alguns produzem esporos após uma leve indução. Devido a tal variabilidade, excelentes fórmulas para esporulação desenvolvidas em alguns laboratórios têm falhado em outros (Rotem, 1994).

Walker (1982) desenvolveu uma metodologia para aumentar a produção de esporos onde o fungo era cultivado em um fermentador contendo meio de cultura composto por suco V8, carbonato de cálcio, sacarose e água destilada. O micélio coletado era agitado em um liquificador e depositado sobre bandejas que foram submetidas à luz solar por 20 a 30 minutos seguidos de 48 a 72 horas de escuro (23-25 °C). O autor observou uma produção média de 1,5 g de conídios por cada bandeja. Estes aglomerados de conídios apresentavam uma concentração de aproximadamente 9×10^7 conídios por grama.

Shabin & Shepard (1979) descreveram uma técnica eficiente de esporulação de espécies de *Alternaria*. Colônias do fungo foram cultivadas em placas de Petri contendo diferentes meios de cultura e após 72 horas o micélio foi cortado em blocos de 4 mm² os quais foram posicionados na superfície de um meio de esporulação contendo sacarose, carbonato de cálcio, ágar e água destilada (pH 7,4). As placas foram incubadas a 18°C no escuro por um período de 24 horas e foi verificada grande esporulação do fungo nos blocos e no meio de esporulação. Estes autores também verificaram que a falta de cálcio inibiu a esporulação do fungo.

Douglas & Pavék (1971) cultivaram *Alterania solani* em meio BDA e após 14 dias de crescimento, o micélio foi cortado com uma alça de platina em blocos com 4 mm de lado e colocados em um frasco erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL de água destilada esterilizada. Após vigorosa agitação do frasco por 1 minuto, uma alíquota de 1 mL do líquido foi depositada em uma placa de Petri contendo meio BDA modificado. As placas foram incubadas a 20°C e luz constante. Após 6 dias os autores observaram intensa esporulação sobre toda a superfície do ágar.

O fungo *Alternaria cassiae* isolado de *S. obtusifolia* no Brasil está armazenado no Laboratório de Controle Biológico de Plantas Daninhas do CENARGEM, EMBRAPA (Nemoto, 1997). Nenhum estudo envolvendo requerimentos nutricionais para sua esporulação massal ou requerimentos ambientais (temperatura e períodos de molhamento) para sua infecção foi conduzido até o momento com esse isolado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Efeito de diferentes meios de cultura sólidos na esporulação de *Alternaria cassiae*

O inóculo de *Alternaria cassiae* utilizado nesta primeira fase do trabalho foi constituído de conídios do isolado cedido pelo Laboratório de Controle Biológico de Plantas Daninhas do Cenargen, situado em Brasília, DF. Os esporos do fungo foram suspensos em água esterilizada e um pequeno volume desta suspensão foi depositado e espalhado sobre a superfície de uma placa de Petri contendo meio ágar-água. A placa foi incubada sob condições de laboratório com luminosidade constante até a germinação dos esporos e desenvolvimento de hifas. Fragmentos de hifas foram transferidos para placas contendo meio de cultura BDA, sendo estas incubadas a temperatura ambiente. O micélio desenvolvido sobre o BDA foi utilizado como inóculo para repicagem nos meios estudados.

Todos os meios de cultura, após receberem três discos de micélio, foram incubados a temperatura de 25°C por um período de 7 a 10 dias, ou até que o micélio cobrisse a maior parte da área do meio de cultura. A metodologia utilizada foi baseada na trabalho de Fancelli (1991) para esporulação de *Alternaria solani* e *A. solani* f. sp. *lycopersici*. No interior da câmara de fluxo laminar, um determinado volume de água esterilizada foi depositado sobre o micélio do fungo de modo que o líquido cobrisse toda a superfície do ágar. Com uma lâmina de microscópio flambada em álcool realizou-se uma raspagem da superfície de modo a retirar todo micélio aéreo, o qual era depositado em um béquer juntamente com o excesso de água. Apenas o micélio que se desenvolveu no interior do ágar permaneceu no meio de cultura. Após a raspagem, as placas, sem a

tampa, foram incubadas sob condições de luz fluorescente constante e temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) por um período de 12 horas. As placas, finalizado o período de luz, foram fechadas e incubadas sob condições de escuro constante e temperatura mais baixa ($\pm 22^{\circ}\text{C}$) por um período de 48 horas.

A avaliação da esporulação foi realizada mediante deposição de um volume de 20 mL de água destilada sobre a superfície do micélio do fungo. Os esporos produzidos foram deslocados mediante raspagem da superfície do ágar com uma alça de Drigalski e depositados em um béquer de 100 mL. O número de esporos produzidos por placa foi avaliado mediante duas contagens sucessivas em câmara de Neubauer totalizando quatro contagens por unidade experimental (placa de Petri).

Os meios de cultura estudados para a indução de esporulação do isolado brasileiro de *Alternaria cassiae* com seus respectivos constituintes por litro de meio foram :

- **Meio V8** : 200 mL de suco comercial V8 (100% Vegetable Juice) + 3,2 g CaCO_3 + 18 g ágar;
- **Meio de Folha de Fedegoso** : 40 g de folhas de fedegoso foram colocadas em um béquer juntamente com 1 litro de água destilada e aquecidas em microondas por um período de 10 minutos ou até a fervura. A solução resultante foi coada, completada para um litro e recebeu 18 g de ágar;
- **Meio de Folha de Fedegoso com CaCO_3** : Meio de folha de fedegoso 40 g/L com adição de 3,2 g CaCO_3 e 18 g ágar;
- **BDA + Folha de Fedegoso** : Este meio foi composto pela união dos meios BDA e Folha de fedegoso na proporção de 1:1.
- **Meio de Semente de Fedegoso** : 200 g de sementes de fedegoso foram aquecidas juntamente com 1 litro de água destilada até a fervura. A solução resultante foi coada e a ela acrescentados 18 g de ágar;
- **Meio Batata + Semente de fedegoso** : A solução resultante da fervura de 200 g de batata em 1 litro de água destilada foi misturada à solução resultante da fervura de 200 g de semente de fedegoso em 1 litro de água destilada nas

proporções de 1:1, 1:2 e 2:1 (v/v); e à mistura resultante (1 L) foram acrescentados 18 g de ágar.

- **Semente de Fedegoso + 20 g/L Dextrose** : À solução resultante da fervura de 200 g de semente de fedegoso em 1 litro de água destilada foram adicionados 20 g de dextrose e 18 g de ágar.
- **Semente de Fedegoso + 10 g/L Dextrose** : À solução resultante da fervura de 200 g de semente de fedegoso em 1 litro de água destilada foram adicionados 10 g de dextrose e 18 g de ágar.
- **BDA** : À solução resultante da fervura de 200 g batata em 1 litro de água destilada foram adicionados 20 g de dextrose e 18 g de ágar.
- **Aveia** : 40 g de aveia + 14 g de ágar por litro de água destilada
- **Caldo de cenoura + Dextrose** : À solução resultante da fervura de 200 g de cenoura em 1 litro de água destilada foram adicionados 20 g de dextrose e 18 g de ágar.
- **Tomate** : Em 200 mL de suco de tomate Superbom foram adicionados 3,2 g de CaCO_3 , 18 g de ágar e o volume completado para 1 litro com água destilada.
- **Purê de Cenoura** : 200 g de cenoura foram fervidas em água destilada. Após a fervura todo o conteúdo foi batido em liquidificador e coado em peneira de malha fina. A solução resultante foi depositada em um erlenmeyer, acrescido de 18 g de ágar e o volume completado para 1 litro com água destilada.
- **Purê de Cenoura + Dextrose** : Ao meio purê de cenoura acima descrito foram adicionados 20 g/L de dextrose.

Todos os meios foram autoclavados por 20 minutos a 1 atm de pressão antes de serem vertidos para placas de Petri.

