



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS ERECHIM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

FRANCISCO WILSON REICHERT JÚNIOR

**CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS E SELETIVIDADE A CULTURAS PELA
APLICAÇÃO DE ISOLADOS FÚNGICOS**

**ERECHIM - RS
2017**

FRANCISCO WILSON REICHERT JÚNIOR

**CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS E SELETIVIDADE A CULTURAS PELA
APLICAÇÃO DE ISOLADOS FÚNGICOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental sob a orientação do Prof Dr. Altemir José Mossi.

Erechim - RS
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL – CAMPUS ERECHIM

ERS 135 – Km 72, nº200
CEP: 99700-970
Caixa Postal 764
Zona Rural
Erechim - RS
Brasil

PROGRAD/DBIB - Divisão de Bibliotecas

Júnior, Francisco Wilson Reichert
CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS E SELETIVIDADE A
CULTURAS PELA APLICAÇÃO DE ISOLADOS FÚNGICOS/ Francisco
Wilson Reichert Júnior. -- 2017.
57 f.:il.

Orientador: Altemir José Mossi.
Co-orientador: Lauri Lourenço Radünz.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Ciência
e Tecnologia Ambiental (PPGCTA) , Erechim, RS , 2017.

1. Bioherbicidas. 2. Manejo biológico de plantas
daninhas. 3. Controle sustentável de plantas daninhas.
I. Mossi, Altemir José, orient. II. Radünz, Lauri
Lourenço, co-orient. III. Universidade Federal da
Fronteira Sul. IV. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

FRANCISCO WILSON REICHERT JÚNIOR

**CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS E SELETIVIDADE A CULTURAS PELA
APLICAÇÃO DE ISOLADOS FÚNGICOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS. Para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental defendido em banca examinadora em ____/____/20__

Orientador (a): Prof. Dr. Altemir José Mossi

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Altemir José Mossi – UFFS
Orientador/Presidente

Prof. Dr. Leandro Galon – UFFS
Membro Interno

Prof. Dr. Márcio Antonio Mazutti - UFSM
Membro Externo

Erechim/RS, fevereiro de 2017

Dedico a toda a minha família, amigos e colegas pelo apoio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desse trabalho, em especialmente a minha família que tanto me apoiou nos momentos mais difíceis. E também a minha namorada Jéssica Mulinari, pelo apoio e companheirismo. Agradeço também ao meu orientador, Altemir José Mossi, que me acompanha desde a graduação, e cujo os conselhos levo para a vida inteira.

RESUMO

O uso incorreto de herbicidas para o controle de plantas daninhas tem ocasionado diversos problemas ambientais e o surgimento de espécies resistentes a diversos mecanismos de ação. Nesse sentido os bioherbicidas se destacam como uma alternativa ao controle convencional. Neste trabalho, foram realizadas coletas sistemáticas de plantas daninhas que apresentavam sintomas de enfermidades causadas por fungos. As amostras coletadas foram levadas ao laboratório de agroecologia da UFFS – campus Erechim onde as partes das plantas que apresentavam sintomas de doenças foram isoladas em meio de cultura BDA para desenvolvimento do possível microrganismo. Após, foram realizadas repicagens sucessivas até obtenção de culturas puras. Assim que as culturas puras foram obtidas, as mesmas foram crescidas em Shaker a 28 °C e 120 rpm, permanecendo nessas condições por três dias. Em seguida o fermentado foi retirado do Shaker, peneirado e alocado em borrifadores até o momento da aplicação. Os microrganismos obtidos foram submetidos ao *Screening* para avaliação das culturas com potencial fitotóxico. As plantas testes escolhidas foram o papuã (*Urochloa plantaginea*), leiteiro (*Euphorbia heterophylla*), picão-preto (*Bidens pilosa*) e a buva (*Conyza bonariensis*). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com 3 repetições. As avaliações foram visuais, sendo atribuídas notas de injúria sobre as folhas das plantas daninhas. Após os ensaios preliminares foram selecionados três fungos que apresentaram maior potencial fitotóxico, sendo utilizados em testes posteriores. Para os testes posteriores foi utilizado o mesmo delineamento experimental do *Screening*, contudo com a adição de adjuvante Áureo aos extratos. Os extratos também foram aplicados sobre as culturas soja, feijão e milho a fim de se verificar a seletividade a culturas. Os três microrganismos selecionados foram identificados como *Fusarium oxysporum*, *F. ploriferatum* e *Trichoderma koningiopsis*. Os extratos obtidos a partir desses microrganismos foram submetidos a análise de atividade enzimática de celulase, lipase, peroxidase e amilase. Dentre as plantas teste, a que mais apresentou sensibilidade ao controle biológico foi o leiteiro, apresentando sintomas para os três microrganismos selecionados. Dentre os microrganismos, o *T. koningiopsis* foi o que apresentou mais efeito sobre as plantas de leiteiro e, também, o que mais apresentou atividade enzimática para celulase e lipase demonstrando valores de 11,455 e 9,84 U/mL, respectivamente. Os sintomas observados foram necrose foliar, além de encarquilhamento e clorose. A partir dos testes realizados o microrganismo *T. koningiopsis* se destaca com as maiores notas de fitotoxicidade sobre o leiteiro, até 60% nas maiores doses com adição de adjuvante, devendo ser submetido a mais testes para a confirmação dos resultados observados nesse trabalho. Para as demais espécies de plantas daninhas, os microrganismos não apresentaram efeitos de controle. Em relação as culturas a que mais demonstrou sensibilidade foi o feijão apresentando necrose nas bordas foliares, em seguida a soja e por último o milho, no qual os microrganismos não apresentaram fitotoxicidade.

Palavras-chave: Bioherbicidas; Manejo biológico de plantas daninhas; Controle sustentável de plantas daninhas.

ABSTRACT

The incorrect use of herbicides for the control of weeds has caused several environmental problems and the emergence of species resistant to several mechanisms of action. In this sense, bioherbicides stand out as an alternative to conventional control. In this work, we collected systematic weeds that showed symptoms of diseases caused by fungi. The collected samples were taken to the agroecology laboratory of UFFS - Erechim campus where the parts of the plants that presented disease symptoms were isolated in BDA culture medium to develop the possible microorganism. Afterwards, successive repetitions were carried out until obtaining pure cultures. Once the pure cultures were obtained, they were grown in Shaker at 28 °C and 120 rpm, remaining in these conditions for three days. Then the fermented was removed from the Shaker, sieved and allocated in spray cans until the moment of application. The obtained microorganisms were submitted to Screening to evaluate the cultures with phytotoxic potential. The test plants chosen were papaya (*Urochloa plantaginea*), dairy (*Euphorbia heterophylla*), black pickle (*Bidens pilosa*) and buva (*Conyza bonariensis*). The design was completely randomized with 3 replicates. The evaluations were visual, being attributed notes of injury on the weed leaves. After the preliminary tests were selected three fungi that presented greater phytotoxic potential and were used in later tests. For the later tests the same experimental design of the Screening was used, however with the addition of Aureus adjuvant to the extracts. The extracts were also applied on the soy, beans and corn cultures in order to verify the selectivity to cultures. The three selected microorganisms were identified as *Fusarium oxysporum*, *F. ploriferatum* and *Trichoderma koningiopsis*. The extracts obtained from these microorganisms were submitted to enzymatic activity analysis of cellulase, lipase, peroxidase and amylase. Among the test plants, the most sensitive to the biological control was the milkman, presenting symptoms for the three selected microorganisms. Among the microorganisms, *T. koningiopsis* showed the most effect on dairy plants, and also showed the highest activity for cellulase and lipase, showing values of 11.455 and 9.84 U/mL, respectively. The observed symptoms were foliar necrosis, in addition to shading and chlorosis. From the tests performed, the microorganism *T. koningiopsis* stands out with the highest phytotoxicity scores on the milkman, up to 60% in the highest doses with addition of adjuvant and should be submitted to further tests to confirm the results observed in this work. For the other weed species, the microorganisms had no control effects. In relation to the crops that showed the greatest sensitivity was the bean presenting leaf necrosis, followed by soybean and finally corn, in which the microorganisms did not present phytotoxicity.

Keywords: Bioherbicides; Biological management of weeds; Sustainable weed control.

SUMÁRIO

| | |
|---|--------------------------------------|
| 1 INTRODUÇÃO | 9 |
| 2 OBJETIVOS | 11 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL..... | 11 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 11 |
| 3 JUSTIFICATIVA | 12 |
| 4 REFERENCIAL TEÓRICO | 13 |
| MANEJO BIOLÓGICO DE PLANTAS DANINHAS – BREVE REVISÃO..... | 13 |
| 1.1 INTRODUÇÃO..... | 14 |
| Plantas daninhas: controle com uso de bioherbicidas | 15 |
| Bioherbicidas baseados em animais | 18 |
| Bioherbicidas baseados em fungos, bactérias e/ou insetos | 20 |
| 1.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPETIVAS FUTURAS | 24 |
| Referências | Erro! Indicador não definido. |
| 5 METODOLOGIA | 25 |
| 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 31 |
| 7 CONCLUSÕES | 47 |
| REFERÊNCIAS | 48 |
| APÊNDICE | 56 |

1 INTRODUÇÃO

Até meados da segunda guerra mundial o controle de plantas daninhas, era realizado, principalmente, através do controle mecânico, rotação de culturas e seleção de sementes, contudo o trabalho exigido era considerável e o resultado muito variável (Schroeder, 1992).

A partir dos anos de 1960, com a revolução verde, buscou-se principalmente o controle baseado na seleção de cultivares de maior rendimento e em culturas com fins de exportação, como soja, milho, trigo, entre outras, além do uso de fertilizantes químicos e agrotóxicos para controle de doenças, insetos e plantas daninhas (Mazoyer; Roudart, 2008).

As plantas daninhas interferem no desenvolvimento das culturas, pois competem por água, espaço, nutrientes e luz e, quando em elevadas populações, podem proporcionar perdas elevadas, principalmente nos estádios iniciais das culturas, por isso o controle deve ser realizado nas épocas corretas (Zagonel et al., 2000).

Tendo em vista a necessidade do controle de plantas daninhas para o melhor desempenho das culturas agrícolas e a crescente demanda por novos produtos devido ao surgimento de espécies resistentes aos princípios ativos existentes vem se destacando o controle biológico. Os primeiros indícios de pesquisas buscando o controle biológico de plantas daninhas surgiram em meados de 1836 (Goeden, 1983).

A grande biodiversidade dos fungos os estabelecem em diversas áreas da atividade humana, desde aqueles para uso culinário como para controle de outros organismos. Para o controle biológico de plantas daninhas o foco principal está no uso de fungos fitopatogênicos, que são chamados de bioherbicidas (Charudattan, 2000).

O primeiro registro do uso de fungos para o manejo de plantas daninhas, na forma de biocontrole, ocorreu em 1971, com a *Puccinia chondrillina*, introduzido na Austrália para o controle de *Chondrilla juncea* (Barton, 2004).

Em 2009 existiam apenas 11 bioherbicidas disponíveis no mercado, isso mostra a necessidade de novos produtos serem desenvolvidos. No entanto, quando considerado os investimentos de indústrias químicas no desenvolvimento de bioherbicidas, estas apresentam uma taxa de sucesso abaixo de 1% contra uma taxa de sucesso de 5% no desenvolvimento de herbicidas (Ash, 2010; Klaic et al., 2015).

No trabalho de Ribbing & Williams (2006), ao testarem a capacidade herbicida de *Phomopsis amaranthicola* e *Microsphaeropsis amaranthi* sobre plantas daninhas do gênero *Amaranthus*, observaram que essas apresentaram sintomas severos de infecção pelos fungos, prejudicando o crescimento e desenvolvimento normal das plantas.

No trabalho de Ichikawa & Aoki (2000), ao isolarem manchas necróticas em orquídeas, identificaram os microrganismos *Fusarium subglutinans* e *F. ploriferatum*, e ao inocularem os isolados novamente em plantas saudias, verificaram o surgimento de manchas necróticas, comprovando a patogenicidade dos microrganismos. Entretanto os sintomas variavam entre manchas foliares amarelas e pretas, demonstrando que o mesmo microrganismo pode apresentar sintomas diferentes. Os fungos do gênero *Fusarium* já possuem patogenicidade estabelecida. O fungo *F. oxysporum* é agente causal de diversas doenças em muitas espécies de plantas, englobando desde plantas ornamentais a cultivadas. (Lins & Coelho, 2003; Cordeiro et al., 2004).

Um dos microrganismos muito utilizados no controle biológico é o *Trichoderma koningiopsis*, sendo empregado para controle de insetos e outros fungos. Todavia, há relatos desse microrganismo causando manchas foliares em plantas (Qian et al., 2013), podendo ter potencial, também, no controle de plantas daninhas.

A atividade bioherbicida dos microrganismos está relacionada com a compatibilidade entre planta e microrganismo. Os diferentes fatores de virulência estão diretamente envolvidos nesse processo de infecção. Primeiramente, os meios de entrada do microrganismo e dos compostos fitotóxicos poderiam ser através de enzimas que degradam a parede celular facilitando assim a penetração desses compostos. Enzimas como celulases e lipases degradariam as paredes celulares e membranas lipídicas, sendo o principal meio de entrada no interior da planta (Ghorbani et al., 2005; Cordeau et al., 2016).

