

INFLUÊNCIA DO FOTOPERÍODO E DA TEMPERATURA NA INTENSIDADE DE DOENÇA CAUSADA POR *Fusarium graminearum* EM *Egeria densa* E *E. najas*¹

*Influence of the Photoperiod and Temperature on the Intensity of Disease Caused by *Fusarium graminearum* in *Egeria densa* and *E. najas**

BORGES NETO, C.R.², GORGATI, C.Q.³ e PITELLI, R.A.⁴

RESUMO - Um isolado de *Fusarium graminearum* vem sendo estudado na UNESP, campus de Jaboticabal, como agente de controle biológico de *Egeria densa* e de *E. najas*, plantas aquáticas submersas que causam problemas em reservatórios de hidrelétricas. O presente trabalho teve por objetivo estudar os efeitos do fotoperíodo e da temperatura no controle dessas plantas em condições de laboratório. A cada dois dias foram avaliados os sintomas nas plantas inoculadas com *F. graminearum*, atribuindo-se notas de severidade da doença, por um período de oito dias após a inoculação. Também foi avaliado o crescimento das plantas por meio do ganho de massa fresca, expresso em porcentagem. A maior severidade da doença foi observada quando ambas as espécies foram mantidas no escuro, e a menor, em fotoperíodo de 12 horas. A temperatura de 30 °C proporcionou maior severidade de doença em ambas as espécies. A espécie *E. densa* apresentou maior produção de massa fresca no regime de 12 horas de luz e de temperaturas abaixo de 25 °C e menor produção no regime de escuro total e nas temperaturas de 30 e 35 °C. Por sua vez, *E. najas* apresentou menor produção de massa fresca no regime de escuro e nas temperaturas de 25 a 35 °C.

Palavras-chave: biocontrole, plantas aquáticas, fatores abióticos.

ABSTRACT - A promising *Fusarium graminearum* isolate has been evaluated as a potential biocontrol agent of two important aquatic weeds, *Egeria densa* and *E. najas*. This work aimed to study the effects of photoperiod and temperature on the control of these plants under laboratory conditions. The symptoms in the plants inoculated with *F. graminearum* were evaluated every two days, with disease severity being evaluated through a grade scale and plant growth by fresh weight gain, expressed in percentage. The highest severity grades were observed when both species were kept in the dark and the lowest under 12 hours photoperiod. The temperature of 30 °C provided the highest disease severity for both species. The species *E. densa* presented the highest fresh mass production under 12 hours of light and at temperatures below 25 °C, and the lowest production in the dark and at temperature of 30 and 35 °C, while *E. najas* presented lower fresh mass production in the dark and at temperatures from 25 to 35 °C.

Key words: biocontrol, aquatic weeds, abiotic factors.

¹ Recebido para publicação em 22.12.2003 e na forma revisada em 5.9.2005.

² Doutor em Produção Vegetal, FCAV/UNESP – Jaboticabal; ³ Doutora em Energia na Agricultura, FCA/UNESP-Botucatu; ⁴ Prof. Titular, Doutor, do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – FCAVJ, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/nº, 14884-900 Jaboticabal-SP.



INTRODUÇÃO

A eutrofização promovida pelo enriquecimento das águas com esgotos urbanos, industriais e pelas atividades agrícolas provoca alterações físico-químicas que proporcionam condições para a instalação e o crescimento da vegetação aquática. Nesse processo, algumas populações de plantas aquáticas são favorecidas em detrimento de outras (Correl & Correl, 1975). Em algumas situações, a coluna de água é oligotrófica ou distrófica e o sedimento é eutrófico, proporcionando condições de transparência da água e de equilíbrio de formas dos nutrientes, que são adequados para assegurar crescimento profuso de plantas submersas como *Egeria densa* e *E. najas*, membros da família Hydrocharitaceae. Esta condição ocorre em alguns reservatórios de água brasileiros, proporcionando problemas para os usos múltiplos da água e do corpo hídrico e, especialmente, para a geração de energia elétrica. São exemplos: os reservatórios de Jupuí e Três Irmãos, da Companhia Energética de São Paulo (CESP); o reservatório de Paulo Afonso, da Companhia Hidrelétrica do São Francisco (CHESF); e o reservatório de Santana (Piraí, RJ), da Companhia Light Serviços de Eletricidade. O impacto econômico do controle dessas plantas é alto, resultando em custos estimados da ordem de US\$ 1,0 milhão por mês na estação chuvosa, apenas no reservatório de Jupuí (Tanaka, 1998).