O delineamento experimental utilizado nestes ensaios foi o inteiramente casualizado com 6 repetições. A análise dos resultados foi realizada mediante comparação de médias entre os tratamentos utilizando para tal o teste de Tukey. Os tratamentos com média zero não foram submetidos a análise estatística sendo no entanto considerados diferentes dos demais resultados. Os dados submetidos à análise não

sofreram transformação pois os valores de cada repetição utilizados nas análises eram médias das quatro contagens realizadas por placa (unidade experimental). Com esse procedimento, a variável discreta (nº de conídios/placa) transformou-se em variável contínua.

A escolha dos constituintes dos meios de cultura não foi feita ao acaso. O objetivo foi encontrar um meio de cultura cujos constituintes fossem de fácil obtenção e baixo custo. Os primeiros meios testados foram aqueles constituídos por partes da planta hospedeira, como as folhas e as sementes. Todos os meios de cultura foram avaliados indiretamente mediante comparação com o meio V8 ágar, considerado o meio ideal para esporulação de espécies de *Alternaria*. Foram realizados 8 ensaios com diferentes meios de cultura sólidos.

3.2 Efeito de diferentes meios de cultura líquidos na esporulação de *Alternaria cassiae*

O inóculo de *Alternaria cassiae* utilizado nesta segunda etapa do trabalho foi proveniente do isolamento do fungo a partir de plântulas de fedegoso sintomáticas. As plântulas foram inoculadas com suspensão de conídios, sendo estes doados pelo Laboratório de Controle Biológico de Plantas Daninhas do Cenargen, situado em Brasília.

Três discos de micélio (0,7 cm de diâmetro) provenientes do cultivo do fungo em meio BDA foram transferidos para cada frasco erlenmeyer contendo 100 mL de meio de cultura líquido. Os frascos foram colocados em um agitador mecânico e incubados a temperatura ambiente. O agitador esteve localizado embaixo de uma bancada de laboratório, recebendo portanto pouco luminosidade.

Após um período de mais ou menos uma semana, todo o conteúdo do frasco (micélio e meio) foi vertido dentro do copo de um liquidificador e batido por 2 segundos. O micélio triturado foi retido em pano de nylon para eliminação do excesso de meio de cultura e depositado em placas de Petri previamente forradas com duas camadas de papel de filtro. As placas abertas (sem tampa) foram incubadas sob temperatura

ambiente e luz fluorescente constante por um período de 12 horas. Após o período de luz, as placas foram fechadas e incubadas sob escuro constante e temperatura mais baixa (21°C) por um período de 48 horas. Os esporos do fungo foram então deixados secar por 3-4 horas e colhidos por raspagem da superfície com pincel. Os esporos colhidos foram peneirados em peneira de malha bem fina para separar os esporos dos restos de micélio, pesados e posteriormente foi avaliada a quantidade de esporos mediante contagem no hemocitômetro. A contagem dos esporos foi realizada mediante a suspensão dos esporos produzidos por frasco erlenmeyer em 10 mL de água destilada no primeiro experimento e 20 mL de água destilada nos demais.

Os meios de cultura líquidos testados para avaliação da esporulação do isolado brasileiro de *Alternaria cassiae*, com seus respectivos constituintes, foram:

- **Meio de Tomate** : 200 mL de suco de tomate de marca comercial Superbom (100% natural) acrescido de 3,2 g CaCO_3 por litro de água destilada;
- **Meio V8** : 200 mL de suco comercial V8 (100% Vegetable Juice) acrescido de 3,2 g CaCO_3 por litro de água destilada;
- **Meio de Tomate + pimentão vermelho** : 200 mL de suco de tomate Superbom acrescido de 800 mL de solução decorrente da fervura de 60 g de pimentão por litro de água destilada;
- **Meio de Tomate + cenoura** : 200 mL de suco de tomate Superbom acrescido de 800 mL de solução decorrente da fervura de 100 g de cenoura por litro de água destilada;

No caso dos meios de cultura contendo pimentão e cenoura, após colocado o suco de tomate e o carbonato de cálcio, o volume total do meio de cultura foi completado com a solução proveniente da fervura e homogeneização destes vegetais em água destilada. Todos os meios líquidos foram testados em um único experimento.

Na segunda etapa dos experimentos com meio de cultura líquido, foram testados o efeito do período de luz e do período de estresse mecânico na esporulação do fungo. Após triturado por um período de aproximadamente 2 segundos, o micélio foi submetido a períodos de 6, 8 e 10 horas de luz fluorescente seguidos de 48 horas de escuro. Com relação ao efeito do período de estresse mecânico, o micélio do fungo cultivado em meio

de tomate líquido foi triturado em liquidificador por períodos de 2, 5 e 10 segundos. O micélio triturado foi então depositado em placas de Petri forradas com discos de papel de filtro e submetidos a 12 horas de luz por 48 horas de escuro, semelhante ao realizado nos experimentos anteriores. Findo este período, os esporos produzidos foram colhidos mediante raspagem da superfície do papel de filtro com um pincel para retirada dos esporos produzidos.

3.3 Efeito de diferentes períodos de molhamento foliar na infecção de plântulas de *Senna obtusifolia* por *Alternaria cassiae*

As sementes de fedegoso utilizadas neste trabalho foram adquiridas na empresa Shokusho localizada no município de Arthur Nogueira, especializada na venda de sementes de plantas daninhas para pesquisas científicas. As sementes foram escarificadas em ácido sulfúrico por um período de dois minutos para quebra de dormência e acondicionadas em papel de filtro umedecido com água destilada. O papel de filtro foi incubado em câmara de germinação e após um período de dois dias as sementes germinadas foram plantadas em vasos contendo terra esterilizada. Dois experimentos foram realizados. Dezoito sementes pré-germinadas foram plantadas por vaso. Os vasos foram incubados em câmaras de crescimento a temperatura constante de 25°C até que as plantas atingissem o estágio do primeiro par de folhas verdadeiras expandidas. Após a germinação, o número de plantas foi reduzido para 10 a 13 plantas por vaso.

O fungo *A. cassiae* foi cultivado em meio V8 ágar sob condições de escuro e temperatura ambiente até que o micélio do fungo ocupasse toda a área da placa de Petri. A esporulação do fungo foi obtida conforme metodologia já descrita na primeira etapa deste trabalho. A suspensão de conídios obtida foi ajustada para um valor entre 10^4 e 10^5 conídios por mL e adicionada do surfactante Tween a 0,1%. A inoculação foi realizada mediante pulverização da suspensão até o ponto de escorrimento superficial. Nos dois experimentos as plantas se encontravam no estágio do primeiro par de folhas verdadeiras completamente expandidas. As suspensões de conídios utilizadas como

inóculo foram de $3,46 \times 10^4$ e $4,5 \times 10^4$ conídios/mL. Logo após a pulverização da suspensão de inóculo, as plantas foram envolvidas com sacos plásticos borrifados internamente com água para simular condições de câmara úmida. As plantas foram submetidas a períodos de 0, 4, 6, 8, 12, 24 e 48 horas de câmara úmida, mantendo-se uma temperatura de 25°C constante. O tratamento testemunha foi composto por plantas pulverizadas com água e Tween 0,1%.

No dia seguinte à retirada da última câmara úmida (48 horas) foram iniciadas as avaliações do número de plantas com sintomas, número de plantas mortas e número de folíolos caídos. Os dados coletados nos diferentes dias foram submetidos a análise de regressão não-linear com o modelo monomolecular $y = b_1(1 - b_2 \exp(-(b_3 \cdot x)))$, onde y é a variável de doença considerada, x é o período de molhamento foliar e b1, b2 e b3 são os parâmetros do modelo (Gilligan, 1990), utilizando para tal o pacote estatístico Statistica 5.0. As equações obtidas nas análises foram transferidas para o programa Plotit para construção das curvas de progresso da doença.