Apesar de promissor, o biocontrole ainda enfrenta diversas dificuldades, dentre elas está a diversidade genética dos hospedeiros. Essa abordagem é importante, pois em muitos casos os patógenos de plantas apresentam alta especificidade, apresentando a *formae specialis*, que restringem muito o uso a apenas uma espécie de planta (Ash, 2010).

Visando uma agricultura sustentável, a busca por novos meios de controlar pragas infestantes de culturas agrícolas se faz necessário, onde os bioherbicidas representam um novo caminho em busca da sustentabilidade, pois apresentam uma forma ecológica de enfrentar os problemas que os produtores precisam resolver nas lavouras diariamente.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Isolar fungos fitopatogênicos presentes em plantas com potencial bioherbicida para manejo de plantas daninhas infestantes de culturas de verão.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Montar um banco de microrganismo fitopatogênicos no laboratório de Agroecologia da Universidade Federal da Fronteira Sul;
- Obter culturas fúngicas puras a partir de isolados de plantas daninhas apresentando sintomas de injúrias causadas por fitopatógenos;
- Avaliar o efeito bioherbicida de isolados fúngicos e de seus extratos sobre o crescimento e desenvolvimento de plantas daninhas, bem como seu efeito fitotóxico sobre plantas de interesse agrícola.

3 JUSTIFICATIVA

A agricultura familiar representa mais de dois terços dos postos de trabalho no campo. De um total de 17,3 milhões de trabalhadores ocupados na agricultura, mais de 13 milhões trabalham em regime familiar. Neste contexto, a região do Alto Uruguai Gaúcho, onde está inserida a Universidade, situada na mata atlântica, caracterizando-se basicamente pela agricultura familiar e a pequena propriedade, cuja base produtiva de grão é basicamente o milho, o trigo, o feijão e a soja, que está resultando em uma grande ação antrópica sobre este ecossistema. Além disso, o empobrecimento do meio agrícola tem gerado a necessidade crescente de se explorar cada vez mais os recursos naturais na busca da sobrevivência. Esta situação provoca necessidade ainda maior de desenvolvimento de tecnologias que permitam a exploração sustentável dos recursos naturais e que viabilizem economicamente a produção (Buainain et al., 2003; Gazolla & Schneider, 2013).

O Brasil, com seu amplo patrimônio genético e sua diversidade cultural, tem em mãos a oportunidade de buscar alternativas e estabelecer um modelo de desenvolvimento próprio e soberano, que prime pelo uso sustentável dos componentes da biodiversidade e respeite os princípios éticos e compromissos internacionais assumidos, principalmente a “Convenção sobre Diversidade Biológica”, e promova a geração de riquezas com inclusão social. Para tanto, a exploração de novos métodos de controle de pragas agrícolas, especialmente as plantas daninhas, tem vital importância na independência do agricultor familiar.

O uso demasiado de herbicidas para o controle de plantas daninhas gerou diversos problemas ao longo dos anos, como intoxicações alimentares, contaminação do ambiente e o surgimento de biótipos resistentes. Atualmente existem diversas espécies de plantas resistentes a mais de um mecanismo de ação dos herbicidas.

Nesse sentido, a busca por novas alternativas para o controle de plantas daninhas exibe notável importância, a fim de reduzir os problemas encontrados devido ao uso contínuo e equivocado de herbicidas na agricultura.

A potencialidade no uso de fungos para o controle de plantas daninhas vem ao encontro desse raciocínio, pois a partir de recursos naturais existe a possibilidade do controle ou retardo no crescimento e desenvolvimento dessas plantas. O uso de microrganismos para controle de plantas daninhas é chamado de bioherbicidas e apresentam uma possibilidade em contrapartida aos produtos químicos (Ash, 2010).

4 REFERENCIAL TEÓRICO

GALON, L.; MOSSI, A. J.; REICHERT JR, F. W.; REIK, G. G.; TREICHEL, H.; FORTE, C. T. Biological weed management – A short review. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.15, p. 116-125, 2016.

MANEJO BIOLÓGICO DE PLANTAS DANINHAS – BREVE REVISÃO

Resumo – Na atualidade busca-se reduzir o uso de agrotóxicos, pois além dos prejuízos ambientais provocados por eles, existe a preocupação com o consumo de alimentos contaminados com possíveis resíduos. A presente revisão de literatura tem como objetivo abordar o uso de bioherbicidas, além de se avaliar as perspectivas e as potencialidades desses como formas de manejo de plantas daninhas infestantes de ambiente agrícola e não agrícola. Há a necessidade crescente de se descobrir novas moléculas ou métodos capazes de se controlar as plantas daninhas infestantes de áreas agrícolas e não agrícolas. Assim sendo os bioherbicidas vem despertando o interesse de pesquisadores, técnicos e produtores. Estes podem ser formulados a partir de substâncias produzidas pelo metabolismo secundário de vegetais e/ou de microrganismos. As pesquisas realizadas apontam o controle eficiente com o uso de bioherbicidas, principalmente relacionados aos processos de germinação e desenvolvimento das plantas daninhas, podendo em alguns casos apresentar potencial fitotóxico mesmo quando essas estiverem em estádios avançados. Os bioherbicidas, além de serem eficientes no controle das plantas daninhas, reduzem os prejuízos ambientais provocados pelo uso contínuo de herbicidas sintéticos. O Brasil apresenta potencial para se usar os bioherbicidas, tendo em vista a diversidade vegetal e os diversos sistemas de cultivos agrícolas praticados no país.

Palavras-chave: Controle Biológico, Herbicidas alternativos, Sustentabilidade ambiental.

BIOLOGICAL MANAGEMENT OF WEEDS - BRIEF REVIEW

Abstract - Nowadays there is a seek to reduce the use of pesticides, as well the environmental damage caused by them and the concern about the possible consumption of food contaminated with pesticides residues. This literature review aims to address the use of

mycoherbicidas, and to evaluate the prospects and potential of these as ways to management the weeds in agricultural and non-agricultural environment. There is a growing need to find new molecules or methods able to control weeds found in agricultural and non-agricultural areas. Thus, the mycoherbicidas has aroused the interest of researchers, technicians and producers. These can be formulated from substances produced by the secondary metabolism of plants and/or microorganisms. Researches indicates efficient control with the use of mycoherbicidas, mainly related to the germination and development processes of weeds, and in some cases, have the phytotoxic potential even when the weeds are in advanced stages. The mycoherbicidas, besides being effective in weed control, reduce environmental damage caused by continuous use of synthetic herbicidas. Brazil has the potential to use the mycoherbicidas, in order to plant diversity and the various agricultural crops systems practiced in the country.

Keywords: Allelochemicals, Biological control, Environmental sustainability.

1.1 INTRODUÇÃO

A atividade agropecuária tem colaborado para o agravamento de problemas relacionados com o ambiente e tem deixando, muitas vezes, em segundo plano as questões que envolvem a sustentabilidade dos agroecossistemas (Leite et al., 2011). Os processos de degradações ambientais contribuem para a redução na produção de alimentos e o aumento de pragas (doenças, insetos e plantas daninhas) que podem ocasionara perdas significativas na produtividade e na qualidade dos alimentos produzidos.

Neste sentido, o uso de herbicidas para o controle de plantas daninhas pode contribuir para esse processo de degradação ambiental. Tendo em vista a necessidade de controlar a germinação, o crescimento e o desenvolvimento das plantas daninhas, a aplicação de herbicidas é um dos métodos mais utilizados pelos agricultores para elevar ou mesmo manter a produtividade agrícola, em consequência, o consumo destes agrotóxicos no Brasil é crescente (Veiga et al., 2006). Além da necessidade de controle na lavoura, existe também a aplicação de herbicidas sintéticos em plantas daninhas presentes em rodovias, ferrovias, gramados, cidades, dentre outros. Este uso contínuo e indiscriminado tem despertado grande preocupação, diante das consequências negativas aos agroecossistemas, as contaminações dos aplicadores e também possíveis resíduos presentes nos alimentos.

Diante dos problemas ocasionados pelo uso de agrotóxicos e a necessidade da busca pela sustentabilidade dos agroecossistemas a descoberta de bioherbicidas pode ser uma

ferramenta interessante. A utilização de produtos naturais apresenta-se como uma técnica importante para reduzir a poluição ambiental, além de não impedir os processos ecológicos naturais, como a dominância vegetal, a sucessão ecológica, a formação de comunidades e de vegetação clímax (Silva et al., 2007a). A pesquisa com alternativas baseadas em produtos naturais para o controle das plantas daninhas é extremamente importante na atualidade, até mesmo para controlar as plantas daninhas tolerantes ou resistentes a muitos herbicidas sintéticos.

Os primeiros indícios de pesquisas buscando o controle biológico surgiram em meados de 1836 (Goeden, 1983). Do ponto de vista sustentável e ecológico o controle biológico, provavelmente, seja o método mais desejável. Sendo assim, insetos fitófagos, fungos fitopatogênicos, bactérias fitopatogênicas, vírus fitopatogênicos, peixes, crustáceos, aves e extratos de plantas que contenham substâncias alelopáticas, ou substâncias fitotóxicas podem ser entendidos como agentes de biocontrole.

A sustentabilidade, a segurança ambiental e a potencial efetividade do controle, são assinaladas por Nachtigal (2009), como fatores preponderantes ao crescente interesse pelo uso das mais diferentes estratégias conhecidas de controle biológico. Os produtos naturais vêm sendo uma alternativa para o controle de plantas daninhas, a partir do desenvolvimento de bioprodutos baseados nos princípios da sustentabilidade (Ootani et al., 2013).

Neste sentido, a presente revisão de literatura tem como objetivo abordar o uso de bioherbicidas, além de se avaliar as perspectivas e as potencialidades desses como formas de manejo de plantas daninhas infestantes de ambiente agrícola e não agrícola.

Plantas daninhas: controle com uso de bioherbicidas

O herbicida natural produzido a partir de plantas (Tabela 1) ou microrganismos patogênicos para controle de plantas daninhas é denominado bioherbicida, sendo a maioria dos estudos focados no uso de fungos (Klaic et al., 2015). A utilização de fungos e/ou plantas nas técnicas de controle biológico são alternativas importantes, tendo em vista o potencial de utilização com menor impacto nos recursos naturais e menor contaminação dos alimentos e do aplicador (Padin et al., 1995).

Entretanto, pode-se resumidamente afirmar que para uma toxina ser utilizada com sucesso no controle biológico de plantas daninhas, deve apresentar as seguintes características: que seja fitotóxica à planta daninha, seletiva à cultura agrícola, solúvel em

água para facilitar a pulverização, facilidade de aplicação, causar baixo impacto ambiental, não contaminar os alimentos e o aplicador (Tremacoldi e Souza Filho, 2006).

São diversos os motivos que levam a se produzir bioherbicidas, baseados em aleloquímicos, dentre eles destacam-se o crescente aumento dos biótopos de plantas daninhas resistentes aos herbicidas sintéticos, a busca pela sustentabilidade dos sistemas agrícolas, a necessidade de produtos com baixa toxicidade aos mamíferos, alta especificidade e rápida degradação pelos microrganismos presentes no solo, entre outros (Tremacoldi e Souza Filho, 2006). Neste sentido, a descoberta de novos herbicidas baseados em produtos naturais é interessante sob o ponto de vista social, cultural e ambiental (Gomes et al., 2013), mas principalmente agrônomo, devido à chance de se obter controle alternativo às plantas resistentes a herbicidas, além de menor impacto ambiental.

Tabela 01: Descrição de pesquisas realizadas com bioherbicidas baseada em vegetais.

| Autor – ano | Planta daninha e/ou Planta controle | Planta com potencial alelopático |
|--------------------------|--|---|
| Pires et al., 2001 | <i>Bidens pilosa</i> ; <i>Amaranthus hybridus</i> | <i>Leucaena leucocephala</i> |
| Goetze e Thome, 2004 | <i>Brassica oleracea</i> var. <i>itálica</i> ; <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> ; <i>Lactuca sativa</i> | <i>Eucalyptus grandis</i> ; <i>Nicotina tabacum</i> |
| Wandscheer et al., 2011 | <i>Lactuca sativa</i> | <i>Hovenia dulcis</i> |
| Moraes et al., 2012 | <i>Bidens</i> sp.; <i>Digitaria</i> sp.; <i>Zea mays</i> | <i>Trifolium vesiculosum</i> |
| Cipriani et al., 2014 | <i>Handroanthus ochraceus</i> ; <i>Lactuca sativa</i> ; <i>Medicago sativa</i> ; | <i>Tecoma stans</i> |
| Diógenes et al., 2014. | <i>Lactuca sativa</i> | <i>Ziziphus joazeiro</i> |
| Nunes et al., 2014 | <i>Cucumis sativus</i> ; <i>Glycine max</i> ; <i>Lactuca sativa</i> | <i>Brassica napus</i> ; <i>Crambe abyssinica</i> ; <i>Crotalaria juncea</i> ; <i>Linum usitatissimum</i> ; <i>Raphanus sativus</i> |
| Albuquerque et al., 2015 | <i>Bidens pilosa</i> ; <i>Cenchrus echinatus</i> ; <i>Desmanthus virgatus</i> ; <i>Senna obtusifolia</i> | <i>Azadirachta indica</i> |
| Sartor et al., 2015 | <i>Bidens pilosa</i> ; <i>Lactuca sativa</i> ; <i>Zea mays</i> | <i>Pinus taeda</i> |

Atualmente tem-se usado substâncias alelopática derivadas da rota do acetato ou do chiquimato ou das duas combinadas para a formulação de herbicidas naturais. Estes aleloquímicos pertencem a várias classes como terpenos, alcalóides, compostos fenólicos, esteróides, ácidos graxos de cadeia longa, lactonas insaturadas, benzoxiazinonas, derivados do ácido cinâmico, cumarinas e compostos cianogênicos (Sartor et al., 2015).