As populações de plantas aquáticas submersas são difíceis de manejar ou controlar. O hábito perene de crescimento, a profundidade de colonização, a facilidade de propagação por segmentos de plantas e o próprio ambiente aquático, levando à diluição de agentes de controle, são problemas a serem enfrentados. No entanto, o hábito perene e a formação de grandes colonizações as tornam alvos ideais para a adoção de medidas de controle biológico (Shearer, 1996). Este mesmo autor destaca o controle biológico como a medida mais viável para esse tipo de vegetação.

Pouco se conhece sobre a patologia em plantas aquáticas e não há conhecimento expressivo de microflora associada às espécies em questão. O biocontrole de *E. densa* está sendo investigado em algumas partes do mundo, utilizando-se peixes, moluscos e fungos

(Anderson, 1998), e é considerado efetivo, com adequações ao tipo de habitat, além do baixo custo e do reduzido impacto ambiental. No Brasil, levantamentos sistemáticos de inimigos naturais de ambas as espécies foram efetuados em 1995, em regiões do Pantanal Mato-grossense e nos rios Paraná e Tietê, pela equipe de controle biológico de plantas daninhas da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP (Nachtigal, 2000). Com base em observações do referido autor, efetuadas no curso desses levantamentos, a estratégia inundativa de controle biológico foi considerada a mais adequada, uma vez que existiam poucas evidências de ocorrências de epidemias em condições naturais.

Dentre os organismos selecionados, destacou-se um isolado de *F. graminearum* considerado altamente promissor, por proporcionar elevados danos às duas espécies, com seletividade suficiente (Nachtigal, 2000). Esse fungo é oriundo da Micoteca da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE e vem sendo intensivamente estudado como agente de controle biológico pela estratégia inundativa (Nachtigal, 2000; Mendes, 2002).

O presente trabalho faz parte de pesquisa global e visa estudar as influências das condições abióticas, como fotoperíodo e temperatura, na intensidade de doença causada pelo fungo sobre as duas espécies. Esses conhecimentos são de fundamental importância para se estabelecerem as condições ótimas de infecção e do potencial real do agente de biocontrole.

MATERIAL E MÉTODOS

O isolado de *Fusarium graminearum* foi cedido pelo Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE. Quando de sua entrada no Banco de Germoplasma de Fungos Fitopatogênicos do Laboratório de Controle Biológico de Plantas Daninhas "Prof. Dr. Giorgio de Marines", da FCAV - UNESP, recebeu o código FCAV#940. As colônias foram mantidas em tubos de ensaio contendo o meio BDA, sob refrigeração (4 °C). O meio BDA foi preparado com 18 g de dextrose, 20 g de ágar e 200 g de batata descascada e fatiada. Após o cozimento das batatas em 500 mL de água destilada, procedeu-se à



filtragem. A solução resultante foi misturada ao ágar previamente fundido em água destilada, completando-se o volume para 1.000 mL. Após esses procedimentos, o meio foi autoclavado por 20 minutos a 120 °C e pressão de 1atm. Foram efetuadas transferências de colônias para placa de Petri contendo o mesmo meio. A patogenicidade do isolado foi assegurada por inoculações periódicas nas plantas hospedeiras e recuperação de colônias em meio de cultura.

Para obtenção do inóculo, o fungo foi cultivado em arroz, conforme descrito por Nachtigal (2000). Após 14 dias de incubação em estufa para BOD, a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas diárias de luz, procedeu-se à transferência do conteúdo dos frascos para bandejas (32 cm de comprimento x 23 cm de largura x 4 cm de altura) revestidas com papel-alumínio, as quais permaneceram por sete dias dentro de câmara apropriada (fotoperíodo de 12 horas diárias de luz, 25±2 °C, com umidade do ar variando de 50 a 65%), com circulação forçada de ar para secagem.

Após a secagem, os substratos colonizados foram moídos em moinho de facas (Marconi, MA 340), e as partículas resultantes, constituídas de micélio e substrato, foram separadas quanto à granulometria, utilizando-se apenas as menores que 0,5 mm. Essas partículas foram armazenadas a 4 °C, em refrigerador.