3.4 Efeito de diferentes períodos de molhamento foliar e temperatura na infecção de plântulas de *Senna obtusifolia* por *Alternaria cassiae*

O fungo foi cultivado em meio de cultura V8 ágar incubado em câmara de crescimento a temperatura de 26°C em regime de escuro total. A obtenção dos esporos foi semelhante aos experimentos anteriores. A suspensão de conídios utilizada como inóculo teve concentração ajustada para 10^5 conídios/mL e adicionada de surfactante Tween 0,1%. As plantas foram pulverizadas até o ponto de escorrimento superficial no estágio de desenvolvimento entre folhas cotiledonares e formação do primeiro par de folhas verdadeiras, e envolvidas com sacos plásticos borrifados internamente com água para simular condições de câmara úmida. As plantas foram submetidas a condições de 8, 12 e 16 horas de câmara úmida e incubadas em câmara de crescimento com temperaturas de 20, 23 e 26° C no primeiro e segundo experimentos, e temperaturas de 17, 23 e 30° C no terceiro experimento. Em cada uma das câmaras de crescimento,

plantas de fedegoso foram borrifadas com água + Tween 0,1% e submetidas a 16 horas de câmara úmida para representar o tratamento testemunha.

A avaliação dos experimentos foi baseada na contagem diária do número de plantas mortas e de folíolos mortos por tratamento. Em cada avaliação as plantas mortas e os folíolos mortos eram retirados dos vasos para evitar que os sintomas fossem duplamente contabilizados entre os dias de avaliação. Os dados coletados nos diferentes dias foram submetidos a análise de regressão não-linear com o modelo monomolecular (Gilligan, 1990), utilizando para tal os pacotes estatísticos Statistica 5.0 e PlotIt 3.2. A análise conjunta do efeito do período de molhamento e da temperatura na incidência de plantas mortas foi feita por regressão linear com o modelo quadrático $z = b_1 + b_2x + b_3y + b_4xy + b_5x^2 + b_6y^2$ onde z é a incidência de plantas mortas, x é a temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$) e y , o período de molhamento foliar (horas).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito de diferentes meios de cultura sólidos na esporulação de *Alternaria cassiae*

A técnica de raspagem do micélio superficial da colônia possibilitou a obtenção de conídios do fungo em todos os meios de cultura testados. Não foi verificada presença de esporos anteriormente à raspagem.

O número de esporos de *A. cassiae* produzidos por mL de suspensão (20 mL de suspensão) nos diferentes meios sólidos de cultura testados variou entre os experimentos, inclusive no meio padrão V8 (Tabela 1).

Meios compostos por sementes de fedegoso, batata e suas diversas combinações induziram uma fraca esporulação de *Alternaria cassiae*, não diferindo estatisticamente entre si. O fungo cultivado em meio composto apenas por batata não produziu esporos ou teve produção muito baixa (Tabela 1).

A adição de uma fonte de açúcar, no caso a dextrose, não alterou a esporulação de *Alternaria cassiae* nos meios de folha e semente de fedegoso. O meio V8 proporcionou maior esporulação do fungo com produção estimada de 3,36 e 4,43 x 10⁶ esporos por placa de Petri. O meio de aveia não diferiu estatisticamente do meio de semente de fedegoso que apresentou uma esporulação muito abaixo da proporcionada pelo meio V8.

Tabela 1. Efeito de meios de cultura sólidos na esporulação de *Alternaria cassiae* em oito experimentos independentes.

Experimento	Meios de cultura	Conídios/mL x 10 ⁴ (a)
1º Experimento	V8	13,25 a
	Fedegoso	0,15 b
	Fedegoso + CaCO ₃	0,075 b
	Fedegoso + BDA	9,95 a
2º Experimento	V8	15,45 a
	Purê cenoura	7,65 b
	Purê + dextrose 20g/L	6,7 b
	Caldo + dextrose 20 g/L	4,05 b
3º Experimento	V8	16,84 a
	Semente	4,10 b
	Semente + dextrose	1,22 b
	BDA	0
4º Experimento	V8	22,19 a
	Semente	2,39 bc
	Semente + dextrose	0,94 c
	BDA	0,3 c
	Aveia	5,56 b
5º Experimento	V8	30,75 a
	Fedegoso 60g/L	8,95 b
	Fed + dextrose 20g/L	3,35 b
	Fed + dextrose 10g/L	4,35 b
6º Experimento	V8	24,7 a
	Tomate	15,30 b
	Cenoura dextrose	7,5 c
	Aveia	3,45 c
7º Experimento	V8	20,32 a
	Tomate	14,61 b
	Cenoura dextrose	4,67 c
	Aveia	4,80 c
8º Experimento	V8	14,58 a
	Semente de fedegoso	2,69 b
	Semente 1 : batata 1	4,94 b
	Semente 1 : batata 2	3,16 b
	Semente 2 : batata 1	0,77 b
	Batata	0

(a) Valores de cada experimento seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey 5%. Os valores correspondem à concentração da suspensão dos conídios produzidos por placa em 20 mL de água destilada.

O meio natural com folhas de fedegoso proporcionou uma esporulação baixa do fungo quando comparado ao meio V8. Em ambos os experimentos, a dextrose demonstrou ser um composto dispensável no preparo de meio de cultura visando a esporulação de *Alternaria cassiae*.

Apesar de diferir estatisticamente com relação ao meio V8, o meio de tomate foi o que proporcionou a maior esporulação em relação a todos os outros meios testados neste trabalho, com uma média de 3×10^6 esporos por placa (15×10^4 esporos/mL). Estes resultados são importantes pois indicam que o suco de tomate é essencial para uma boa esporulação de *A. cassiae*. Os meios de cenoura dextrose e aveia proporcionaram baixa produção de esporos.

A esporulação do fungo cultivado no meio de “purê de cenoura” não diferiu estatisticamente do meio composto por caldo de cenoura. A adição de dextrose não causou aumento no número de esporos produzidos, conforme verificado nos experimentos anteriores para outros meios de cultura.

Shabin & Shepard (1979) desenvolveram um eficiente método de esporulação de *Alternaria solani*, *A. alternata* e *A. dauci*. Os fungos eram cultivados em um meio primário em condições de escuro total. Quarenta e oito a setenta e duas horas depois, o meio contendo o micélio desenvolvido do fungo foi cortado em quadrados de 4 mm^2 os quais foram colocados no centro dos meios de esporulação. O meio de esporulação era composto de 20 g de sacarose, 30 g de CaCO_3 e 20 g de ágar por litro de água destilada. Um volume de 2 mL de água destilada foi adicionado às placas para parcialmente cobrir o bloco de ágar e as placas foram incubadas a 18°C no escuro. A esporulação obtida pelo método foi de $2,8 \times 10^6$ esporos por placa. Naquele trabalho, os autores também verificaram que a retirada de CaCO_3 do meio impedia a esporulação do fungo, o que não foi observado para o caso da sacarose. A retirada da sacarose não causava diferenças na esporulação do fungo, mas impedia que esta ocorresse por vezes consecutivas no mesmo meio de cultura. Rotem (1994) também relata que todas as espécies de *Alternaria* esporulam melhor em meio de cultura pobre em açúcares, tais como V8 ágar preparado sem a adição de açúcar. Estes resultados são semelhantes ao obtidos neste trabalho onde

obteve-se uma produção da ordem de 10^6 conídios por placa em meio V8 e em meio de suco de tomate.

Rands (1917) induziu esporulação de *A. solani* fragmentando o micélio, secando lentamente o ágar e expondo as placas tratadas por diversas horas à luz do sol. Kunkel (1918) induziu esporulação de *A. solani* pela fragmentação do micélio e reportou resultados semelhantes na esporulação de outras espécies de *Alternaria*. A inibição do desenvolvimento micelial através da fragmentação do micélio estimulou a esporulação de *A. brassicae*, *A. brassicicola* e *A. raphani* segundo Changsri e Weber (1963) e de *A. porri* segundo Angell (1929).

Estas comparações nos permitiram concluir que o método adotado nestes experimentos para esporulação de *Alternaria cassiae* está sendo compatível com métodos já consagrados para esporulação de outras espécies de *Alternaria*. Além disso, o meio de tomate substitui o meio V8 para esporulação de *A. cassiae*. Apesar do número de esporos produzidos por placa ser menor em meio de tomate, seu custo é mais baixo quando comparado ao meio V8.