Existem vários produtos químicos sintetizados a partir de compostos naturais oriundos de plantas ou microrganismos, dentre eles pode-se citar: Anisomicina isolado de *Streptomyces*

sp. comercializada com o nome de Methoxyphenone; Cineole, isolado de diferentes vegetais e comercializado com o nome de Cinmethyline; Ácido Quinolínico proveniente da *Nicotiana tabacum*, comercializada com o nome de Quinclorac (Hatzios, 1987).

Cabe salientar que posterior à descoberta de substâncias naturais com potencial herbicida, deve-se seguir as mesmas regulamentações dos agrotóxicos em geral, para os processos de formulação, padronização, empacotamento e comercialização (Tessmann, 2011).

Apesar de existirem diversas vantagens no uso de herbicidas naturais tem-se algumas desvantagens, dentre elas pode-se destacar os problemas com relação ao seu desenvolvimento e ao uso comercial, tendo em vista a dependência da eficiência dos agentes em relação aos fatores ambientais na produção, armazenamento, transporte e aplicação (Tessmann, 2011). Além disso, o desenvolvimento de uma nova molécula herbicida, baseada em substâncias naturais é um processo complexo e que demanda muito investimento e tempo (Guerra et al., 2014).

No biocontrole é importante considerar a diversidade genética dos hospedeiros, pois em vários casos os patógenos de plantas são muito específicos, muitas vezes esses microrganismos apresentam a *formae specialis* que restringem o uso a apenas uma espécie de planta (Ash, 2010). Ou também em determinadas situações mesmo que controlem uma gama maior de espécies de plantas daninhas, seu uso fica inviabilizado por ocasionar danos a cultura de interesse.

Outro problema enfrentado é o custo, tanto no processo como no registro, pois os bioherbicidas devem ser competitivos com os herbicidas sintéticos, em preço, eficácia, praticidade e na tecnologia de aplicação (Ash, 2010). Percebe-se também que as pesquisas com bioherbicidas recebem menos apoio em comparação as pesquisas com produtos químicos convencionais, investimentos em longo prazo acoplado a falta de apoio de administradores e agências de fomento tem sido os maiores obstáculos na introdução do controle biológico (Klaic et al., 2015).

Geralmente, o custo da fermentação de microrganismos é mais alto do que o custo para produzir agrotóxicos sintéticos, então para serem competitivos no mercado, os isolados microbianos devem apresentar alto potencial de controle e de rendimento durante a produção. Por considerarem o preço elevado nos estágios iniciais de produção, muitas empresas evitam o desenvolvimento de produtos não rentáveis.

Contudo, existem exemplos de que o custo de desenvolvimento nem sempre é uma barreira, como no caso do Constans[®], onde a empresa detentora economizou nos processos iniciais da produção em massa de esporos para garantir a viabilidade comercial, e o

Serenade[®], sendo esses dois produtos competitivos no preço em relação a produtos sintéticos (Klaic et al., 2015).

Nos últimos anos surgiram conferências para discutir o futuro e as perspectivas de novos agentes biocontroladores. Um exemplo foi a *Conferência Australiana e Neo zelandesa de biocontrole: Temas emergentes e perspectivas futuras* (Gurr et al., 2010). E no Brasil teve-se no *Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas (2014)* alguns painéis onde foram discutidos temas relacionados a novas formas de manejo de plantas daninhas com uso de bioherbicidas. No entanto, para que o controle biológico se estabeleça como uma forma alternativa no controle de plantas daninhas é necessário maior apoio a pesquisa nessa área, para que novas tecnologias sejam desenvolvidas e as antigas aprimoradas ou mesmo ainda o incentivo para extensionistas recomendarem e aplicarem esses produtos.

Bioherbicidas baseados em animais

O controle de plantas daninhas com animais tem sido utilizado em situações específicas e normalmente em locais onde se cultivam lavouras de pequeno porte. Produtores têm utilizado carneiros para controlar plantas daninhas em lavouras de café, porém algumas espécies não apresentam boa palatabilidade, sendo deixadas de lado durante o pastejo (Silva et al., 2007b) e isso se torna um problema sério, já que se inicia processo de seleção de espécies que podem posteriormente dominar o ambiente.

Peixes herbívoros (carpas, tilápias e outros) tem sido usados para o manejo de plantas de ambiente aquático (Miyazaki & Pitelli, 2003). Os mesmos autores verificaram controle de até 100% das espécies de *Egeria densa* e *E. najas* e de *Ceratophyllum demersum* utilizando-se o peixe pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Peixes também tem sido utilizados na safra e entre safra, para o controle de sementes de plantas daninhas infestantes do arroz irrigado, em especial a carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) em lavouras de Santa Catarina (SOSBAI, 2014). Nesse mesmo estado marrecos-de-pequim vem sendo utilizados, desde 1990, apresentando na época razoável adoção pelos agricultores (Eberhardt et al., 2003). Os marrecos e peixes (Figura 1) eram utilizados, principalmente, por pequenos produtores para controlarem o banco de sementes de plantas daninhas, em especial o arroz-daninho (arroz-vermelho e preto) e outras espécies, antes de se instalar a cultura do arroz irrigado.

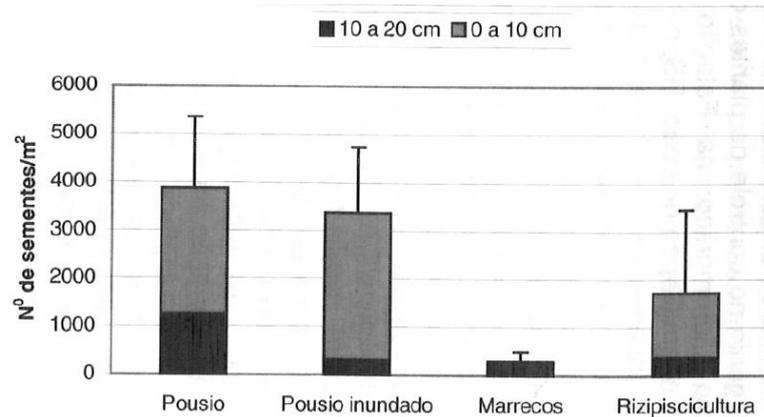


Figura 1. Banco de sementes de arroz-vermelho no solo, 130 dias após o povoamento dos peixes e marrecos. Epagri, Estação experimental de Itajaí/SC, 2003. Fonte: Adaptado de Eberhardt et al. (2003).

No entanto muitos agricultores que experimentaram a tecnologia não a adotaram efetivamente pela baixa disponibilidade de marrequinhos no mercado ou devido ao pouco sucesso no controle do arroz-vermelho (Eberhardt et al., 2003). Os produtores também almejavam obter renda adicional com a venda dos marrecos após o uso, e isso não ocorreu efetivamente em função da baixa procura por esse tipo de carne (Eberhardt et al., 2003). Os peixes e os marrecos-de-pequim podem reduzir significativamente a infestação de plantas daninhas existentes nas lavouras que utilizam esse método de controle.

De acordo com Eberhardt et al. (2002) tem-se eficiência no uso de marrecos para o controle de sementes de arroz-vermelho localizadas na superfície do solo (Figura 2), ao encontrarem 339 sementes inteiras da planta daninha no conteúdo estomacal de um animal. Porém os autores relatam que os marrecos ocasionam menor redução no banco de sementes localizadas em camadas mais profundas do solo, ao comparem com as camadas mais superficiais.

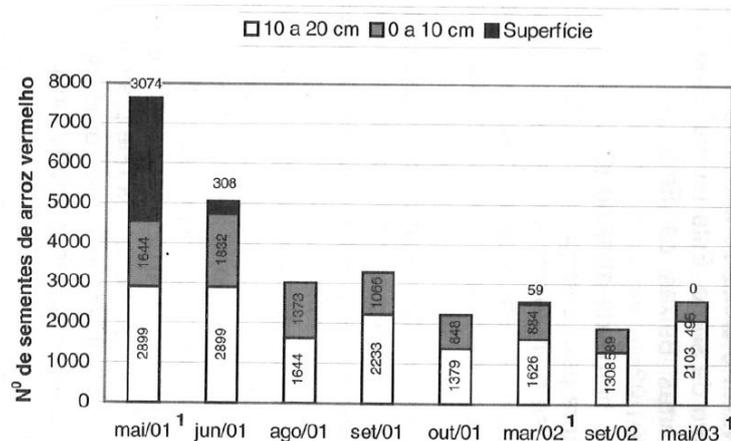


Figura 2. Evolução do banco de sementes de arroz-vermelho no solo na área ocupada com marrecos. Epagri, Ilhota/SC, 2003. Avaliação de pós-colheita e povoamentos de marrecos. Fonte: Adaptado de Eberhardt et al. (2003).

O uso de marrecos-de-pequim torna-se uma alternativa viável para o controle do banco de sementes de plantas daninhas localizados na superfície do solo, sem que o solo seja revolvido (Eberhardt et al., 2003).

Bioherbicidas baseados em fungos, bactérias e/ou insetos

Além dos testes com substâncias alelopáticas de vegetais existem pesquisas visando a utilização de microrganismos no controle biológico. Na sua grande maioria, o biocontrole está focado no uso de microrganismos, estes que podem ser patógenos de plantas ou produzirem componentes fitotóxicos. Fungos e bactérias, além dos metabólitos para processos biológicos fundamentais, produzem também metabólitos secundários e são assim denominados por não exercerem nenhuma função no metabolismo primário (Bell, 1981). A importância desses metabólitos secundários deve-se ao fato da sua fitotoxicidade ser específica, ou seja, apresentar eficácia e seletividade a determinada espécie, seja de planta daninha ou de cultura podendo assim se constituir em fonte relevante para a criação de novos herbicidas, sendo utilizados na forma direta ou como modelo para fabricação de moléculas para novos agrotóxicos (Zimdahl, 1993). Esses metabólitos não são essenciais para o crescimento do microrganismo, porém são excretados e estão presentes no meio de cultura ou no substrato em que esses fungos crescem. Quando eles são tóxicos para as plantas são chamados de fitotoxinas (Klaic et al., 2015).

Dentre as fitotoxinas com propriedades herbicidas produzidas por fungos estão as AAL – toxinas. Estas apresentam diferentes mecanismos de ação, um deles é a interrupção na produção de cloroplastos através do bloqueio da síntese da proteína nucleocitoplasmática e a outro é a inibição da energia produzida pela ATPase, fator complementar para o controle da fotofosforilação (Li et al., 2003). As AAL – toxinas e outras bases se mostraram efetivas na fuga de eletrólitos e perda de clorofila em concentrações na ordem de 20-40 nM (Abbas et al., 1998).

As pesquisas relacionadas aos compostos presentes no metabolismo secundário desses organismos que podem apresentar efeito herbicida, tem sido geralmente realizada a partir da prospecção de espécies, cultivares ou acessos, podendo ser seguida pelo isolamento e

identificação dos compostos ativos (Dias & Dias, 2007). Geralmente a pesquisa tende a iniciar com experimentos na atividade, abrangência de hospedeiros, normalmente em casas de vegetação e estudos sobre a epidemiologia para definir as condições ótimas para a infecção. Em menor escala existem experimentos que buscam demonstrar o potencial do biocontrole em situações reais de campo (Dias & Dias, 2007).

Para a fabricação de inóculo suficiente, fermentações em pequena escala são realizadas para produzir esporos ou micélios e, nesse caso, o teste de diferentes formulações e adjuvantes é necessária. Nesse estágio o agente de controle pode ser apresentado a uma empresa que poderá investir na sua produção (Ash, 2010).

Existem duas estratégias nas quais microrganismos são utilizados para o controle biológico de plantas daninhas: o método clássico e o método inundativo. O método clássico consiste na importação, introdução e liberação de um inimigo natural que tenha a mesma origem geográfica da planta daninha em uma área em que essa planta é um problema. Após a liberação, o patógeno é deixado para se perpetuar, sobreviver, e estabelecer, proporcionando assim o controle de plantas daninhas a longo prazo durante um longo período (Boyetchko et al., 2002). Geralmente este processo é mais utilizado em pastagens onde a perturbação é mínima (Klaic et al., 2015).

O método inundativo, é definido como o uso do patógeno através da inundação e aplicações repetitivas do inóculo (Charudattan & Dinoor, 2000). Os agentes patogênicos são frequentemente selvagens, produzidos em massa em laboratório e aplicados durante a estação de crescimento das plantas daninhas. O controle é de curto prazo, em comparação ao método clássico, e os agentes biológicos não devem persistir no ambiente. A maioria dos microrganismos utilizados como bioherbicidas são predominantemente fungos patogênicos (Klaic et al., 2015).

O início do uso de fungos como controle de plantas daninhas na forma de biocontrole ocorreu em 1971, com o fungo *Puccinia chondrillina* que foi introduzido na Austrália para o controle de *Chondrilla juncea* (Klaic et al., 2015).