Foram coletados propágulos das duas espécies (*Egeria densa* e *E. najas*) no reservatório da Usina Hidrelétrica de Três Irmãos, localizada no rio Tietê (20°39'S; 51°18'W), e de Souza Dias, localizada no rio Paranã, em Jupiá-SP (24°48'S; 51°18'W), para utilização nos experimentos. Foram realizadas coletas periódicas, de acordo com a necessidade de plantas. Utilizaram-se ponteiros de 8 cm de comprimento das plantas coletadas.

Os ponteiros de cada espécie tiveram a massa fresca determinada, individualmente, após remoção do excesso de água da superfície das folhas por contato em papel absorvente. Os ponteiros foram transferidos para tubos de ensaio com 2,5 cm de diâmetro e 20 cm de comprimento. As plantas foram cultivadas em solução nutritiva de Clark modificada, com 1/5 da força iônica (Clark, 1975). Para inoculação, 0,7 g de inóculo de *F. graminearum* foi

suspensão em um litro de solução de Clark. Aliquotas de 50 mL dessa suspensão foram colocadas em tubos de ensaio, onde as plantas tiveram contato com o agente de controle biológico. Nas testemunhas, os procedimentos adotados foram os mesmos, porém foram utilizados apenas grãos de arroz moídos, sem colonização pelo fungo. Após a inoculação, as plantas foram acondicionadas em incubadoras para BOD.

No estudo onde foram avaliados os efeitos do fotoperíodo, as plantas, depois da inoculação, foram mantidas numa temperatura de 25 ± 1 °C e pH 7,0, com variação nos períodos de luz de 0, 4, 8 e 12 horas diárias.

No experimento onde foram avaliados os efeitos da temperatura de incubação, o fotoperíodo foi mantido em 12 horas diárias e com pH 7,0. As plantas inoculadas foram submetidas às temperaturas de 15, 20, 25, 30 e 35 °C.

As avaliações dos sintomas foram feitas a cada dois dias, até o oitavo dia após a inoculação, com o auxílio de escala de notas proposta por Nachtigal (2000), a saber: nota 1: clorose aparente e não superior a 5% do tamanho da brotação; nota 3: amarelecimento foliar visível e conspicuo na porção basal ou, eventualmente, na porção superior, não afetando mais de 20% do tamanho da brotação; nota 5: amarelecimento moderado, afetando os tecidos até a porção mediana ou terço superior das brotações; nota 7: severo amarelecimento do caule e de mais de 80% da área foliar, com flacidez dos tecidos vegetais e, eventualmente, abscisão dos segmentos terminais; e nota 9: amarelecimento generalizado, com completa desintegração dos tecidos vegetais. Notas intermediárias correspondem à média das notas anteriormente especificadas. A porcentagem de incremento na massa fresca das plantas foi calculada pela diferença de peso fresco antes da montagem dos experimentos e após o término destes.

Em todos os estudos, o delineamento experimental adotado foi o de blocos ao acaso com três repetições. Todos os experimentos foram repetidos três vezes no tempo, constituindo os blocos do delineamento. A cada montagem dos estudos, cada tratamento teve cinco tubos de ensaio e foi utilizada a média das notas e da porcentagem de massa fresca obtidas nas



avaliações para constituir o dado de cada parcela experimental. Os resultados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey, para comparação de médias. Para as análises estatísticas, os dados de porcentagem de ganho de massa fresca foram transformados em arc-seno $\text{vx}/100$.

Os dados de severidade da doença, nos ensaios de efeitos de fotoperíodos e temperaturas, foram submetidos à análise não-linear, empregando-se a equação de Boltzmann: $y = A2 + (A1-A2)/\{1 + \exp[(x-x0)/dx]\}$. As curvas de tendência foram obtidas utilizando-se o programa Origin® 6.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Severidade da doença