4.2 Efeito de diferentes meios de cultura líquidos na esporulação de *Alternaria cassiae*

Os resultados obtidos demonstram que a técnica desenvolvida neste trabalho permite a obtenção de esporos de *A. cassiae* em meio de cultura líquido. A Tabela 2 mostra o número de esporos de *A. cassiae* produzidos por frasco erlenmeyer nos diferentes meios líquidos e condições testadas.

Tabela 2. Efeito de meios de cultura líquidos na esporulação de *Alternaria cassiae* em quatro experimentos independentes.

Experimentos	Meio	Conídios/mL x 10 ⁴
1º Experimento	V8	7,00 ns
	Tomate	3,42 ns
	Tomate + cenoura	4,41 ns
	Tomate + pimentão	1,13 ns
2º Experimento	V8	3,35 ns
	Tomate + salsa	5,05 ns
	Tomate + beterraba	6,02 ns
	Tomate + alface	3,73 ns
3º Experimento	V8	4,19 ns
	Tomate	4,50 ns
	Tomate + cenoura	5,63 ns
	Tomate + pimentão	7,08 ns
4º Experimento	V8	2,87 a
	Tomate	1,89 ab
	Tomate + cenoura	0,58 b
	Tomate + pimentão	2,84 ab

Valores de cada experimento seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey 5%. Os valores correspondem a suspensão dos conídios produzidos por frasco erlenmeyer em 20 mL de água destilada.

Tabela 3. Efeito de períodos de estresse mecânico (segundos de trituração no liquidificador) e do período de luz (horas) durante secagem do micélio cultivado em meio líquido de tomate na esporulação de *Alternaria cassiae* em três experimentos independentes.

Experimento	Tempo de Estresse (s)	Conídios/mL x 10 ⁴
1	1	12,77 a
	5	13,84 a
	10	13,36 a
2	1	6,30 a
	5	8,19 a
	10	7,33 a
Experimento	Período de luz (h)	Conídios/mL x 10 ⁴
1	6	3,67 a
	8	4,12 a
	10	5,73 a

Valores de cada experimento seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey 5%. Os valores correspondem a suspensão dos conídios produzidos por frasco erlenmeyer em 20 mL de água destilada.

Os meios de cultura testados não diferiram entre si quanto à produção de conídios de *Alternaria* com exceção do meio de cultura composto por tomate e cenoura no quarto experimento.

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados dos efeitos do período de luz durante a secagem do micélio triturado e do tempo de trituração do micélio produzido no meio de tomate líquido anteriormente à exposição a luz. Nenhum dos parâmetros testados exerceram qualquer efeito na esporulação do fungo *A. cassiae* nas condições em que foram realizados os experimentos.

A técnica de esporulação de *Alternaria cassiae*, cultivado em meio de cultura líquido, sobre folhas de papel de filtro demonstrou ser uma técnica eficiente e de baixo custo. A otimização desta técnica para uma maior produção de conídios do fungo dependerá no futuro de estudos com base na faixa de temperatura ideal para secagem do micélio e na temperatura e umidade ideais durante o período de escuro.

A esporulação de *Alternaria cassiae* em meio líquido deve ser igual ou superior ao meio de cultura sólido para que esta técnica seja útil na produção do bioherbicida. A grande vantagem desta técnica em relação à técnica de raspagem do micélio em placa de Petri é a facilidade com que se obtém esporos secos, prontamente armazenáveis. Um grande problema da esporulação em meio de cultura líquido é a possibilidade de contaminação do meio. As repicagens devem ser realizadas com o máximo de cuidado porque uma vez contaminado o meio líquido todo seu conteúdo será perdido, diferente do que ocorre em meio sólido onde pode-se descartar somente parte das placas contaminadas.

Outros autores estudaram técnicas de esporulação de *A. cassiae* em meio líquido obtendo excelentes resultados. Walker (1980) produziu 7,5 g de esporos em 7 litros de meio de cultura de Richard's contendo 10 g de sacarose comercial, 10 g KNO₃, 5 g KH₂PO₄, 2,5 g MgSO₄.7H₂O, 0,02 g FeCl₃, 150 ml V8 e água destilada para completar 1 litro. O micélio triturado foi submetido a 7 horas de luz, 13 horas de escuro seguido posteriormente de 4 horas de luz. Apesar de ser um método muito eficiente de produção, tem um custo relativamente alto principalmente devido à riqueza nutricional do meio de cultura. Neste mesmo trabalho o autor demonstrou a maior eficiência deste método em

relação à produção em meio de cultura V8 ágar onde houve produção de 6×10^6 conídios por placa.

Este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de uma técnica de esporulação com baixo custo de produção, em especial com relação ao meio de cultura utilizado. Para isto utilizou-se apenas meios de cultura compostos por substratos de fácil aquisição e manipulação. Os resultados obtidos com relação ao meio de cultura líquido demonstram a possibilidade de obtenção de grandes quantidades de esporos de *Alternaria cassiae*. Assim há possibilidade de produção de inóculo utilizando meios líquidos de cultura cujos constituintes são de fácil aquisição, seja pela disponibilidade ou pelo baixo custo.

4.3 Efeito de diferentes períodos de molhamento foliar na infecção de plântulas de *Senna obtusifolia* por *Alternaria cassiae*

A variável utilizada para avaliar a intensidade da doença causada por *Alternaria cassiae* em plantas de fedegoso nos diferentes períodos de molhamento foliar testados foi o número de folíolos mortos. A morte das plantas inoculadas não pôde ser utilizada como variável pois as plantas, mesmo depois de severamente atacadas, não morreram.

Observou-se em ambos os experimentos que conforme aumenta o período de molhamento foliar, ocorre um aumento na velocidade de desenvolvimento da doença. Os dados de incidência da doença foram bem ajustados pela equação monomolecular $y=b_1*(1-b_2*\exp(-(b_3*x)))$, onde y é a incidência de doença (folíolos mortos), x é o período de molhamento foliar e b1, b2 e b3 são parâmetros do modelo. Os parâmetros de ajuste para os diferentes períodos de molhamento foliar para os dois experimentos estão apresentados na Tabela 4.

Os dois experimentos realizados apresentaram diferenças quanto ao desenvolvimento máximo da doença nos diferentes períodos de molhamento. No primeiro experimento, a maior incidência de folhas com sintomas ocorreu no tratamento com 24 horas de molhamento seguido pelo tratamento de 48 horas (Figura 1). O mesmo não ocorreu no segundo experimento onde a maior incidência ocorreu no período de 48

horas de molhamento foliar (Figura 2). Este fato deve-se provavelmente a heterogeneidade de deposição de inóculo sobre a superfície da planta durante pulverização manual. A deposição desuniforme de inóculo tem sido apontada como uma das maiores causas de variação entre repetições e entre tratamentos de ensaios conduzidos sob condições controladas (Rotem, 1988). Essa desuniformidade é inerente ao método utilizado e deve ser considerada na interpretação dos resultados.

Os modelos foram bem ajustados às curvas, conforme os valores de R apresentados na Tabela 4. Os valores de incidência máxima, representados por B1, transformados em porcentagem, em função do período de molhamento, apresentam-se também estatisticamente ajustados à equação monomolecular, com R^2 igual a 0,92 (Figura 3). A análise dos dados apresentada na Figura 3 mostra que a intensidade máxima ocorre com 24 horas de molhamento foliar, não havendo diferenças entre 24 e 48 horas de molhamento.

Em ambos os experimentos observou-se que em períodos inferiores a 24 horas houve um efeito significativo do molhamento foliar sobre a intensidade da doença. No segundo experimento, no entanto, a desfolha relativa foi semelhante nos períodos de 4, 6 e 8 horas de molhamento. Nos tratamentos onde o molhamento foliar foi baixo, a taxa de crescimento da plantas superou a velocidade do fungo em colonizar outros tecidos adjacentes da planta. A doença se estabilizou em um nível muito baixo, permitindo o lançamento de novos folíolos que se apresentavam sadios e que permitiam que a planta continuasse seu desenvolvimento. Plantas de fedegoso, após o desenvolvimento do terceiro par de folhas verdadeiras, tornam-se resistentes à colonização de *A. cassiae* (Walker, 1982).