O primeiro bioherbicida registrado para uso comercial nos Estados Unidos foi o DeVine[®], que era uma formulação líquida composta de clamidósporos do fungo de solo *Phytophthora palmivora* para controle de *Morrenia odorata* em citrus (Boyetchko et al., 2002). Esse produto controla a planta daninha com taxas superiores a 90% e o controle pode persistir por dois anos (Li et al., 2003). Nesse mesmo país o fungo *Coletotrichum gloeosporioides* é utilizado para o controle de angiquinho (*Aeschynomene virginica*)

infestante das culturas de soja, milho e principalmente do arroz irrigado, sendo esse herbicida natural registrado como Collego® (Silva et al., 200b).

Para o controle de fedegoso (*Senna obtusifolia*) desenvolveu-se o produto Casst® a base do fungo *Alternaria cassiae* e para a *Malva pusilla* foi criado o produto com o fungo *C. gloeosporoides* f.sp. *malvae*, marca comercial Biomal® (Victoria Filho et al., 2014).

Insetos também são utilizados para o controle biológico de plantas daninhas infestantes de culturas. Na Austrália larvas do inseto (*Cactoblastis cactorum*) foram utilizadas para controlar cactos (*Opuntia* spp.) e no Havai, o cambara-de-espinho (*Lantana câmara*) foi controlado pelos insetos *Agromisa lantanae* e *Crociosema lantanae* (Silva et al., 2007b).

No Brasil, isolados de *Fusarium graminearum* vêm sendo pesquisados como agentes para o controle biológico de *E. densa* e de *E. najas*, plantas aquáticas que causam problemas em ambiente aquático (Silva et al., 2007b). Porém sabe-se que o fotoperíodo influencia a eficiência de controle das espécies pelo fungo, e temperaturas acima de 30°C ocasionam melhor controle de *Egeria* (Borges Neto et al., 2005).

Atualmente existem diversos estudos que utilizam microrganismos, principalmente fungos, no controle de plantas daninhas e/ou plantas testes. Alguns destes resultados estão apresentados na Tabela 02.

Dentre os principais produtores de toxinas encontram-se os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps*, *Alternaria*, *Strachybotrys*, *Mycrothecium*, *Phoma* e *Diplodia* (Tremacoldi e Souza Filho, 2006). No entanto, apesar de se mostrarem eficientes os herbicidas naturais baseados em fungos são métodos restritos a lugares específicos, pois as variações ambientais influenciam a eficácia e em muitas situações até mesmo a seletividade. Como por exemplo, os fungos *Rhynchosporium alismatis* (sin. *Plectosporium alismatis*) e *P. tabacinium* são eficientes no controle de *Sagittaria pygmaea*, *S. guayanensis* e *S. trifolia*, entretanto a aplicação em campo desses micoherbicidas é dificultada pelas limitações biológicas, tecnológicas, ambientais e econômicas (Chung et al., 1998). Dentre outros entraves para o desenvolvimento de bioherbicidas com fungos patogênicos encontram-se a necessidade de longos períodos de molhamento, baixa fecundidade, baixa virulência (Barreto, 2009) e também pela especificidade que esses agentes apresentam sobre as plantas daninhas ocorrentes na lavoura; em raros casos uma única espécie de planta daninha é a responsável pela infestação.

Tabela 02: Espécies de fungos com efeito fitotóxico sobre espécies vegetais.

| Fungos | Planta | Autor |
|---|-----------------------------|---------------------------------|
| <i>Fusarium nygamai</i> | <i>Striga hermonthica</i> | Abbasher & Sauerborn (1992) |
| <i>Colletotrichum orbusculare</i> | <i>Xanthium spinosum</i> | Auld & Say (1999) |
| <i>Fusarium tumidum</i> | <i>Ulex europaeus</i> | Morin et al. (2000) |
| <i>Phytophthora palmivora</i> | <i>Morrenia odorata</i> | Boyetchko et al. (2002) |
| <i>Puccinia lagenophorae</i> | <i>Senecio vulgaris</i> | Grace & Schärer (2003) |
| <i>Phomopsis amaranthicola</i> e <i>Microsphaeropsis amaranthi</i> | <i>Amaranthus</i> sp. | Ortiz-Ribbing & Williams (2006) |
| <i>Colletotrichum coccodes</i> | <i>Abutilon theophrasti</i> | Meir et al. (2009) |

Para que um produto biológico possa vir a ser comercializado e utilizado por produtores são necessários diversos processos para considerar a sua viabilidade, conforme ilustrado na Figura 3.

Na agricultura contemporânea o controle biológico de plantas daninhas pode apresentar papel fundamental, em situações de controle de plantas daninhas problemáticas aos outros métodos de controle ou ainda para adoção do manejo integrado de plantas daninhas. Salienta-se que, normalmente, a eliminação de uma única espécie daninha em uma comunidade infestante pode somente abrir espaço para desenvolvimento das demais espécies. Mas se a espécie daninha eliminada for de difícil controle como a buva (*Conyza* spp.) ou o capim-amargoso (*Digitaria insularis*), por exemplo, sua supressão da lavoura torna-se altamente significativa e positiva.

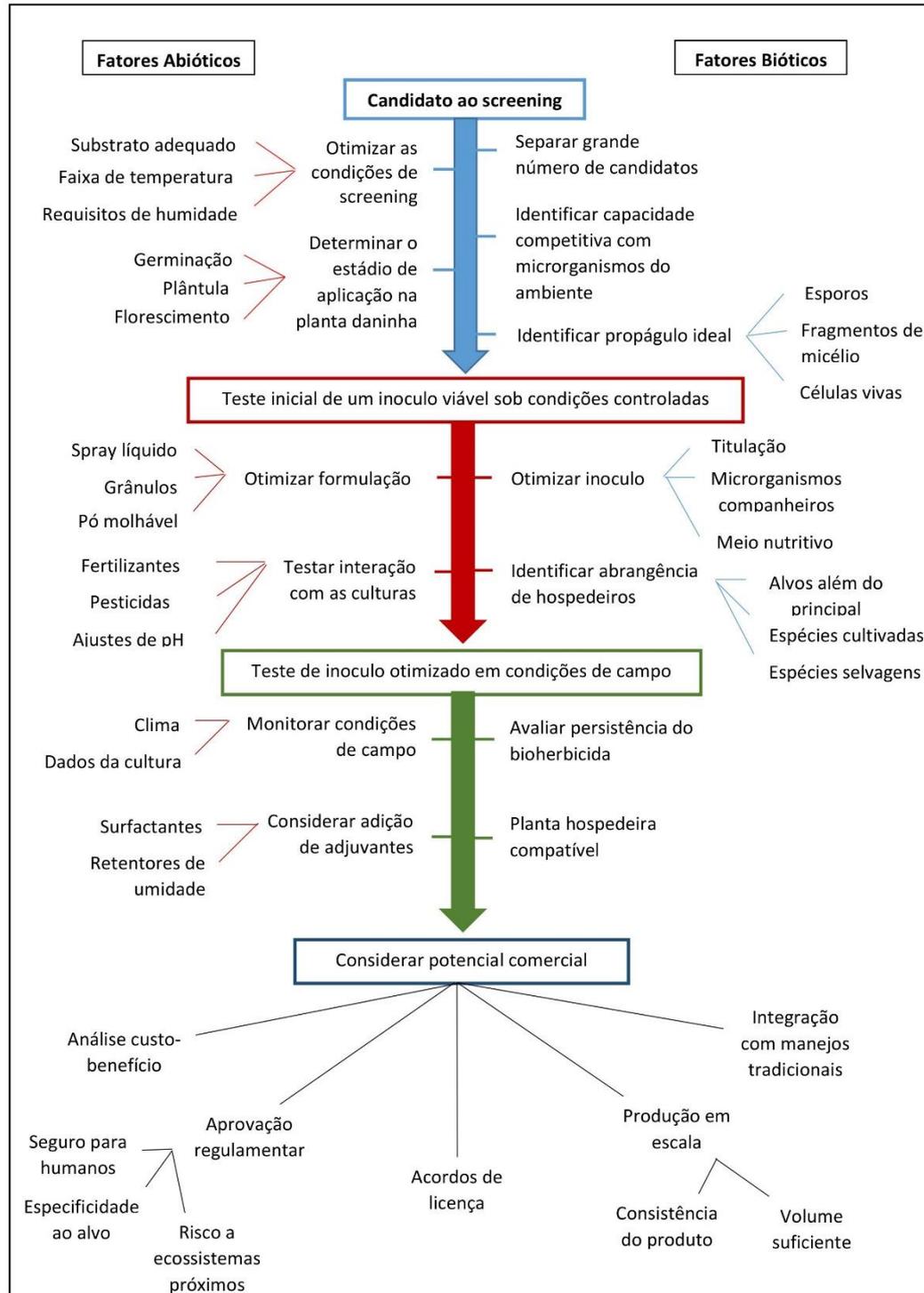


Figura 3. Diagrama de processos para produção de bioherbicidas.

Fonte: Adaptado de Harding & Raizada, 2015.

1.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPETIVAS FUTURAS

Os herbicidas sintéticos foram amplamente utilizados para controlar as plantas daninhas, entretanto o surgimento de populações resistentes ou tolerantes, problemas

ambientais gerados, contaminação de aplicadores e de alimentos, os efeitos prejudiciais aos organismos presentes no solo, entre outros motivos tem induzido a busca por novas estratégias de manejo.

Neste sentido, formular herbicidas com novos sítios de ação é muito importante, tendo em vista que o aparecimento de plantas daninhas com resistência aos herbicidas convencionais tem aumentado e muito nos últimos anos. Além dos problemas com a resistência, tem-se a clareza que o sucesso da atividade agrícola está diretamente relacionado ao emprego de métodos eficientes no manejo de plantas daninhas.

O estudo de toxinas produzidas por patógenos e por plantas é bastante nova e representa a chance para o desenvolvimento de herbicidas comerciais que sejam eficientes no controle das plantas daninhas e/ou menos prejudiciais as culturas agrícolas e ao ambiente, permitindo o desenvolvimento de sistemas agrícolas sustentáveis.

A adoção de novas formas de manejo de plantas daninhas como a integração dos métodos de controle; cultural, físico, mecânico, biológico e preventivo, torna-se importante na substituição ou mesmo para um menor uso do controle químico, já que esse tem gerado muitos problemas ao ambiente e também ao homem, sejam esses problemas gerados pelo mau uso dessa técnica ou inerentes ao próprio método.

5 METODOLOGIA

5.1 COLETA DE PLANTAS INFECTADAS

Foram realizadas coletas sistemáticas de plantas daninhas infectadas, exibindo sintomas típicos de enfermidades (Figura 2), em áreas de cultivo de culturas de verão e inverno na região do Alto Uruguai Gaúcho, no período de dezembro de 2015 a abril de 2016.

As amostras coletadas foram acondicionadas em sacos plásticos individuais e mantidas sob resfriamento em caixas de isopor. Após, foram transportadas para o laboratório de Microbiologia da Universidade Federal da Fronteira Sul de Erechim, onde foi realizado o isolamento dos microrganismos fitopatogênicos.



Figura 4. Plantas daninhas coletadas com sintomas de doenças, na região do Alto Uruguai Gaúcho. (A) milhã (*Digitaria ciliares* Willd); (B) picão preto (*Bidens* sp.); (C) leiteiro (*Euphorbia heterophylla*).

5.2 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS FITOPATOGÊNICOS

O isolamento dos microrganismos, a partir das amostras de plantas coletadas, foi realizado em placas de Petri, contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) e incubadas a 28°C por 7 dias. Após esse período foram realizadas repicagens sucessivas, no próprio meio de cultura, até a obtenção de culturas puras. As culturas puras foram liofilizadas e armazenadas em freezer até o momento de serem utilizadas no processo fermentativo.

5.3 PROCESSO FERMENTATIVO

A obtenção do extrato foi realizada em fermentação submersa, através do uso de frascos agitados em shaker, contendo 350 mL de meio de cultura. O preparo do meio de cultura foi realizado com as seguintes proporções: 10 g L⁻¹ de glicose (C₆H₁₂O₆); 7,5 g L⁻¹ de extrato de levedura; 10 g L⁻¹ de peptona; 2 g L⁻¹ de sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄; 0,5 g L⁻¹ de sulfato de magnésio (MgSO₄.7H₂O); 1 g L⁻¹ de sulfato ferroso (FeSO₄.7H₂O) e 1 g L⁻¹ de sulfato de manganês (MnSO₄.H₂O) (Souza, 2015).

Os meios de cultura líquidos foram esterilizados em autoclave a 121°C por 30 minutos. Após atingirem a temperatura ambiente, os microrganismos foram inoculados utilizando o meio de cultura estéril, vertido posteriormente sobre a colônia microbiana na placa de Petri, com o auxílio de uma lâmina microscópica esterilizada.

As fermentações foram realizadas a 28°C em shaker, agitados a 120 rpm, permanecendo por 3 dias nessas condições. Após, os frascos contendo os microrganismos foram peneirados e alocados nos borrifadores até o momento da aplicação.

5.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS EXTRATOS

Para avaliar a atividade enzimática dos extratos foram selecionadas enzimas, para a qual a metodologia era compatível com os equipamentos e reagentes do laboratório. As enzimas escolhidas foram: (1) Celulase; (2) Peroxidase; (3) Lipase e (4) Amilase.