Fotoperíodo: Os maiores valores de notas atingidos para os sintomas provocados pela ação de *F. graminearum* em *E. densa* e *E. najas* foram obtidos quando ambas as espécies foram mantidas no escuro, sendo o menor para o fotoperíodo de 12 horas (Figuras 1 e 2). As curvas de progresso da doença causada por *F. graminearum* em plantas de *E. densa* (Figura 1) e *E. najas* (Figura 2) mostram que no fotoperíodo de 12 horas de luz, para ambas as espécies, a severidade de doença foi praticamente

constante e menor que nos demais tratamentos. A severidade da doença apresentou um crescimento maior, do segundo ao oitavo dia de avaliação, em plantas de *E. densa* (Figura 1), nos fotoperíodos de 0 e 4 horas. Já na espécie *E. najas* (Figura 2) a tendência de severidade crescente é observada mais nitidamente no fotoperíodo de 0 hora. Os resultados mostram a importância do período luminoso para o crescimento das plantas, o que já era esperado. A maior intensidade de sintomas em menores períodos de luz pode estar relacionada às situações transitórias de oxigenação, concentração de CO_2 e pH da água ou à debilidade da planta. Pesquisas posteriores deverão ser desenvolvidas para esclarecer esse comportamento.

Temperatura: Pelos resultados obtidos, ambas as espécies, quando inoculadas com *F. graminearum*, apresentaram aumento de intensidade de sintomas com o aumento progressivo da temperatura (Figuras 3 e 4). *E. densa* parece ser mais sensível que *E. najas* em relação ao fator temperatura, pois foi observado que o simples fato de incubá-la à temperatura de 35 °C, sem a presença do fungo, ocasionou a degradação dos tecidos – esse comportamento também havia sido observado por Nachtigal (2000). Nas condições de temperaturas de 15 e 20 °C, para ambas as

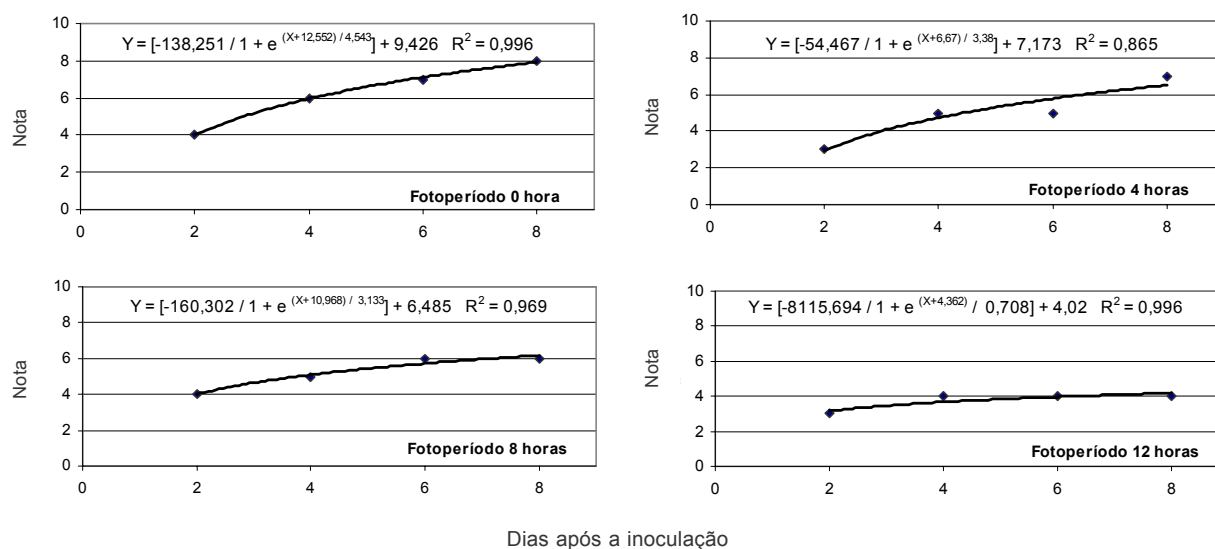


Figura 1 - Curvas de progresso da doença causada por *Fusarium graminearum* em plantas de *Egeria densa* sob diversas condições de fotoperíodo.