Em ambos os experimentos, plantas submetidas a ausência de câmara úmida não apresentaram sintomas da doença. Plantas submetidas a condições de câmara úmida entre 4 e 8 horas apresentaram sintomas relativamente leves, principalmente nas folhas cotiledonares.

Figura 1 – Efeito de períodos de molhamento foliar na evolução da incidência da doença causada por *Alternaria cassiae* em *Senna obtusifolia*. Dados do primeiro experimento: círculos representam médias de cinco repetições, barras representam o erro padrão da média, e linhas correspondem ao modelo de ajuste monomolecular.

Figura 2 – Efeito de períodos de molhamento foliar na evolução da incidência da doença causada por *Alternaria cassiae* em *Senna obtusifolia*. Dados do segundo experimento: círculos representam médias de cinco repetições, barras representam o erro padrão da média, e linhas correspondem ao modelo de ajuste monomolecular.

Tabela 4. Parâmetros estatísticos obtidos através das equações monomoleculares $y=b_1*(1-b_2*\exp(-(b_3*x))$, onde y é a incidência da doença (folíolos mortos), x é o molhamento foliar (horas), R é o coeficiente de correlação e b1, b2 e b3 são parâmetros estimados pelo modelo.

MF (h)	Experimento 1				Experimento 2			
	R	B1	B2	B3	R	B1	B2	B3
48	0.988	88.75	1.37	0.46	0.995	66.39	0.96	0.34
24	0.986	106.55	1.28	0.34	0.993	60.81	1.09	0.25
12	0.995	75.79	1.23	0.26	0.984	50	1.16	0.13
8	0.994	70.06	1.06	0.08	0.970	24	1.24	0.11
6	0.991	59.32	1.08	0.05	0.939	24	1.24	0.09
4	0.94	10	1.32	0.14	0.977	24	1.05	0.02

Figura 3 – Efeito dos períodos de molhamento foliar sobre a desfolha relativa (%) de plântulas de *Senna obtusifolia* por *Alternaria cassiae*. Círculos pretos correspondem aos dados do primeiro experimento e círculos vermelhos, aos dados do segundo experimento. A linha representa o modelo de ajuste monomolecular.

Figura 4 – Efeito do período de molhamento foliar na matéria seca (g) das plantas de fedegoso no primeiro (a) e segundo (b) experimentos 14 dias após a inoculação.

Nos tratamentos de 24 e 48 horas, devido ao ambiente ser mais favorável ao patógeno, a doença ocorreu com maior velocidade causando danos significativos na planta daninha. Nos demais períodos de molhamento, embora a variável utilizada para estimativa da intensidade da doença continue aumentando (morte e queda de folíolos) lentamente, o dano causado na planta foi reduzido consideravelmente pelo seu crescimento ativo.

Outra variável que expressa a intensidade da doença nos diferentes períodos de molhamento foliar é a matéria seca (MS) da parte aérea das plantas remanescentes. Os valores de MS das plantas nos diferentes períodos de molhamento foliar foram ajustados ao modelo exponencial negativo $y = b_1 \cdot \exp(-b_2 \cdot x)$, onde y é o peso seco da parte aérea das plantas (g) e x é o período de molhamento foliar (horas) (Figura 4). Observou-se que, em ambos os experimentos, conforme aumenta o período de molhamento foliar, o peso seco das plantas remanescentes após 14 dias diminui, tendendo a um valor constante a partir do período de 24 horas de molhamento.

Os resultados observados nestes experimentos devem ser avaliados levando em consideração que a dosagem de inóculo aplicada foi da ordem de 10^4 conídios/mL, sendo esta concentração considerada como mínima para o controle de plantas de fedegoso. Um segundo ponto a ser considerado é o fato de que as plantas inoculadas apresentavam-se no estágio de primeiro par de folhas verdadeiras, próximas do período de lançamento do segundo par de folhas, quando a planta começa a apresentar resistência ao fungo, conforme demonstrado por Walker (1982).

Walker (1981), estudando os fatores que afetam o controle biológico de *Anoda cristata* por *Alternaria macrospora*, observou que plantas inoculadas com concentração de inóculo de 10^4 conídios/mL sofriam reduções de matéria seca inferiores a 10% em condições de 8 horas de molhamento foliar e 25° C. Somente com concentrações iguais a 10^5 conídios/mL foi verificada uma redução de 42% na matéria seca das plantas. Em estudos utilizando-se concentrações de 10^5 conídios/mL o autor verificou que pequenas reduções na matéria seca (19%) ocorriam somente com 8 horas de molhamento foliar. Com o aumento do período de molhamento ocorria uma maior redução na matéria seca

das plantas inoculadas, atingindo valores de 70% e 96% de redução para 20 e 24 horas de molhamento foliar.

Yang et al. (1990), realizando estudos semelhantes com *Alternaria angustiovoidea*, numa concentração entre 1×10^4 e 1×10^5 conídios/mL, verificaram que somente após 12 horas de câmara úmida ocorreu uma fraca infecção nas plantas de *Euphorbia esula*. Períodos de 0 e 6 horas não permitiram o desenvolvimento da doença após 14 dias. A severidade da doença causada por *A. angustiovoidea* aumentou conforme o aumento do período de molhamento foliar, ocorrendo doença, no entanto, somente a partir de 12 horas.

Reduções significativas no número de plântulas e na matéria seca das plantas remanescentes 14 dias após a inoculação ocorreram após 4 horas de molhamento foliar, quando utilizada uma suspensão de 1×10^5 conídios/mL de *Alternaria cassiae* (Walker & Ridley, 1982). Reduções de 90 a 100% no número e matéria seca das plantas foram verificadas com molhamentos foliares de 8 horas. Os autores também verificaram uma redução de 70% no número de plantas inoculadas com 5×10^4 conídios/mL e submetidas a 8 horas de molhamento foliar a uma temperatura de 20° C. Todas as plantas inoculadas eram submetidas a condições de câmara úmida a uma temperatura de 20° C e posteriormente à retirada da câmara úmida, as plantas eram transferidas para uma casa-de-vegetação com temperatura variando de 28 a 32° C e umidade relativa de 40-60%.

Masangkay et al. (1999) verificaram que períodos de 8 h de molhamento foliar foram suficientes para causar 100% de mortalidade em plantas de *Sphenoclea zeylanica* inoculadas com suspensão de 10^6 conídios/mL de *Alternaria alternata* f. sp. *sphenocleae*. Uma concentração menor de conídios requer um período de molhamento foliar mais longo (16 horas) para causar o mesmo efeito. As plantas não morreram em nenhum dos períodos de molhamento testados quando inoculadas com suspensão de 10^4 conídios/mL. A redução de matéria seca atingiu valores de 100% somente quando as plantas foram inoculadas com 10^6 conídios/mL (16 horas molhamento foliar) e 10^5 conídios/mL (24 horas). Quanto mais adultas as plantas se apresentavam na época de inoculação (8 h molhamento foliar e 24° C), menor era a redução da matéria seca após

14 dias de avaliação. Concentrações maiores de inóculo diminuíam o efeito da idade da planta sobre a severidade da doença, estimada pela redução no acúmulo de matéria seca. Os trabalhos de Walker (1982) e Yang et al. (1990) demonstram que, conforme observado em nossos estudos, somente com períodos prolongados de molhamento foliar pôde-se obter uma alta redução na matéria seca das plantas inoculadas com suspensão de inóculo da ordem de 10^4 conídios/mL. Os resultados obtidos por Walker & Ridley (1982) são contraditórios aos obtidos neste trabalho. Os autores obtiveram uma severidade (redução de matéria seca) de 70% em plantas inoculadas com 10^4 conídios/mL. No entanto, as condições em que foram realizados os experimentos podem, juntamente com a possível diferença entre isolados, explicar este fato. As plantas foram inoculadas e submetidas a condições de 8 horas de molhamento foliar a uma temperatura de 20° C, e posteriormente foram transferidas para casa-de-vegetação onde a temperatura atingia uma média de 30° C e umidade relativa de 50%. As plantas inoculadas no presente trabalho foram submetidas a temperatura de câmara úmida de 25°C e mantidas na própria câmara de crescimento a temperatura de 25° C e umidade relativa de aproximadamente 45%. A temperatura de câmara úmida como também a temperatura para desenvolvimento de sintomas podem ser responsáveis pela grande diferença entre os dados obtidos neste trabalho e os obtidos por Walker & Ridley (1982).