5.4.1 Atividade Celulase

Seguindo a proposta de Ghose (1987), com algumas alterações, foram pesados 50 mg de papel de filtro Whatman número 1 (fonte de celulose) e adicionados a tubos de ensaio contendo 2 mL de tampão acetato 0,2 M, pH 5,5. Um volume de 1 mL da solução enzimática

foi adicionado ao tubo em banho termostático a 50 °C por 1 hora. A liberação de açúcares redutores totais foi medida pelo método DNS (MILLER, 1959). Para o cálculo da atividade da celulase foi utilizada a Equação 1 - $y=12,626x - 0,1268$ para a atividade de glicose:

Equação 1. Equação utilizada para calcular a atividade de celulase.

$$y = 12,626x - 0,1268$$

5.4.2 Atividade Peroxidase

O meio reacional foi preparado com 1,5 mL de tampão fosfato pH 5,0 5mM, 2 mL de água destilada, 0,5 mL de guaiacol 1% e 1 mL de peróxido de hidrogênio 8%. O meio reacional foi exposto ao banho termostático em temperatura de 35°C. Após estabilização da temperatura adicionou-se 1 mL do extrato enzimático ao meio reacional, mantendo em banho termostático por 20 minutos. A leitura de transmitância foi realizada em espectrofotômetro UV-VIS 470nm (Khan & Robinson, 1994).

5.4.3 Atividade Lipase

Foram pipetados 2 mL de enzima em 18 mL de emulsão. A emulsão foi composta de 5% de goma arábica, 10% de óleo de oliva e 90% de tampão fosfato 100 mM a pH 6. Após foram levados ao Shaker por 32 minutos a 35 °C a 165 rpm. Para a reação foi adicionado 20 mL de acetona etanol. Para a titulação foi medido o pH da solução e adicionado NaOH 0,05 M até atingir pH 11. Um controle também foi montado a partir de 18 mL de emulsão, 20 mL de acetona-etanol e 2 mL, porém sem ser levado ao shaker, para servir de comparação para os demais testes. Para o cálculo da atividade foi utilizado a equação 2 - $At = (\bar{A}a - Vb) * MNaOH / t * Vc * 1000$:

Equação 2. Equação utilizada para calcular a atividade de lipase.

$$At = \frac{(\bar{A}a - Vb) * MNaOH}{t * Vc} * 1000$$

Em que: $\bar{A}a$ é a média dos valores observados; Vb é o valor apresentado pelo controle; $MNaOH$ é o valor da molaridade do hidróxido de sódio; t é o tempo de reação e Vc é o volume enzimático utilizado (Treichel et al., 2016).

5.4.4 Atividade Amilase

Foi utilizado o método descrito por Fuwa (1954) e Pongsawasdi e Yagisawa (1987), com algumas alterações. Foi diluído amido em tampão acetato 100 mM pH 5,0 na proporção de 1:100. Após, 1 mL do amido diluído foi pipetado juntamente com 1 mL do extrato e incubados a 38 °C por 10 minutos. A atividade enzimática foi determinada pelo método DNS, mesma metodologia utilizada para a atividade da celulase.

5.5 SCREENING

Esse experimento visou identificar as culturas puras com capacidade de inibição do desenvolvimento de plântulas diante de uma grande diversidade de isolados.

O bioensaio foi conduzido em casa de vegetação, no qual foram utilizadas as plantas daninhas picão-preto, papua, leiteiro e buva para se avaliar a eficácia dos extratos.

A semeadura das plantas daninhas foi realizada em bandejas plásticas, contendo substrato e terra. A aplicação dos bioherbicidas ocorreu quando as plantas apresentavam de 2 a 4 folhas.

5.6 IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS SELECIONADOS

O DNA dos isolados foi extraído conforme método descrito por Doyle e Doyle (1987), a partir do micélio crescido em meio de cultura. A amostra de DNA genômico extraído foi submetida à reação em cadeia pela polimerase (PCR) para amplificação da região ITS (internal transcribed spacer) do rDNA. Os oligonucleotídeos iniciadores para a região ITS foram ITS1 (5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3') e ITS4 (5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3') (White et al., 1990). A mistura para a PCR consistiu de 1 µL de DNA, 1 µL de cada primer a 10 µM, 10 µL de tampão para PCR 5X, 1 µL de dNTPs a 10 mM, 0,2 µL de GoTaq DNA polimerase 5U/µL (Promega) e 35,8 µL H₂O MilliQ autoclavada, para um volume final de 50 µL. O programa de amplificação consistiu de desnaturação inicial a 94 °C/2 min seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94 °C/10 s, anelamento a 54 °C/30 s, extensão a 72 °C/45 s, e extensão final a 72 °C/4 min. A verificação dos produtos amplificados foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo. Os produtos amplificados foram purificados através de precipitação com polietilenoglicol (Schmitz & Riesner, 2006), submetidos à reação de sequenciamento pelo método de terminação de cadeia, empregando-se o reagente Big Dye 3.1 (Applied Biosystems) e analisados em sequenciador capilar automático 3500 XL (Applied Biosystems). Sequências similares às obtidas para os isolados do presente estudo foram encontradas no GenBank através da ferramenta Blastn.

5.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL: SCREENING

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 3 repetições. Os tratamentos consistiram da aplicação dos extratos obtidos na fermentação. Os diferentes

extratos usados nas plantas foram considerados tratamentos aplicando-se os mesmos diretamente na parte aérea da planta até o escoamento com borrifador de jardim.

Após os *Screening* para os microrganismos selecionados, foram realizados testes com a adição de óleo vegetal (Aureo[®] óleo vegetal de soja) para melhorar a adesão do sobrenadante sobre a folha. As testemunhas foram compostas de plantas sem a aplicação de nenhum tratamento e plantas com a aplicação apenas do óleo vegetal para avaliação de fitotoxicidade. As análises foram visuais efetuadas 1, 7 e 15 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT), dando-se notas de injúria a partir de uma escala diagramática proposta por Nunes & Alvez (2011), com adaptações (Figura 5).

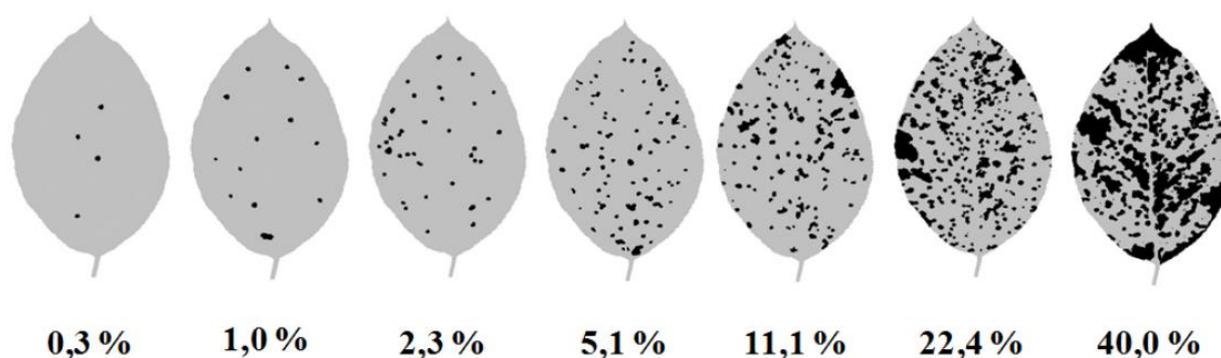
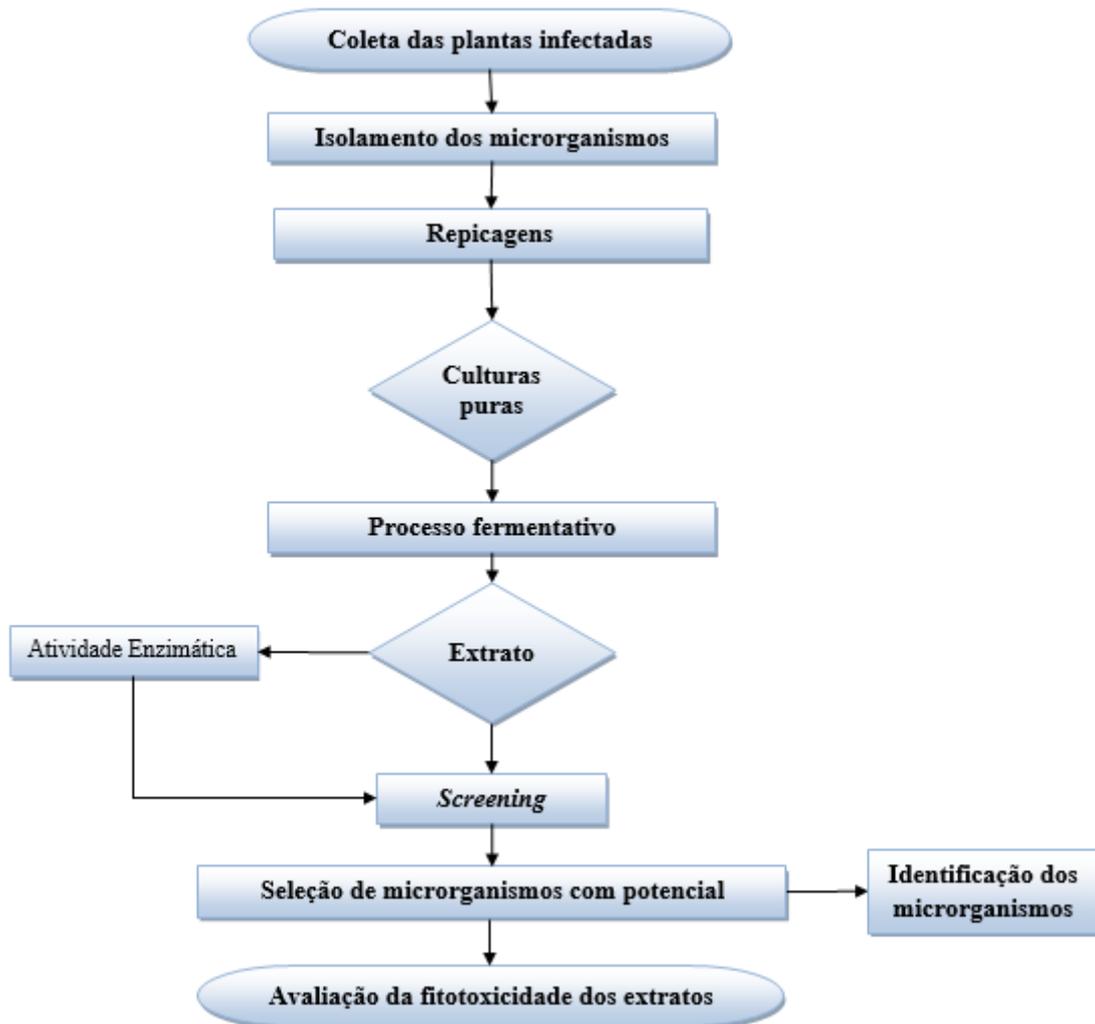


Figura 5. Escala diagramática usada para avaliar injúrias nas plantas testes. Onde: 0% foi conferida a nota E; 0,3% a 2,3% nota D; de 2,3 a 11,1% nota C; 22,4 a 40,0% nota B e acima de 40,0% nota A.

5.8 AVALIAÇÃO DA FITOTOXICIDADE DOS FUNGOS SELECIONADOS

Para o teste com os microrganismos selecionados foi adicionado aos extratos adjuvante, óleo vegetal Aureo[®] concentrado Emulsionável (EC), na dose recomendada de 0,1% v/v (100 mL em 100 litros de água). Foram testadas nas concentrações de 1, 2, 4 e 8x a dose cheia (extrato puro). As avaliações foram realizadas 1, 7, 15, 20 e 30 dias após a aplicação dos tratamentos, atribuindo-se notas de injúria sobre as plantas de acordo com a escala diagramática supracitada. Para se avaliar o efeito sobre o milho, soja e feijão foi aplicado o extrato com o óleo vegetal, sendo realizadas as mesmas avaliações nas plantas daninhas. Para fins de comparações foram usados dois controles, um sem aplicação de extratos e outro apenas com a aplicação de água e adjuvante. Para o teste de potencial bioherbicida o delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), com 3 repetições e 12 tratamentos. A planta daninha buva (*Conyza bonariensis*) foi retirada do bioensaio por dificuldades de germinação.

A seguir está apresentado o fluxograma referente a metodologia utilizada no trabalho.



6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS

Foram isolados 30 microrganismos que se encontram armazenados no laboratório de Agroecologia da Universidade Federal da Fronteira Sul (Figura 3). Esses microrganismos foram submetidos ao *Screening*, visando identificar cepas com potencial bioherbicida. Para organização dos fungos isolados foi criado um sistema de códigos (Apêndice) para identificar a que planta e em que localidade esse fungo foi encontrado.



Figura 6. Banco de microrganismos fitopatogênicos do laboratório de Agroecologia.

6.2 SCREENING DE MICRORGANISMOS

A partir dos microrganismos isolados foi realizado o *Screening* (Figura 7), visando identificar cepas com potencial fitotóxico. A partir dos testes foram selecionados 3 microrganismos que apresentaram maior potencial, os quais seguiram para testes posteriores. Os microrganismos foram selecionados quando apresentaram dano a pelo menos uma das plantas teste. A partir do sistema de códigos estabelecido, os três microrganismos foram denominados de 5ERC1, 2QI1 e 1SV1, que posteriormente foram enviados para identificação. O microrganismo 5ERC1 foi isolado da espécie *Solidago chilensis*, coletada no município de Erechim - RS. O isolado 2QI1 foi obtido da espécie *Digitaria ciliaris* coletada no município de Quatro Irmãos – RS, e o isolado 1SV1 foi obtido da espécie *Euphorbia heterophylla*, coletada no município de Severiano de Almeida – RS.