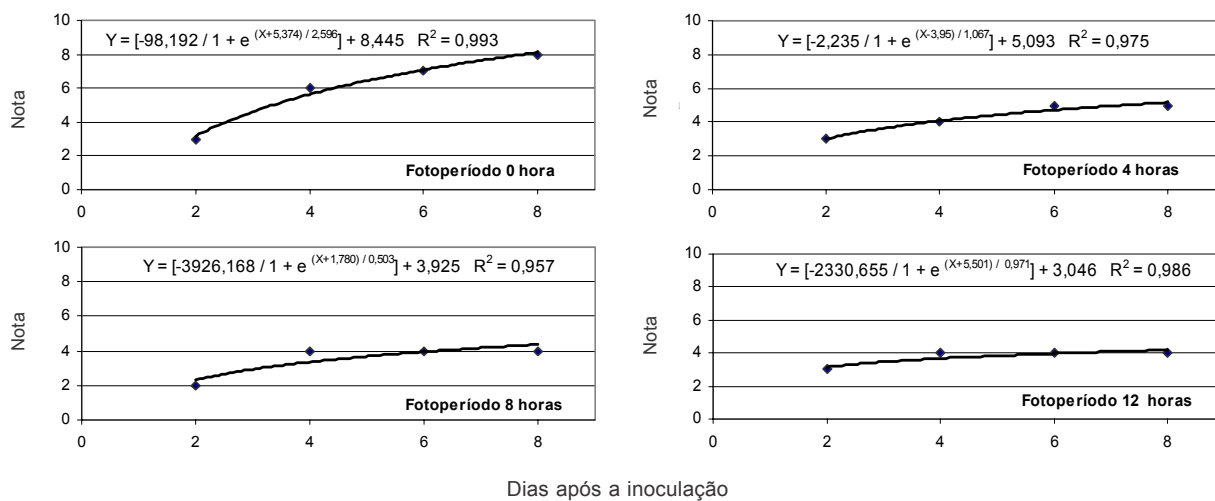


Figura 2 - Curvas de progresso da doença causada por *Fusarium graminearum* em plantas de *Egeria najas* sob diversas condições de fotoperíodo.

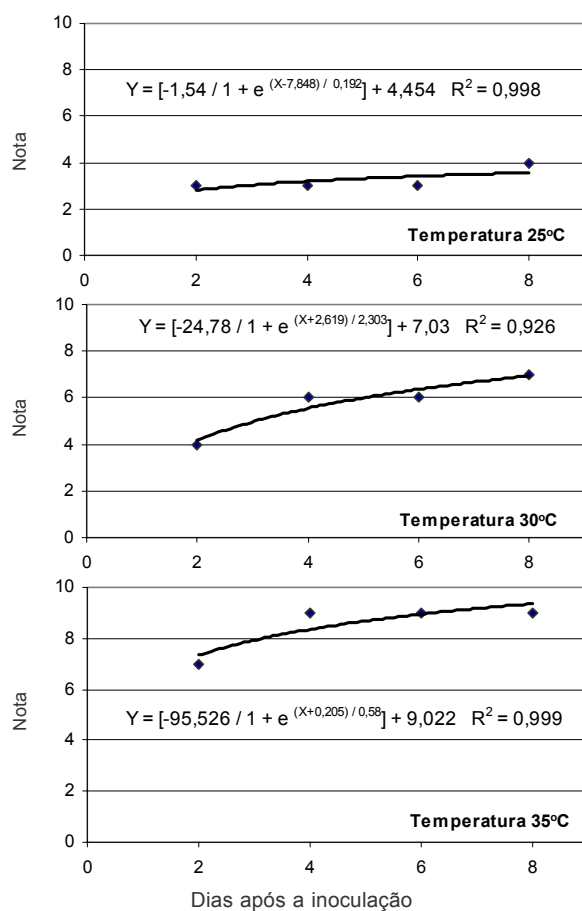


Figura 3 - Curvas de progresso da doença causada por *Fusarium graminearum* em plantas de *Egeria densa* sob diversas condições de temperatura.