O molhamento foliar tem uma importância significativa na intensidade da doença principalmente para períodos de molhamento inferiores a 24 horas. Concentrações baixas de inóculo estão mais sujeitas, conforme demonstrados em outros trabalhos realizados com espécies de *Alternaria*, aos efeitos da idade da planta e variações ambientais. Em nossos estudos posteriores foram testados o efeito de três períodos de molhamento foliar em três temperaturas diferentes em plantas inoculadas com suspensão cuja concentração foi 10^5 conídios/mL.

4.4 Efeito de diferentes temperaturas e períodos de molhamento foliar na infecção de plântulas de *Senna obtusifolia* por *Alternaria cassiae*

A variável utilizada para avaliar a intensidade da doença causada por *Alternaria cassiae* em plantas de fedegoso nas diferentes interações entre temperatura e molhamento foliar estudadas foi a mortalidade de plântulas. A avaliação baseada no número de folíolos mortos também foi realizada para comparação e confirmação de resultados.

As Figuras 5, 6 e 7 apresentam o efeito dos períodos de molhamento foliar e de temperaturas na incidência da doença. A equação monomolecular $y=b1*(1-b2*\exp((b3*x)))$ foi bem ajustada aos dados de incidência da doença. Os parâmetros de ajuste para os diferentes períodos de molhamento foliar para os três experimentos estão apresentados nas Tabelas 5, 6 e 7.

Com exceção do tratamento de 8 horas de molhamento foliar sob temperaturas de 26° C no primeiro experimento e dos tratamentos de 8 e 12 horas de molhamento foliar sob temperatura de 30° C todos os dados apresentaram um valor de R^2 acima de 0,90. Todos os experimentos realizados demonstraram que independentemente da temperatura de incubação, conforme aumenta-se o período de molhamento foliar, aumenta-se a incidência da doença. Nos dois primeiros experimentos observa-se que sob temperatura de 26° C a incidência da doença é menor em períodos de molhamento foliar de 8 horas quando comparada às demais temperaturas. Conforme aumenta-se o período de molhamento foliar para 12 e 16 h essa diferença é reduzida. O mesmo não pode ser observado no terceiro experimento onde a incidência da doença foi significativamente mais baixa na temperatura de 30° C. A incidência final da doença (B1) a 30° C e 16 horas de molhamento foliar foi menor que a incidência da doença a 17° C e 8 horas de molhamento, evidenciando que a doença é favorecida por temperaturas mais baixas.

Figura 5 – Progresso da mortalidade de plântulas de *Senna obtusifolia* inoculadas com *Alternaria cassiae* no primeiro experimento sob temperaturas de 20° C(a,b,c), 23° C(d,e,f) e 26° C(g,h,i) e períodos de molhamento foliar após a inoculação de 8(a,d,g), 12(b,e,h) e 16(c,f,i) horas.

Figura 6 – Progresso da mortalidade de plântulas de *Senna obtusifolia* inoculadas com *Alternaria cassiae* no segundo experimento sob temperaturas de 20° C(a,b,c), 23° C(d,e,f) e 26° C(g,h,i) e períodos de molhamento foliar após a inoculação de 8(a,d,g), 12(b,e,h) e 16(c,f,i) horas.

Figura 7 – Progresso da mortalidade de plântulas de *Senna obtusifolia* inoculadas com *Alternaria cassiae* no terceiro experimento sob temperaturas de 17° C(a,b,c), 23° C(d,e,f) e 30° C(g,h,i) e períodos de molhamento foliar após a inoculação de 8(a,d,g), 12(b,e,h) e 16(c,f,i) horas.

Tabela 5. Parâmetros do modelo monomolecular ($y = b_1(1 - b_2 \exp(-b_3 x))$), onde y é a incidência da doença, b_1 , b_2 e b_3 são parâmetros estimados pelo modelo e x é a variável independente) ajustados às curvas de progresso da mortalidade de plântulas de *Senna obtusifolia* por *Alternaria cassiae*, sob as temperaturas de 20, 23 e 26° C e períodos de molhamento foliar após a inoculação de 8, 12 e 16 horas, no experimento 1.

Temperatura	Molhamento Foliar (h)	B1	B2	B3	R ²
20°C	8	28,00	1,25	0,14	0,94
	12	74,33	1,23	0,30	0,97
	16	95,57	1,37	0,52	0,97
23°C	8	45,35	1,04	0,12	0,97
	12	59,37	0,80	0,16	0,90
	16	90,44	0,92	0,73	0,97
26°C	8	6,00	1,35	0,09	0,60
	12	72,41	0,75	0,38	0,98
	16	93,47	0,66	0,18	0,97

Tabela 6. Parâmetros do modelo monomolecular ($y = b_1(1 - b_2 \exp(-b_3 x))$), onde y é a incidência da doença, b_1 , b_2 e b_3 são parâmetros estimados pelo modelo e x é a variável independente) ajustados às curvas de progresso da mortalidade de plântulas de *Senna obtusifolia* por *Alternaria cassiae*, sob as temperaturas de 20, 23 e 26° C e períodos de molhamento foliar após a inoculação de 8, 12 e 16 horas, no experimento 2.

Temperatura	Molhamento Foliar (h)	B1	B2	B3	R ²
20°C	8	45,82	1,28	0,17	0,96
	12	70,96	1,60	0,53	0,98
	16	99,47	1,39	0,79	0,98
23°C	8	23,20	1,14	0,09	0,94
	12	50,04	1,08	0,34	0,99
	16	100,00	2,66	1,60	0,99
26°C	8	4,98	1,13	0,11	0,87
	12	36,00	0,98	0,22	0,94
	16	100,00	0,88	0,60	0,98

Tabela 7. Parâmetros do modelo monomolecular ($y = b_1 \cdot (1 - b_2 \cdot \exp(-b_3 \cdot x))$), onde y é a incidência da doença, b_1 , b_2 e b_3 são parâmetros estimados pelo modelo e x é a variável independente) ajustados às curvas de progresso da mortalidade de plântulas de *Senna obtusifolia* por *Alternaria cassiae*, sob as temperaturas de 17, 23 e 30° C e períodos de molhamento foliar após a inoculação de 8, 12 e 16 horas, no experimento 3.

Temperatura	Molhamento Foliar (h)	B1	B2	B3	R ²
17°C	8	63,86	1,24	0,20	0,98
	12	76,12	1,66	0,55	0,99
	16	100,00	1,30	0,29	0,99
23°C	8	64,35	1,26	0,47	0,99
	12	83,83	1,15	0,60	0,96
	16	100,00	0,81	1,35	0,99
30°C	8	2,00	1,44	0,14	0,49
	12	16,13	0,65	0,08	0,81
	16	24,68	0,46	0,33	0,96

Os dados de mortalidade de plântulas de fedegoso em relação à temperatura e ao período de molhamento foliar foram ajustados conforme o modelo $z = b_1 + b_2 \cdot x + b_3 \cdot y + b_4 \cdot x \cdot y + b_5 \cdot x^2 + b_6 \cdot y^2$, onde z é a incidência da doença, x é o molhamento foliar (horas), y é a temperatura (°C), b_1 , b_2 , b_3 , b_4 e b_5 são parâmetros estimados pela equação. O gráfico de superfície de resposta (Figura 8) demonstra claramente que temperaturas mais baixas permitem um maior desenvolvimento da doença em todos os períodos de molhamento foliar testados. Esses resultados são confirmados observando-se o efeito destes tratamentos sobre a matéria seca relativa acumulada após a estabilização da doença, conforme apresentado na Figura 9. Conforme aumenta-se o período de molhamento foliar e diminui-se a temperatura de incubação, ocorre redução no acúmulo de matéria seca pelas plantas de fedegoso, em virtude da alta taxa de desfolha causada pela doença. Os resultados de matéria seca podem ser comprovados mediante avaliação do efeito dos tratamentos no número de folíolos mortos de fedegoso (Apêndices 1,2 e 3).