Apesar de serem isolados em diferentes locais e espécies, os três microrganismos selecionados apresentaram dano na mesma espécie de planta daninha, o leiteiro. O sucesso de um bioherbicida depende, entre outros fatores, da interação entre patógeno e planta. A diversidade genética do patógeno e das plantas-alvo adquire grande influência na efetividade do microrganismo. No processo evolutivo e em relações bióticas existem evidências em raças de fungos da existência da *formae specialis* em que o microrganismo se torna extremamente específico para determinado gênero ou espécie de hospedeiro, fator que pode ser determinante no sucesso de um bioherbicida (Delourme et al., 2008; Wunderlich et al., 2008; Ash, 2010).



Figura 7. Screening visando identificar microrganismos com potencial dos extratos. Erechim – UFFS, 2016).

Dentre as plantas utilizadas, a que apresentou maior susceptibilidade aos microrganismos selecionados foi o leiteiro (*Euphorbia heterophylla*), com danos de até 10% na folha (Tabela 1). As análises visuais após os 15 DAT não foram inseridas por não se observarem novos sintomas ou danos.

Tabela 1. Efeito de controle dos extratos obtidos sobre as plantas testes, apresentados em notas a partir da escala diagramática, aos 1, 7 e 15 dias após a aplicação do tratamento.

| Microrganismos | Dias após o tratamento (DAT) | | |
|-----------------------------|------------------------------|---|----|
| | 1 | 7 | 15 |
| <i>Urochloa plantaginea</i> | | | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 2QI1 (<i>Trichoderma koningiopsis</i>) | E | E | E |
| 1SV1 (<i>Fusarium oxysporum</i>) | E | E | E |
| 5ERC1 (<i>Fusarium ploriferatum</i>) | E | E | E |
| Controle | E | E | E |
| <i>Euphorbia heterophylla</i> | | | |
| 2QI1 (<i>Trichoderma koningiopsis</i>) | D | C | C |
| 1SV1 (<i>Fusarium oxysporum</i>) | D | C | C |
| 5ERC1 (<i>Fusarium ploriferatum</i>) | E | D | D |
| Controle | E | E | E |
| <i>Conyza bonariensis</i> | | | |
| 2QI1 (<i>Trichoderma koningiopsis</i>) | E | E | D |
| 1SV1 (<i>Fusarium oxysporum</i>) | E | E | E |
| 5ERC1 (<i>Fusarium ploriferatum</i>) | E | E | E |
| Controle | E | E | D |
| <i>Bidens sp.</i> | | | |
| 2QI1 (<i>Trichoderma koningiopsis</i>) | E | E | E |
| 1SV1 (<i>Fusarium oxysporum</i>) | E | E | E |
| 5ERC1 (<i>Fusarium ploriferatum</i>) | E | E | E |
| Controle | E | E | E |

Porcentagem de fitotoxicidade onde: 0% foi conferida a nota E; 0,3% a 2,3% nota D; de 2,3 a 11,1% nota C; 22,4 a 40,0% nota B e acima de 40,0% nota A.

Com exceção do leiteiro, nenhuma das plantas testes se mostrou suscetível aos microrganismos avaliados (Tabela 1). Em buva, devido à dificuldade de germinação, plântulas foram transplantadas do campo para a casa de vegetação. Após um período de adaptação (7 dias) os extratos foram aplicados sobre as plantas de buva. Foi observado encarquilhamento nas folhas das plantas de buva, contudo como esse sintoma foi observado também no controle, não foi possível inferir se o efeito foi dos microrganismos ou algum dano a raiz durante o transplante.

Por meio do *Screening*, foi possível perceber que das plantas daninhas escolhidas para o teste dos extratos, o leiteiro foi a que apresentou suscetibilidade aos três microrganismos, sendo a planta daninha mais adequada ao controle biológico dentre as plantas teste.

Observou-se que a partir dos 7 dias após a aplicação, as plantas que apresentaram danos pelos bioherbicidas iniciaram a emissão de novos brotos, sugerindo que o dano foi apenas de contato e não de forma sistêmica (Figura 8). A supressão dos danos pode estar relacionada a resposta hipersensitiva, esse fenômeno é uma das principais respostas de defesa da planta contra o ataque de patógenos, sendo uma resposta rápida e localizada na região de infecção do patógeno. Se caracteriza por um rápido e localizado colapso do tecido vegetal ao redor da infecção, impedindo a progressão da doença e circulação de compostos tóxicos (Agrios, 2004).



Figura 8. Danos a plantas de leiteiro aos 7 (A) e aos 15 (B) DAT.

Os resultados demonstram que as plantas de leiteiro continuaram emitindo novas folhas, devido ao fato de que as doenças não atacam os tecidos meristemáticos, as plantas são capazes de produzir novas folhas saudáveis, ou rebrotes em alguns casos. Os incrementos de tecido saudável, acompanhado da perda de tecido doente, ajudam na redução da pressão causada pela doença, diminuindo o número de inóculos (Charudatan, 1989).

Esse fator pode estar relacionado ao fato de que a grande maioria dos microrganismos foram selecionados a partir de sintomas de manchas foliares. De forma geral, fungos que causam antracoses, murchas e podridões apresentam maiores chances de causar a morte da

planta do que microrganismos causadores de manchas foliares ou microrganismos que são parasitas obrigatórios como o caso da ferrugem (Charudattan, 1989).

6.3 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Os microrganismos cujos códigos são 1SV1, 5ERC1 e 2QI1, os quais apresentaram efeito fitotóxico sobre as plantas de leiteiro, foram enviados ao Instituto Biológico de São Paulo, sendo identificados como *Fusarium oxysporum*, *F. ploriferatum* e *Trichoderma koningiopsis*, respectivamente.

Fungos do gênero *Fusarium* já apresentam fitopatogenicidade bem estabelecida, sendo utilizado em diversos trabalhos como fonte de controle biológico de plantas daninhas (Hodosy, 1981; Kouzmanova, 1994; Boari & Vurro, 2003; Seremi & Okhovvat, 2008). Esses fungos causam diversos tipos de doenças em uma grande gama de espécies vegetais. São os agentes causais do mal-do-panamá em bananeiras (Cordeiro et al, 2004), murcha de fusarium em feijão (Ribeiro e Ferraz, 1984), manchas foliares em plantas ornamentais (Lins & Coelho, 2003), podridão de espigas em milho (Logrieco & Moretti, 1995) entre outras. Por apresentar afinidade com um elevado número de espécies vegetais, grande parte dos estudos dos bioherbicidas usando o *Fusarium*, estão focados nas suas *formae specialis*, o que garante maior especificidade a planta que se deseja controlar (Ash, 2010).

O microrganismo *Trichoderma koningiopsis* está bem estabelecido como controle biológico de insetos e fungos (Samuel et al., 2006; You et al., 2016), inclusive no controle de fusariose em abacaxi (Souza et al., 2016). Todavia, não existem relatos sobre esse microrganismo ser utilizado como fonte para controle de plantas daninhas. Entretanto, no trabalho de Qian et al. (2013), esse microrganismo foi identificado como sendo o agente causal de mancha foliar em *Curcuma wenyujin*, sugerindo que esse fungo pode ser fitopatogênico, devendo ser mais estudado como fonte de bioherbicidas.

6.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS EXTRATOS

A atividade enzimática dos fungos para celulase, amilase, peroxidase e lipase, são apresentados na Tabela 2. Observou-se que o microrganismo *Trichoderma koningiopsis* foi o que apresentou maior atividade enzimática para celulase e lipase, sendo também o fungo que apresentou maior efeito sobre as plantas de leiteiro. Essa maior atividade enzimática pode ter facilitado a entrada do microrganismo, juntamente com os seus compostos, aumentando assim a fitotoxicidade.

O modo de ação dos bioherbicidas é similar aos mecanismos de interação planta-patógeno. No caso da interação planta-patógeno, o microrganismo deve contornar os mecanismos de defesa da planta. A relação entre os dois indivíduos deve ser compatível para que o agente de biocontrole possa infectar a planta alvo. Os fatores de virulência estão direta ou indiretamente relacionados com o processo de infecção. Sendo assim, os fatores de virulência poderiam ser enzimas que degradam as paredes celulares, facilitando a entrada do microrganismo e dos componentes fitotóxicos e fitotoxinas ou metabólitos secundários, que podem interferir no metabolismo da planta (Harding & Raizada, 2015; Andanson, 2010; Ghorbani et al., 2005; Stergiopoulos et al., 2013; Cordeau et al., 2016).

Tabela 2. Atividade enzimática de celulase, lipase, peroxidase e amilase dos microrganismos *Fusarium oxysporum*, *F. ploriferatum* e *Trichoderma koningiopsis*.

| Microrganismo | Atividade enzimática (U/mL) | | | |
|---------------------------------|-----------------------------|---------|------------|--------|
| | Celulase | Amilase | Peroxidase | Lipase |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | 0,950 | 6,433 | 479,33 | -1,56* |
| <i>Fusarium ploriferatum</i> | 0,416 | 0,647 | 285,33 | -1,40* |
| <i>Trichoderma koningiopsis</i> | 11,455 | 1,320 | 261,33 | 9,84 |

* Valores negativos indicam que não houve atividade enzimática em relação ao controle.

Dentre as enzimas estudadas, a que adquire maior importância são a celulase e a lipase, a primeira devido ao fato de que seu papel é a degradação da celulose, principal componente da parede celular vegetal, e a segunda por auxiliar na degradação de membranas lipídicas. As demais enzimas como proteases, peptidases, amilases e fosfolipases, poderiam auxiliar na degradação de proteínas e outras estruturas (Ghorbani et al., 2005). Estudos visando a adição de celulase extracelular em bioherbicidas mostraram que a adição dessa enzima gerou a morte de 58% das plantas de *Orobanche aegyptiaca* quando comparado ao extrato sem adição da enzima, que resultou em aproximadamente 38% de mortalidade (Babalola, 2010).

6.5 EFEITO BIOHERBICIDA

O efeito dos agrotóxicos depende, em grande parte, do potencial de deriva, perda por escorrimento, cobertura do alvo, entre outros fatores. Para aumentar as chances de adesão ao alvo, as caldas de pulverização são compostas pelo produto, água e adjuvantes. Os adjuvantes melhoram a eficácia das aplicações, entretanto a interação entre produto e adjuvante é um processo complexo. Os adjuvantes atuam no sentido de melhorar o molhamento, aderência, espalhamento e dispersão da calda de pulverização (Ramsdale & Messersmith, 2001; Montório et al., 2004, Mendonça et al., 2007; Almeida, 2014).

Foi possível observar aumento na fitotoxicidade dos extratos ao se adicionar o adjuvante. Para as plantas daninhas, exceto o leiteiro, houve acréscimo na fitotoxicidade, mas sem influência no crescimento das mesmas. Todos os três microrganismos apresentaram os mesmos sintomas para as plantas dicotiledôneas soja, feijão e leiteiro (áreas necróticas sobre a folha e encarquilhamento). O picão-preto não apresentou suscetibilidade ao controle biológico para nenhum dos microrganismos, concentrações e tempos avaliados. O leiteiro foi a única planta daninha que demonstrou sensibilidade ao acréscimo da concentração, para todos os microrganismos. As demais plantas daninhas não apresentaram sensibilidade ao aumento da concentração (Tabela 3).

Alguns sintomas puderam ser observados a partir dos 7 dias para as plantas de papuã e milho nas concentrações de 4 e 8x a dose dos microrganismos, porém esses sintomas estão associados a gotículas maiores de extrato que se acumularam em alguns pontos da folha, apresentando necrose nesse tempo avaliado, contudo não houve aumento dos sintomas após os 7 dias de avaliação.

Para o leiteiro, a fitotoxicidade aumentou de aproximadamente 10% sem a adição do adjuvante, para 60% na maior concentração com adjuvante para o microrganismo *Trichoderma koningiopsis*. Para *Fusarium oxysporum* e *F. ploriferatum*, também se observou aumento da fitotoxicidade chegando a 40% para 8x a dose com adição do adjuvante. Para as demais plantas daninhas o incremento na fitotoxicidade foi ínfimo, indo de 0,3% sem a adição de óleo até 1% com a adição do adjuvante e aumento da dose. Os extratos demonstraram fitotoxicidade a soja e ao feijão, tendo pequeno incremento com o aumento da concentração, entretanto os mesmos não influenciaram no desenvolvimento dessas culturas.

Apesar de uma fitotoxicidade maior, novamente, nenhum dos extratos causou a morte das plantas de lavoura e daninhas, entretanto na maior concentração, o microrganismo *Trichoderma koningiopsis*, prejudicou o crescimento do leiteiro (Figura 9).



Figura 9. Efeito fitotóxico ao se aplicar 8x a dose de *Trichoderma koningiopsis* em plantas de leiteiro.

O adjuvante demonstrou pequena fitotoxicidade nas plantas de leiteiro, onde somente o óleo misturado com água foram aplicados, essa fitotoxicidade pode ter facilitado a entrada do microrganismo e de seus compostos, nos tratamentos com os extratos, contribuindo para o aumento da fitotoxicidade dos microrganismos (Tabela 3).