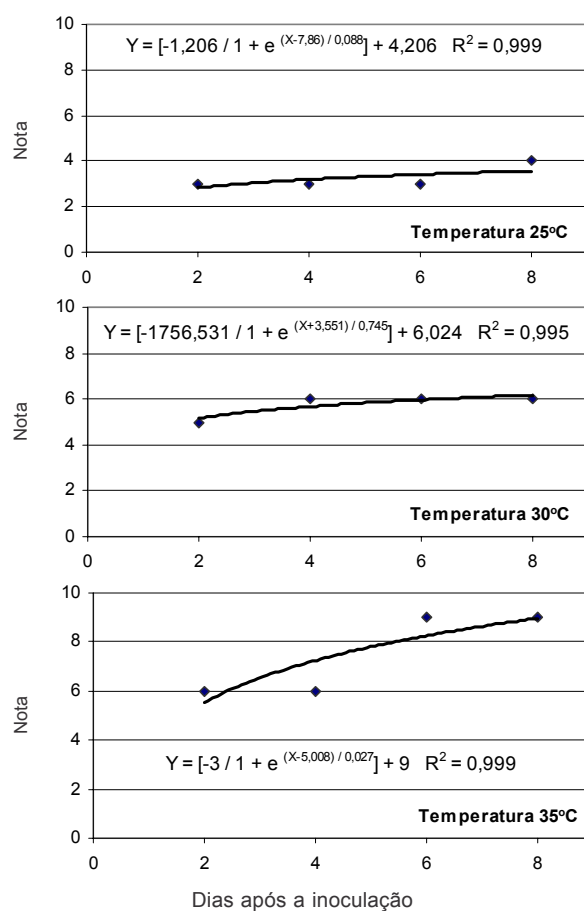


Figura 4 - Curvas de progresso da doença causada por *Fusarium graminearum* em plantas de *Egeria najas* sob diversas condições de temperatura.



espécies não foi possível o enquadramento dos dados em modelos lineares e/ou não-lineares para obtenção das curvas de progresso de doença – nestes tratamentos foram observadas as menores severidades de doença. As curvas de progresso da doença causada por *F. graminearum* em plantas de *E. densa* (Figura 3) e *E. najas* (Figura 4) à temperatura de 25 °C são semelhantes: a severidade de doença não alcança a nota 4, correspondente a aproximadamente 35% da brotação com sintomas da doença. No tratamento com temperatura de 30 °C, a curva de tendência para a espécie *E. densa* (Figura 3) mostra maior incremento de severidade da doença a partir do quarto dia de avaliação. A sensibilidade de *E. densa* a temperaturas mais altas (30 e 35 °C) teve influência direta na curva de progresso de doença (Figura 3), quando comparada à curva para a espécie *E. najas* (Figura 4), mostrando que o fator temperatura pode potencializar a ação do bio-herbicida.