Figura 8 – Efeito de diferentes temperaturas e períodos de molhamento foliar na mortalidade de plântulas de fedegoso infectadas por *Alternaria cassiae*.

Tabela 8. Parâmetros estatísticos obtidos pelos modelos de ajuste dos gráficos ao modelo $z = b_1 + b_2*x + b_3*y + b_4*x*y + b_5*x^2 + b_6*y^2$, onde z é a variável dependente, x é a temperatura ($^{\circ}\text{C}$), y é o molhamento foliar (horas) e b_1 , b_2 , b_3 , b_4 , b_5 e b_6 são parâmetros estimados pelo modelo.

Tabela	R ²	B1	B2	B3	B4	B5	B6
Mortalidade (%)	0,83	-154,75	16,88	5,16	0,07	-0,47	0,02
Matéria Seca (%)	0,80	129,87	-6,54	-3,74	-0,27	0,31	0,09
Folículos Mortos	0,85	-140,32	21,96	-1,76	0,41	-0,67	-0,11

O número relativo de folículos mortos (Apêndice 4) segue padrão semelhante aos resultados da porcentagem de plântulas mortas. Temperaturas mais altas promovem uma menor incidência da doença o que reflete num maior acúmulo de matéria seca pelas plantas remanescentes. A avaliação da eficácia de *Alternaria cassiae* no controle de fedegoso deve ser realizada usando como parâmetros a mortalidade e matéria seca de plantas remanescentes devido ao fato de que muitas plantas apesar de apresentarem lesões características da doença manterem seu desenvolvimento vegetativo sem quaisquer alterações.

Figura 9 – Efeito de diferentes temperaturas e períodos de molhamento foliar na matéria seca relativa de plântulas remanescentes de fedegoso após infecção por *Alternaria cassiae*.

Observa-se que, após um certo período, as plantas que não foram severamente atacadas pela doença começam a se recuperar, especialmente quando incubadas sob temperaturas mais altas. Este fato pode ser evidenciado no sexto ou sétimo dia após a inoculação, onde as plantas já se encontram próximas do máximo de doença. Em condições favoráveis ao desenvolvimento da doença, plantas inoculadas já apresentam neste estágio uma alta incidência da doença, e a partir deste ponto, a doença tende à estabilização. O mesmo pode ser observado em condições pouco favoráveis à doença onde a estabilização da doença ocorrerá num nível baixo de incidência.

Os resultados obtidos nestes experimentos evidenciam que o controle biológico da planta de fedegoso será mais eficaz em regiões de temperaturas mais amenas onde o período de molhamento foliar é mais prolongado. Regiões de temperaturas mais altas dificultam a infecção, diminuindo a taxa de desenvolvimento da doença, mesmo com períodos prolongados de orvalho. O gráfico de superfície de resposta do número relativo de folíolos mortos (Apêndice 4) mostra tendência semelhante ao gráfico de mortalidade (Figura 8). Apesar de alguns tratamentos atingirem valores de 100%, deve-se evidenciar que este é um valor relativo e não expressa fielmente a verdade sobre a intensidade da doença e nem sobre as reais condições da planta.

Walker & Riley (1982) observaram que sob período de molhamento foliar de 8 horas, temperaturas de período de orvalho entre 20°C e 30°C proporcionaram valores próximos de 100% na porcentagem de redução do número de plantas e da matéria seca das plantas de fedegoso remanescentes. Os autores constataram que mesmo temperaturas de 30° C eram ideais para uma alta taxa de mortalidade da planta daninha, o que não foi verificado neste trabalho. A incidência da doença foi intensamente reduzida na temperatura de 30°C.

Walker (1981) observou uma alta mortalidade de plantas de *Anoda cristata* inoculadas com suspensão de $2,5 \times 10^5$ conídios/mL de *Alternaria macrospora* e submetidas a temperaturas de 20 a 30°C. Sob temperaturas de 15°C e 35°C as taxas de mortalidade caíram de 100% para 32% e 0%. A 30°C o autor verificou uma taxa de 89% de mortalidade. Os dados de Walker quando comparados aos obtidos neste trabalho evidenciam possivelmente uma diferença entre isolados de *Alternaria cassiae*. A taxa

máxima de mortalidade de plântulas em todas as temperaturas estudadas neste trabalho sob condições de molhamento foliar de 8 horas atingiram valores próximos a 65%. Somente com períodos de molhamento de 16 horas ocorreu mortalidade de 100% nas temperaturas de 17 a 26° C. Na temperatura de 30°C obteve-se um máximo de 25% de mortalidade com 16 horas de molhamento foliar.

Plantas de fedegoso submetidas a baixas temperaturas, mesmo com períodos de molhamento foliar menores (8h e 12h) apresentam um baixo acúmulo de matéria seca. Estas plantas apresentam-se debilitadas e provavelmente perdem sua capacidade de competir com a planta cultivada. Apesar de taxa de mortalidade ser menor (Figuras 5, 6, 7) observa-se que o número de folíolos mortos é alto evidenciando o enfraquecimento da planta (Apêndices 1, 2, 3). De qualquer modo, as exigências climáticas do patógeno representam um entrave na utilização comercial deste fungo como bioherbicida.

Neste trabalho foi verificado somente o efeito do patógeno na planta daninha, desconsiderando o efeito sobre o potencial competitivo desta. O comportamento competitivo desta planta em condições de campo com diferentes níveis de severidade poderia fornecer informações do real efeito do patógeno no controle desta planta daninha.

5 CONCLUSÕES

As informações coletadas neste trabalho permitem concluir que :

1. A técnica de raspagem é eficaz na esporulação de *Alternaria cassiae* em meio de cultura sólido;
2. O meio de suco de tomate pode ser utilizado em substituição do meio V8 para esporulação de *Alternaria cassiae* em meio sólido e líquido;
3. A técnica de esporulação em meio líquido pode ser útil na produção massal de inóculo de *Alternaria cassiae*;
4. A infecção e colonização de *Senna obtusifolia* por *Alternaria cassiae* são favorecidos por temperaturas amenas e períodos prolongados de molhamento foliar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGELL, H.R. Purple blotch of onion (*Macrosporium porri* Ell) **Journal of Agricultural Research** v.38, p.467-487, 1929.
- BANNON, J.S. CASST herbicide (*Alternaria cassiae*): a case history of a mycoherbicide. **American Journal of Alternative Agriculture**, v.3, n.2, p.3, 1988.
- BOZSA, R.C. Intraspecific and interspecific sicklepod (*Cassia obtusifolia*) interference. **Weed Science**, v.37, p.670-673, 1989.
- CHARUDATTAN, R.; WALKER, H.L.; BOYETTE, W.H.; RIDINGS, W.H.; TEBEEST, D.O.; VAN DYKE, C.G.; WORSHAM, A.D. Evaluation of *Alternaria cassiae* as a mycoherbicide for sicklepod (*Cassia obtusifolia*) in regional field tests. **Southern Cooperative**, Auburn, 1986. (Bulletin, 317), 8p.
- CHANGSRI, W. ; WEBER, G.F. Three *Alternaria* species pathogenic on certain cultivated crucifers. **Phytopathology**, v.53, p.643-648, 1963.
- CREEL, J.M.; HOVELAND JR, C.S.; BUCHANAN, G.A. Germination, growth and ecology of sicklepod. **Weeds**, v.16, p.396-400, 1968.
- DOUGLAS, D.R.; PAVEK, J.J. An efficient method of inducing sporulation of *Alternaria solani* in pure culture. **Phytopathology Notes**, v.61, p.239, 1971.