Tabela 3. Controle de leiteiro - *Euphorbia heterophylla* (%) usando *Trichoderma koningiopsis*, *Fusarium ploriferatum* e *Fusarium oxysporum* em diferentes concentrações aos 1, 7 e 15 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT).

| Controle de leiteiro (%) | | | |
|--------------------------|---------------------------------|-------|--------|
| Concentração | <i>Trichoderma koningiopsis</i> | | |
| | 1 DAT | 7 DAT | 15 DAT |
| 1x | E | D | D |
| 2x | D | D | C |
| 4x | D | C | B |
| 8x | C | B | A |
| Controle sem aplicação | E | E | E |
| Controle somente óleo | E | D | D |
| Concentração | <i>Fusarium ploriferatum</i> | | |
| | 1 DAT | 7 DAT | 15 DAT |
| 1x | E | D | D |

| | | | |
|-------------------------------|---------------------------|--------------|---------------|
| 2x | D | D | C |
| 4x | D | C | C |
| 8x | C | C | B |
| Controle sem aplicação | E | E | E |
| Controle somente óleo | E | D | D |
| Concentração | <i>Fusarium oxysporum</i> | | |
| | 1 DAT | 7 DAT | 15 DAT |
| 1x | E | D | D |
| 2x | D | D | C |
| 4x | D | C | B |
| 8x | C | B | B |
| Controle sem aplicação | E | E | E |
| Controle somente óleo | E | D | D |

Porcentagem de fitotoxicidade onde: E= 0%; D= 0,3% a 2,3%; C= de 2,3 a 11,1%; B= 22,4 a 40,0% e A acima de 40,0%.

Borges Neto et al., (1998) ao testarem o fungo *Cercospora caricis*, para o controle de tiririca (*Cyperus rotundus L.*), constataram que ao utilizarem adjuvantes, melhoraram as taxas de controle da planta daninha. De modo geral, os trabalhos em que os adjuvantes foram adicionados à suspensão de inóculos para o biocontrole de plantas daninhas, aumentaram a severidade dos danos causados (Borges & Pitelli, 2004; Almeida, 2014).

Para o controle de papuã (*Urochloa plantaginea*) os índices permaneceram abaixo dos 5% para todos os microrganismos e períodos avaliados (Tabela 4). Apesar do microrganismo *Trichoderma koningiopsis* ter sido isolado a partir de uma planta daninha da mesma família (*Digitaria ciliaris*), o mesmo não apresentou efeito quando aplicado sobre o papuã. Esse fenômeno pode estar relacionado ao fato que o princípio ativo de um bioherbicida é um organismo vivo, sendo que, a ferramenta de aplicação, pressão utilizada, adjuvantes adicionados, entre outros fatores, podem influenciar na deposição do microrganismo na planta (Ash, 2010). Ademais, apesar de isolado de uma planta da mesma família, a interação patógeno - planta, nesse caso, pode ser totalmente diferente o que pode ter tido influência na efetividade desse microrganismo sobre o papuã.

Tabela 4. Controle de papuã - *Urochloa plantaginea* (%) com *Trichoderma koningiopsis*, *Fusarium ploriferatum* e *Fusarium oxysporum* em concentrações aos 1, 7 e 15 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT).

| <i>Controle de papuã (%)</i> | | | |
|-------------------------------|---------------------------------|--------------|---------------|
| Concentração | <i>Trichoderma koningiopsis</i> | | |
| | 1 DAT¹ | 7 DAT | 15 DAT |
| 1x | E | E | E |
| 2x | E | E | E |
| 4x | E | D | D |
| 8x | E | D | D |
| Controle sem aplicação | E | E | E |
| Controle somente óleo | E | E | E |
| <i>Fusarium ploriferatum</i> | | | |
| Concentração | <i>Fusarium ploriferatum</i> | | |
| | 1 DAT | 7 DAT | 15 DAT |
| 1x | E | E | E |
| 2x | E | E | E |
| 4x | E | E | D |
| 8x | E | D | D |
| Controle sem aplicação | E | E | E |
| Controle somente óleo | E | E | E |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | | | |
| Concentração | <i>Fusarium oxysporum</i> | | |
| | 1 DAT | 7 DAT | 15 DAT |
| 1x | E | E | E |
| 2x | E | E | E |
| 4x | E | E | D |
| 8x | E | D | D |
| Controle sem aplicação | E | E | E |
| Controle somente óleo | E | E | E |

Porcentagem de fitotoxicidade onde: E= 0%; D= 0,3% a 2,3%; C= de 2,3 a 11,1%; B= 22,4 a 40,0% e, nota A acima de 40,0%. ¹ Dias após a aplicação dos tratamentos.

Para o picão-preto, novamente, nenhum dos microrganismos apresentou efeito fitotóxico. Assim como para o papuã, a interação patógeno-hospedeiro nesse caso pode ter sido a causa da ineficiência do biocontrole. No trabalho de Tagami et al., (2009) observaram que o extrato aquoso de *Bidens pilosa* foi eficiente na redução do desenvolvimento dos fungos fitopatogênicos *Alternaria alternata*, *Colletotrichum graminicola*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*, isso demonstra que em sua constituição o picão-preto apresenta compostos fungitóxicos o que pode ter prejudicado o desenvolvimento da doença sobre a planta.

Tabela 5. Efeito fitotóxico de *Trichoderma koningiopsis*, *Fusarium ploriferatum* e *Fusarium oxysporum* em plantas de picão-preto em diferentes concentrações aos 1, 7 e 15 DAT.

| <i>Controle de picão-preto</i> | | | |
|--------------------------------|---------------------------------|--------------|---------------|
| Concentração | <i>Trichoderma koningiopsis</i> | | |
| | 1 DAT | 7 DAT | 15 DAT |
| 1x | E | E | E |
| 2x | E | E | E |
| 4x | E | E | E |
| 8x | E | E | E |
| Controle sem aplicação | E | E | E |
| Controle somente óleo | E | E | E |

| Concentração | <i>Fusarium ploriferatum</i> | | |
|-------------------------------|------------------------------|--------------|---------------|
| | 1 DAT | 7 DAT | 15 DAT |
| 1x | E | E | E |
| 2x | E | E | E |
| 4x | E | E | E |
| 8x | E | E | E |
| Controle sem aplicação | E | E | E |
| Controle somente óleo | E | E | E |

| Concentração | <i>Fusarium oxysporum</i> | | |
|---------------------|---------------------------|--------------|---------------|
| | 1 DAT | 7 DAT | 15 DAT |
| 1x | E | E | E |
| 2x | E | E | E |

| | | | |
|-------------------------------|---|---|---|
| 4x | E | E | E |
| 8x | E | E | E |
| Controle sem aplicação | E | E | E |
| Controle somente óleo | E | E | E |

Porcentagem de fitotoxicidade onde: E= 0%; D= 0,3% a 2,3%; C= de 2,3 a 11,1%; B= 22,4 a 40,0% e, nota A acima de 40,0%.

Ao se avaliar as culturas de milho, soja e feijão foi possível observar um maior dano as plantas da classe dicotiledôneas em relação as monocotiledôneas. A soja se mostrou mais tolerante aos microrganismos que o feijão (Tabela 6 e 7). Sendo a soja uma cultura de interesse comercial, é frequentemente trabalhada no sentido de resistência a doenças e insetos, o que pode ter contribuído para a sua maior tolerância. Entretanto, para ambas as culturas os danos não foram suficientes para prejudicar o seu desenvolvimento, sendo menores que 10%.

Tabela 6. Efeito fitotóxico de *Trichoderma koningiopsis*, *Fusarium ploriferatum* e *Fusarium oxysporum* em plantas de soja concentrações aos 1, 7 e 15 DAT.

| <i>Fitotoxicidade em Glycine max (L.) (%)</i> | | | |
|---|---------------------------------|--------------|---------------|
| Concentração | <i>Trichoderma koningiopsis</i> | | |
| | 1 DAT | 7 DAT | 15 DAT |
| 1x | E | E | E |
| 2x | E | E | D |
| 4x | E | D | D |
| 8x | E | B | B |
| Controle sem aplicação | E | E | E |
| Controle somente óleo | E | E | E |

| Concentração | <i>Fusarium ploriferatum</i> | | |
|-------------------------------|------------------------------|--------------|---------------|
| | 1 DAT | 7 DAT | 15 DAT |
| 1x | E | E | E |
| 2x | E | E | E |
| 4x | E | D | D |
| 8x | E | C | C |
| Controle sem aplicação | E | E | E |

| Concentração | <i>Fusarium oxysporum</i> | | |
|------------------------|---------------------------|-------|--------|
| | 1 DAT | 7 DAT | 15 DAT |
| 1x | E | E | E |
| 2x | E | E | E |
| 4x | E | D | D |
| 8x | E | C | C |
| Controle sem aplicação | E | E | E |
| Controle somente óleo | E | E | E |

Porcentagem de fitotoxicidade onde: E= 0%; D= 0,3% a 2,3%; C= de 2,3 a 11,1%; B= 22,4 a 40,0% e, nota A acima de 40,0%.

O feijão se mostrou mais suscetível a aplicação dos bioherbicidas (Tabela 7), todavia, as avaliações a partir dos 10 dias foram prejudicadas devido ao fato de que as plantas presentes na estufa foram infestadas por míldio, o que prejudicou as avaliações a partir desse período. Todavia, até os 10 dias após a aplicação dos extratos foi possível observar pequena toxicidade nas plantas de feijão, apresentando necrose nas bordas dos folíolos. Os sintomas foram similares para feijão e soja, apresentando pontos e áreas necróticas pela superfície e borda da folha. No momento da aplicação, para a maior concentração, maiores quantidades de extrato se acumularam nas bordas das folhas, mesmo local onde das manchas e encarquilhamento ocorreram, sendo assim, pode-se inferir que o maior período sobre a superfície da folha favoreceu a entrada do microrganismo e seus compostos.

Tabela 7. Efeito fitotóxico de *Trichoderma koningiopsis*, *Fusarium ploriferatum* e *Fusarium oxysporum* em plantas de soja em diferentes concentrações aos 1, 7 e 15 DAT.

Phaseolus vulgaris L.

| Concentração | <i>Trichoderma koningiopsis</i> | | |
|--------------|---------------------------------|-------|--------|
| | 1 DAT | 7 DAT | 15 DAT |
| 1x | E | E | - |
| 2x | E | E | - |
| 4x | E | D | - |
| 8x | E | D | - |

| | | | |
|-------------------------------|---|---|---|
| Controle sem aplicação | E | E | D |
| Controle somente óleo | E | E | E |

| Concentração | <i>Fusarium ploriferatum</i> | | |
|-------------------------------|------------------------------|--------------|---------------|
| | 1 DAT | 7 DAT | 15 DAT |
| 1x | E | E | - |
| 2x | E | E | - |
| 4x | E | D | - |
| 8x | E | D | - |
| Controle sem aplicação | E | E | D |
| Controle somente óleo | E | E | E |

| Concentração | <i>Fusarium oxysporum</i> | | |
|-------------------------------|---------------------------|--------------|---------------|
| | 1 DAT | 7 DAT | 15 DAT |
| 1x | E | E | - |
| 2x | E | E | - |
| 4x | E | D | - |
| 8x | E | D | - |
| Controle sem aplicação | E | E | D |
| Controle somente óleo | E | E | E |

Porcentagem de fitotoxicidade onde: E= 0%; D= 0,3% a 2,3%; C= de 2,3 a 11,1%; B= 22,4 a 40,0% e, nota A acima de 40,0%.

Para o milho, assim como o papuã, as aplicações não surtiram efeito. Apenas o microrganismo *Trichoderma koningiopsis*, nas maiores doses, apresentou pequenos pontos necróticos na superfície da folha, contudo, não superando 1% de dano (Tabela 8). A ineficiência dos extratos foi um resultado positivo, pois, sendo o leiteiro uma planta daninha de verão, podendo competir com a cultura do milho, o controle biológico para essa cultura poderia ser uma alternativa.

Tabela 8. Efeito fitotóxico de *Trichoderma koningiopsis*, *Fusarium ploriferatum* e *Fusarium oxysporum* em plantas de milho em diferentes concentrações aos 1, 7 e 15 DAT.

Fitotoxicidade em Zea mays L. (%)

| Concentração | <i>Trichoderma koningiopsis</i> | | |
|------------------------|---------------------------------|-------|--------|
| | 1 DAT | 7 DAT | 15 DAT |
| 1x | E | E | E |
| 2x | E | E | E |
| 4x | E | D | D |
| 8x | E | D | D |
| Controle sem aplicação | E | E | E |
| Controle somente óleo | E | E | E |

| Concentração | <i>Fusarium ploriferatum</i> | | |
|------------------------|------------------------------|-------|--------|
| | 1 DAT | 7 DAT | 15 DAT |
| 1x | E | E | E |
| 2x | E | E | E |
| 4x | E | E | E |
| 8x | E | E | E |
| Controle sem aplicação | E | E | E |
| Controle somente óleo | E | E | E |

| Concentração | <i>Fusarium oxysporum</i> | | |
|------------------------|---------------------------|-------|--------|
| | 1 DAT | 7 DAT | 15 DAT |
| 1x | E | E | E |
| 2x | E | E | E |
| 4x | E | E | E |
| 8x | E | E | E |
| Controle sem aplicação | E | E | E |
| Controle somente óleo | E | E | E |

Porcentagem de fitotoxicidade onde: E= 0%; D= 0,3% a 2,3%; C= de 2,3 a 11,1%; B= 22,4 a 40,0% e, nota A acima de 40,0%.