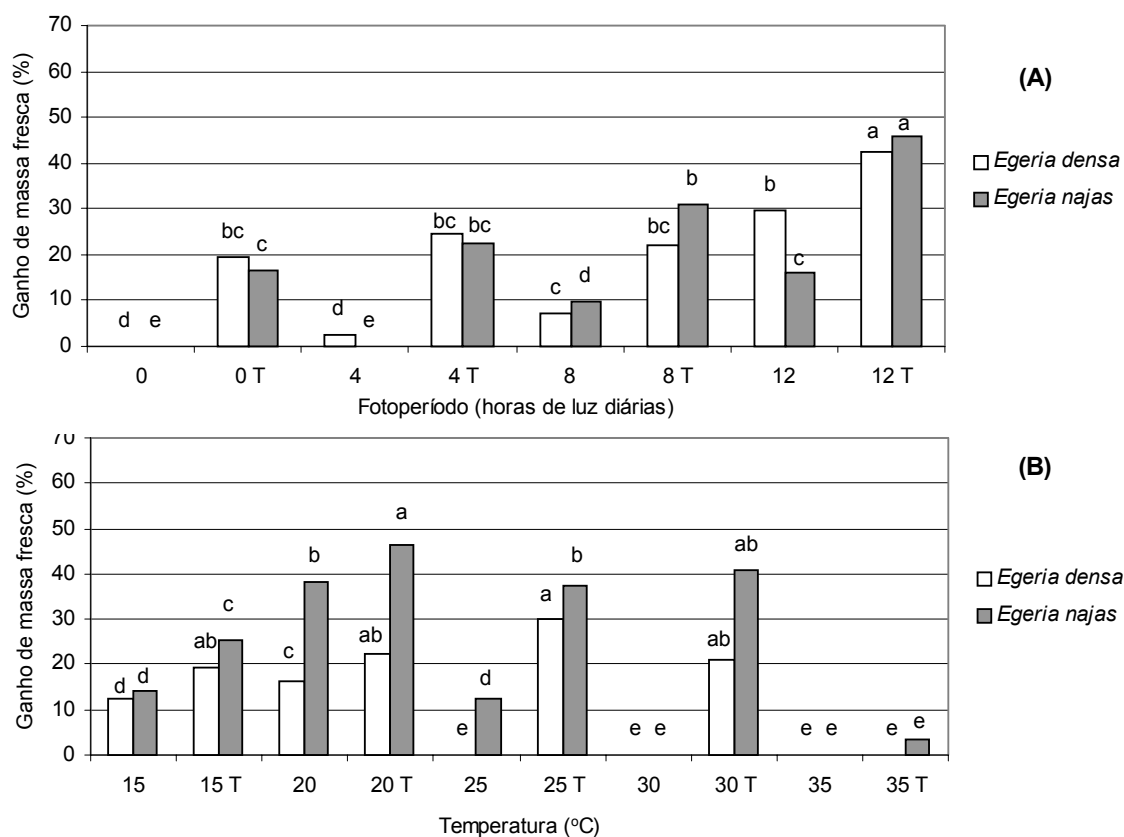
Matéria fresca

Fotoperíodo: As plantas de *E. densa* apresentaram maior produção de massa fresca no regime de 12 horas de luz e menor produção nos regimes de escuro total e 4 horas de luz (Figura 5-A). As plantas de *E. najas* não apresentaram produção de massa fresca nos tratamentos de 0 e de 4 horas de luz, diferindo estatisticamente das demais condições de fotoperíodo (Figura 5-A). Com relação às testemunhas das duas espécies estudadas, verificou-se, em todos os tratamentos, que estas apresentaram ganho de massa fresca superior ao das plantas inoculadas, sendo os maiores ganhos (aproximadamente 45%) obtidos no fotoperíodo de 12 horas (Figura 5-A). Os resultados mostram a importância do período luminoso para o crescimento das plantas. A maior intensidade de sintomas em menores períodos de luz pode estar relacionada às situações transitórias de oxigenação, concentração de CO₂ e pH da água, atividade fotossintética ou à debilidade da planta devido a alterações metabólicas. De modo geral, a severidade de doença é inversamente proporcional à capacidade da planta de crescer vegetativamente. Os fotoperíodos de 8 e 12 horas de luz proporcionaram melhores condições de produção de matéria fresca (Figura 5-A), apesar da presença do patógeno.

Temperatura: As plantas de *E. densa*, na presença do fungo, apresentaram menor produção de massa fresca quando submetidas às temperaturas de 15 e 20 °C (Figura 5-B); nas temperaturas de 25, 30 e 35 °C não foi constatado o crescimento vegetativo. Analisando as testemunhas dessa mesma espécie, observa-se que a única temperatura em que não ocorreu ganho de massa fresca foi a de 35 °C. Com relação a *E. najas*, não houve ganho de massa fresca nas temperaturas mais elevadas (30 e 35 °C), nos tratamentos inoculados com o patógeno. Os resultados observados mostram que os menores ganhos de massa fresca ocorreram devido à presença do patógeno, apesar de eles terem sido constatados também na ausência do fungo, em condições de temperatura elevada (35 °C para *E. densa*). O crescimento de *E. densa* foi paralisado a partir de 25 °C e o de *E. najas* a partir de 30 °C, na presença de *F. graminearum* (Figura 5-B).

O fotoperíodo e a temperatura ideais para o máximo desenvolvimento da doença podem variar de acordo com o patossistema, segundo Allen et al. (1983). Conforme Baensch & Riel (1993), *E. densa* e *E. najas* não estão classificadas como plantas de aquário que necessitam de intensa luminosidade para seu desenvolvimento. Camargo & Pezzato (2000) citam a temperatura, luminosidade, velocidade da corrente d'água, turbulência e profundidade como principais fatores físicos limitantes do crescimento de macrófitas. No presente estudo, as variações no fotoperíodo influenciaram, significativamente, o desenvolvimento das plantas tanto nos tratamentos inoculados como nas testemunhas não-inoculadas. Nos tratamentos com fotoperíodos iguais ou superiores a oito horas diárias de luz, foram observadas menores severidades da doença. Esse comportamento pode ser atribuído à maior atividade fotossintética das plantas e conseqüente menor atividade do fungo na presença de luz.