ENGHISH, J.L.; OLIVER, R.L. Influence of sicklepod (*Cassia obtusifolia*) density on plant growth and seed production. **Proceedings of Southern Weed Science Society**, v.24, p.250-258, 1981.

FANCELLI, M.I. Comparação patogênica, cultural, serológica e eletroforética entre isolados de *Alternaria solani* do tomate e da batata e variabilidade patogênica de *Alternaria solani* f. sp. *lycopersici* N.F. Piracicaba, 1991. 58p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

GILLIGAN, G. Mathematical modeling and analysis of soilborne pathogens. In: KRANZ, J. **Epidemics of plant diseases : mathematical analysis and modeling**. New York: Springer, 1990. cap.4. p.97-107.

GREEN, S.; BAILEY, K.L. Influence of moisture and temperature on infection of canada thistle by *Alternaria cirsinioxia*. **Plant Disease**, v.84, n.10. p.1126-1132, 2000.

IRWIN, I.H.S. Chromosomal relationships and taxonomic considerations in the genus *Cassia*. **American Journal of Botany**, v.47, p.309-318, 1960.

ISSAC, M.A.; MURDOCK, E.C.; TOLER, J.E.; WALLACE, S.U. Effects of late-season herbicide application on sicklepod (*Cassia obtusifolia*) seed production and viability. **Weed Science**, v.37, p.761-765, 1989.

JURAIR, A.M.N.; KHAN, A. A new species of *Alternaria* on *Cassia holsericea* Fresem. **Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research**, v.3, p.71-2, 1960.

- KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo : BASF Brasileira S.A., 1992, v.2.
- KUNKEL, L.O. A method of obtaining abundant sporulation in cultures of *Macrosporium solani*. **Brooklyn Botanic Garden**, v.1, p.306-312, 1918.
- LORENZI, H.J. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas e medicinais**. 2. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1991. 440p.
- MASANGKAY, R.F.; PAULITZ, T.C.; HALLETT, S.G.; WATSON, A.K. Factors influencing biological control of *Sphenoclea zeylanica* with *Alternaria alternata* f. sp. *sphenocleae*. **Plant Disease**, v.83, p.1019-1024, 1999.
- McWHORTER, C.G.; SCIUMBATO, G.L. Effects of row spacing, benomyl and duration of sicklepod (*Cassia obtusifolia*) interference on soybean (*Glycine max*) yields. **Weed Science**, v.36, p.254-259, 1988.
- MURRAY, D.S.; THURLOW, D.L.; BUCHANAM, G.A. Sicklepod in the southeast. **Weeds Today**, v.4, p.17-18, 1976.
- NEMOTO, M.C.M. Efeitos da aplicação de esporos de *Alternaria cassiae* “via solo” sobre a emergência, mortalidade e crescimento inicial de plântulas de *Senna obtusifolia*. Jaboticabal, 1997. 65p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- PITELLI, R.A. Weed-soybean interference studies in Brazil. In: COOPING, L.G.; GREEN, M.B.; REEST, R.T. (Ed.) **Pest management in soybean**. London: Elsevier, 1992. p.282-289.

- PITELLI, R.A.; CHARUDATTAN, R.; DEVALERIO, J.T. Effect of *Alternaria cassiae*, *Pseudocercospora nigrigans*, and soybean (*Glycine max*) planting density on the biological control of sicklepod (*Senna obtusifolia*). **Weed Technology**, v.12, p.37-40, 1998.
- PITELLI, R.L.C.M. Aplicação “via-solo” de *Alternaria cassiae* para o controle de plântulas de fedegoso (*Senna obtusifolia*). Jaboticabal, 1998. 52p. Trabalho (Graduação). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- RANDS, R.D. The production of spores by *Alternaria solani* in pure culture. **Phytopathology**, v.7, p.316-317, 1917.
- ROTEM, J. Techniques of controlled condition experiments. In: KRANZS, J.; ROTEM, J. (Ed.) **Experimental techniques in plant disease epidemiology**. London : Springer, 1988. cap.2, p.19-31.
- ROTEM, J. **The genus *Alternaria***: biology, epidemiology and pathogenicity. St. Paul: APS Press, 1994. 326 p.
- SHABIN, E.A.; SHEPARD, J.F. An efficient technique for inducing profuse sporulation of *Alternaria* species. **Phytopathology**, v.69, p.618-620, 1979.
- TEEM, D.H.; HOVELAND, C.S.; BUCHANAN, G.A. Sicklepod (*Cassia obtusifolia*) and coffee senna (*Cassia occidentalis*): geographic distribution, germination, and emergence. **Weed Science**, v.28, n.1, p.68-71, 1980.
- THURLOW, D.L.; BUCHANAN, G.A. Competition of sicklepod with soybeans. **Weed Science**, v.20, p.279-384, 1972.

- WALKER, H.L. Production of spores for field studies. *Alternaria macrospora* as a potencial biocontrol agent for spurred anoda. Washington: USA, 1980. 5p. (Advances in Agriculture Technology).
- WALKER, H.L. Factors affecting biological control of spurred anoda (*Anoda cristata*) with *Alternaria macrospora*. **Weed Science**, v.29, p.505-507, 1981.
- WALKER, H.L. Seedling blight of sicklepod caused by *Alternaria cassiae*. **Plant Disease**, v.66, p.426-428, 1982.
- WALKER, H.L.; BOYETTE, C.D. Influence of sequential dew periods on biocontrol of sicklepod (*Cassia obtusifolia*) by *Alternaria cassiae*. **Plant Disease**, v.70, p.962-963, 1986.
- WALKER, H.L.; RIDLEY, J.A. Evaluation of *Alternaria cassiae* for the biocontrol of sicklepod (*Cassia obtusifolia*). **Weed Science**, v.30, p.651-654, 1982.
- WATSON, A.K. The Classical approach with plant pathogens. In: TEBEEST, D.O. **Microbial control of weeds**. New York: Chapman & Hall, 1991. cap.1, p.3-23.
- VAN DYKE, C.G.; HANING, B.C. Pathology and histology of *Alternaria cassiae* in biocontrol of sicklepod in North Caroline soybeans. **Phytopathology**, v.73, p. 823, 1983.
- YANG, S.M.; JOHNSON, D.R.; DOWLER, W.M. Pathogenicity of *Alteranria angustiovoidea* on leaf spurge. **Plant Disease**, v.74, p.601-604, 1990.

APÊNDICES

Apêndice 1 – Progresso do número de folíolos mortos de *Senna obtusifolia* inoculadas com *Alternaria cassiae* no primeiro experimento sob temperaturas de 20° C(a, b, c), 23° C(d, e, f) e 26° C(g, h, i) e períodos de molhamento foliar após a inoculação de 8(a, d, g), 12(b, e, h) e 16(c, f, i) horas.

Apêndice 2 – Progresso do número de folíolos mortos de *Senna obtusifolia* inoculadas com *Alternaria cassiae* no segundo experimento sob temperaturas de 20° C(a, b, c), 23° C(d, e, f) e 26° C(g, h, i) e períodos de molhamento foliar após a inoculação de 8(a, d, g), 12(b, e, h) e 16(c, f, i) horas.

Apêndice 3 – Progresso do número de folíolos mortos de *Senna obtusifolia* inoculadas com *Alternaria cassiae* no terceiro experimento sob temperaturas de 17° C(a, b, c), 23° C(d, e, f) e 30° C(g, h, i) e períodos de molhamento foliar após a inoculação de 8(a, d, g), 12(b, e, h) e 16(c, f, i) horas.

Apêndice 4 – Efeito de diferentes temperaturas e períodos de molhamento foliar sobre o número relativo de folíolos mortos de fedegoso após inoculação com suspensão de conídios de *Alternaria cassiae*.