Nachtigal (2000) constatou que a atividade herbicida de *F. graminearum* se processou devido à produção contínua de micélio a partir de partículas inoculativas (micélio e conídios), bem como à liberação de metabólitos tóxicos produzidos pelo fungo e estabilizados pelos componentes do substrato (arroz). Os resultados obtidos com variações de temperatura



T = testemunha não-inoculada, onde foram adicionados grãos de arroz moídos na concentração de 0,7 g L⁻¹. Tratamentos seguidos da mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade para cada espécie.

Figura 5 - Efeito do fotoperíodo (A) e da temperatura (B) sobre o crescimento de plantas de *Egeria densa* e *E. najas*, avaliadas pelo incremento de massa fresca e inoculadas com *Fusarium graminearum*, isolado FCAV#940.

corroboram os apresentados por Nachtigal (2000), que observou aumento considerável na severidade da doença com temperaturas de 15 e 20 °C. No presente experimento, contudo, os aumentos de severidade foram mais expressivos nos tratamentos de 20, 25 e 30 °C. Observou-se maior sensibilidade de *E. densa* às temperaturas mais altas, resultando em aumento da senescência induzida, expressa por clorose generalizada dos tecidos. Apesar de o gênero *Egeria* ser nativo da América do Sul (Kissman, 1991), as espécies *E. densa* e *E. najas* podem ser encontradas crescendo em locais diversos, com distribuição geográfica diferenciada provavelmente em decorrência das condições da temperatura ambiente. As plantas de *E. densa* desenvolvem-se melhor em temperaturas de 20 a 24 °C, enquanto

plantas de *E. najas* necessitam de temperaturas mais altas (23 a 27 °C) para seu bom desenvolvimento (Baensch & Riel, 1993). Esse fato pode explicar, em parte, a maior sensibilidade de *E. densa* ao fungo, em temperaturas altas.

As informações aqui obtidas poderão auxiliar na interpretação de dados relacionados ao modo de ação do fungo e na identificação das variáveis que, uma vez alteradas, poderão contribuir para maior eficiência desse organismo como agente de biocontrole.

LITERATURA CITADA

ALLEN, S. J.; BROWN, J. F.; KOCHMAN, S. L. Effects of temperature, dew period and light on the growth and development of *Alternaria helianthi*. *Phytopathol.*, v. 73, p. 839-846, 1983.



- ANDERSON, L. W. J. Can *Egeria densa* be eradicated? Yes, but is it worth it? In: ANNUAL MEETING OF AQUATIC PLANT MANAGEMENT SOCIETY, 38., 1998, Memphis. **Abstracts...** Memphis: 1998. p. 18.
- BAENSCH, H. A.; RIEL, R. Aquarium Atlas. Melle: Mergus, 1993. v. 2. 1216 p.
- CAMARGO, A. F. M.; PEZZATO, M. M. Fatores limitantes da produção primária. In: WORKSHOP ECOLOGIA E MANEJO DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS, 2000, Maringá. **Resumos...** Maringá: Sociedade Brasileira de Limnologia, UEM; Nupelia, PEA, Eletrobrás, 2000. p. 10.
- CLARK, R. B. Characterization of phosphate of intact maize roots. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 23, p.458-460, 1975.
- CORRELL, D. S.; CORRELL, H. B. **Aquatic and wetland plants of southwestern United States**. Stanford: Stanford University Press, 1975. v. 1, p. 1-15.
- KISSMAN, K. G. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF Brasileira, 1991. Tomo I. 824 p.
- NACHTIGAL, G. F. **Desenvolvimento de agente de controle biológico microbiano de *Egeria densa* e *Egeria najas***. 2000. 160 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, 2000.
- MENDES, D. **Efeitos de herbicidas sobre alguns aspectos biológicos de *Fusarium graminearum*, agente potencial de controle biológico de *Egeria densa* e *Egeria najas***. 2002. 110 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, 2002.
- SHEARER, J. F. Development of a fungal pathogen for biocontrol of the submersed aquatic macrophyte *Hydrilla verticillata*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL CONTROL OF WEEDS, 9., 1996, Stellenbosch. **Proceedings...** Stellenbosch: 1996. p. 473-477.
- TANAKA, R.H. Prejuízos provocados pelas plantas aquáticas. In: WORKSHOP SOBRE CONTROLE DE PLANTAS AQUÁTICAS, 1998, Brasília. **Resumos...** Brasília: 1998. p. 36-38.