A partir dos resultados obtidos é possível afirmar que, de forma geral, os microrganismos apresentaram controle, sendo que a planta que apresentou maior suscetibilidade ao controle biológico foi o leiteiro. Existem estudos que demonstram que o leiteiro é uma planta compatível com o controle biológico (Yorinori & Gazziero, 1989;

Barreto & Evans 1998). Apesar da família Euphorbiaceae incluir diversas culturas, como seringueira e a mandioca, apresenta poucas plantas comercialmente importantes. Isso torna as plantas daninhas dessa família, alvos ideais para o controle biológico.

Apesar de promissor, os testes realizados em ambiente controlado ou casa de vegetação, devem ser levados a campo. Plantas em casa de vegetação tendem a ser mais suscetíveis, podendo superestimar o efeito fitotóxico dos extratos. Sendo assim, para avaliar de forma efetiva a performance dos bioherbicidas, apenas testes a campo em condições adequadas podem avaliar de forma definitiva a efetividade do controle biológico (Charudatan, 1989).

7 CONCLUSÕES

No presente trabalho foram encontrados 3 microrganismos com potencial no controle de leiteiro, tendo destaque o *Trichoderma koningiopsis* no qual apresentou os maiores danos as plantas.

Esse mesmo microrganismo foi o que apresentou maior atividade enzimática para enzimas de interesse, como celulase e lipase.

A adição de adjuvante favoreceu o efeito bioherbicida dos extratos.

O aumento da dose também se mostrou mais eficiente em causar fitotoxicidade em leiteiro.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5. Ed. San Diego, Califórnia, 2004. 922p.
- ABBAS, H.K; DUKE, S.O; MERRILL, J.R; A.H; WANG, E; SHIER, W.T. Phytotoxicity of australifungin, AAL-toxins and fumonisin B, to *Lemna paucicostata*. **Phytochemistry**, v.47, n.8, p.1509-1514, 1998.
- ABBASHER, A.A; SAUERBORN, J. *Fusarium nygamai*, a potential bioherbicide for *Striga hermonthica* control in sorghum. **Biological Control**, v.2, n.4, p.291-296. 1992.
- ALBUQUERQUE, M.B.; NETO, S. G.; ALMEIDA, D. J.; MALTA, A. O. Efeito do extrato aquoso das folhas de nim indiano (*Azadirachta indica*) sobre o crescimento inicial de plantas daninhas. **Gaia Scientia**, v.9, n.1, p.1-6, 2015.
- ALMEIDA, T. C. Formulação de um herbicida biológico produzido a partir da fermentação submersa em biorreator. **Dissertação**. UFSM, Santa Maria – RS, 2014, 91p.
- ANDANSON, A. Evolution de l'agressivite des champignons phytopathogenes, couplage des approches theorique et empirique (PhD). Universit e Nancy I. 2010. 338p.
- ASH, G. J. The science art business of suceful bioherbicides. **Biological Control**, v.52, n.3, p.230-240, 2010.
- AULD, B.A.; SAY, M.M. Comparison of isolates of *Colletotrichum orbiculare* from Argentina and Australia as potential bioherbicides for *Xanthium spinosum* in Australia. **Agriculture Ecosystems and Environment**. v.72, n.1, p.53-58, 1999.
- BABALOPA, O. O. Exogenous cellulose contributes to mycoherbicidal acivity of *Fusarium arthrosporioides* on *Orobanche aegyptiaca*. **International Journal of Agronomy**, v. 2010, p.1-4, 2010.
- BARRETO, R. W.; EVANS, H. C. Fungal pathogens of *Euphorbia heterophylla* and *E. hirta* in Brazil and their potential as weed biocontrol agents. **Mycopathologia**, v.141, p. 21-36, 1998.
- BARRETO, R.W. Controle biológico de plantas daninhas com fitopatógenos. In: Barreto, R.W. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Viçosa: UFV, 2009. cap.7, p.101-128.
- BARTON, J. How good are we at predicting the Field host-range of fungal pathogens used for classical biological control of weeds? **Biological Control**. v.31, p.99–112, 2004.
- BELL, E.A. The physiological role(s) of secondary (natural) products. In: Conn, E. E. (Ed.). **Secondary Plant Products**. New York: Academic Press, 1981. p.1-19.
- BOARI, A.; VURRO, M.; Evaluation of *Fusarium* spp. And other fungi as biological control agents of broomrape (*orobanche ramosa*). **Biological Control**, v.30, p.212-219, 2004.

BORGES NETO, C. R.; MELLO, S. C. M.; RIBEIRO, Z. M. A; FONTES, E. G. Efeito de adjuvantes no crescimento e infectividade do fungo *Cercospora caricis*, agente de biocontrole da tiririca. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, p. 502-502, 1998.

BORGES NETO, C. R; PITELLI, R. A. Adjuvantes e herbicidas e a infectividade de *Fusarium graminearum*, agente potencial de biocontrole de *Egeria densa* e *Egeria najas*. **Planta Daninha**, v. 22, p. 77-83, 2004.

BORGES NETO, C.R.; GORGATI, C.Q.; PITELLI, R.A. Influencia do fotoperíodo e da temperatura na intensidade de doenças causadas por *Fusarium graminearum* em *Eregia densa* e *E. najas*. **Planta Daninha**, v.23, n.3, p-449-456, 2005.

BOYETCHKO, S.M.; ROSSKOPF, E.N.; CAESAR, A.J.; CHARUDATTAN, R. Biological weed control with pathogens: search for candidates to applications. **Agriculture and Food Production**, v.2, n.2, p.239-266, 2002.

BUAINAIN, A. M.; ROMEIRO, A. R.; GUANZIROU, C. Agricultura familiar e o novo mundo rural. **Sociologias**, v.5, p. 312-347, 2003.

CHARUDATTAN, R. **Assessment of efficacy of mycoherbicide candidates**. VII International Symposium of Biological Control of Weeds, 1st edition, p.455-64, 1989.

CHARUDATTAN, R. **Current status of biological of weeds**. In: KENNEDY, C.G; SUTTON, T.B. (Eds.). *Emerging Technologies for Integrated Pest Management: Concepts, Research, and Implementation*. APS, p.269-288, 2000.

CHARUDATTAN, R.; DINOOR, A. Biological control of weeds using plant pathogens: accomplishments and limitations. **Crop Protection**, v.19, p.691-695, 2000.

CHUNG, Y.R.; KOO, S.J.; KIM, H.T.; CHO, K.Y. Potential of an indigenous fungus, *Plectosporium tabacinum*, as a mycoherbicide for control of arrowhead (*Sagittaria trifolia*). **Plant Disease**, v.82, n.6, p.657-660, 1998.

CIPRIANI, F.A.; KAPLAN, M.A.C.; ISAIAS, R.M.; SOARES, G.L.G. Avaliação de fitotoxidez de *Tecoma stans* (L.) Kunth. **Floresta e Ambiente**, v.21, n.1, p.1-7, 2014.

CORDEAU, S.; TRIOLET, M.; WAYMAN, S.; STEINBERG, C.; GUILLEMIN, J. P. Bioherbicides: dead in the water? A review of the existing products for integrated weed management. **Crop protection**, v. 87, p.44-49, 2016.

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; MEISSNER F, P. E. Doenças e métodos de controle. In SALOMÃO, L. C. C.; SIQUEIRA, D. L. **Cultivo da Bananeira**, Ed UFV, Viçosa MG, 2004, 279p.

da severidade de entomosporiose em folhas de pereira. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, p. 585, 2011.

DELOURME, R., PIEL, N., HORVAIS, R., POUILLY, N., DOMIN, C., VALLEE, P., FALENTIN, C., MANZANARES-DAULEUX, M.J., RENARD, M. Molecular and phenotypic characterization of near isogenic lines at QTL for quantitative resistance to

Leptosphaeria maculans in oilseed rape (*Brassica napus* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 117, p.1055–1067, 2008.

DIAS, L.S; DIAS, A.S. Metabolitos secundários como fontes de bioherbicidas: situação atual e perspectivas. **Revista de Ciências Agrárias**, v.30, n.1, p.510-517, 2007.

DIÓGENES, F.E.P.; OLIVEIRA, A. K. DE, TORRES, S.B.; MAIA, S.S.S.; COELHO, M.D.F.B. Atividade alelopática do extrato de folhas *Ziziphus joazeiro* Mart.–Rhamnaceae. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.9, n.4, p.01-04, 2014.

DOYLE, J. J. AND J. L. DOYLE. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin** 19: p.11-15. 1987.

EBERHARDT, D.S.; NOLDIN, J.A.; SATO, G.; PRANDO, H.F.; KNOBLAUCH, R.; SCHIOCCHET, M.A. Alternativas tecnológicas para a produção orgânica de arroz irrigado no sistema pré-germinado. In: CONGRESSO DA CADEIA PRODUTIVIDA DE ARROZ, 1. e RENAPA, 7., 2002. Florianópolis. **Anais...**Santo Antonio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2002. p-650-653.

EBERHARDT, D.S.; NOLDIN, J.A.; SATO, G.; PRANDO, H.F.; KNOBLAUCH, R.; RAMPELOTTI, F.T. Manejo de marrecos-de-pequim (*Anas* sp.) no controle de arroz-vermelho (*Oryza sativa*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 3. REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 25. 2003, Balneário Camboriú/SC. **Anais...**Itajaí: EPAGRI, 2003. p-555-557.

FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. **Journal of Biochemistry**. v. 41, p. 583-603, 1954.

GAZOLLA, M.; SCHNEIDER, S. Qual “Fortalecimento” da agricultura familiar? Uma análise do pronaf crédito de custeio e investimento no Rio Grande do Sul, **RESR**, v.51, p.45-68, 2013.

GHORBANI, R., LEIFERT, C., SEEL, W. Biological control of weeds with antagonistic plant pathogens. **Advances in Agronomy**, v.86, p.191-225, 2005.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v.59, p. 257-268, 1987.

GOEDEN, R.D. Critique and revision of Harris scoring system for selection of insects agentes in biological controlo f weeds. **Protection Ecology**, v.5, p.287-301, 1983.

GOETZE, M.; THOMÉ, G.C.H. Efeito alelopático de extratos de *Nicotina tabacum* e *Eucalyptus grandis* sobre a germinação de três espécies de hortaliças. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.10, n.1, p.43-50, 2004.

GOMES, F.M.; FORTES, A.M.T.; SILVA, J.; BONAMIGO, T.; PINTO, T.T. Efeito Alelopático da Fitomassa de *Lipinus angustifolius* (L.) sobre a germinação e o desenvolvimento inicial de *Zea mays* (L.) e *Bidens pilosa* (L.). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.8, n.1, p.48-56, 2013.

GRACE, B. S.; SCHÄRER-MÜLLER, H. Biological control of *Senecio vulgaris* in carrots (*Daucus carota*) with the rust fungus *Puccinia lagenophorae*. **Basic and Applied Ecology**, v.4, n.4, p.375-384, 2003.

GUERRA, N.; OLIVEIRA JR., R.S.; CONSTANTIN, J.; OLIVEIRA NETO, A.M.; BRAZ, G.B.P Aminocyclopyrachlor e indaziflam: seletividade, controle e comportamento no ambiente. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.12, n.3, p.285-295, 2013.

GURR, G.M; HORNE, P; ASH, G.J; PILKINGTON, L.J. Australia and New Zealand biocontrol conference: Emerging themes future prospects. **Biological Control**, v.52, n.3, p.195-197, 2010.

HARDING, D.P., RAIZADA, M.N. Controlling weeds with fungi, bacteria and viruses: a review. **Frontiers in Plant Science**, v.6, p.659, 2015.

HARRIS, P.; ZWOLFER, H. Screening of phytophagous insects for biological control of weeds. **The Canadian Entomologist**, v.100, p.295-303, 1968.

HATZIOS, K.K. Biotechnology applications in weed management: now and in the future. **Advances in Agronomy**, v. 41, n.2, p.325-375, 1987.

HODOSY, S. **Biological control of broomrape, *Orobanche ramosa*, a tomato parasite**. In: Occurrence and Adaptability of *Fusarium* Species to Control Broomrape in Hungary, Zoldsegtermeszteszi Kutato Intezet Bulletinje, 1979/80, 14, p.21-29. 1981.

ICHIKAWA, K.; AOKI, T. New leaf spot disease of *Cymbidium* species caused by *Fusarium subglutinans* and *Fusarium proliferatum*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 66, p.213-218, 2000.

KHAN, A. A.; ROBINSON, D. S. Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. **Food Chemistry**, v. 49, n. 4, p. 407-410, 1994.

KLAIC, R; KUHN, R.C; FOLETTTO, E.L; DAL PRÁ, V; JACQUES, R.J.S; GUEDES, J. An overview regarding bioherbicide and their production methods by fermentation. **Fungal Biomolecules**. 1ed.: John Wiley & Sons, Ltda. p. 183-199, 2015.

LEITE, S.P.; SILVA, C.R. DA; HENRIQUES, L. C. Impactos ambientais ocasionados pela agropecuária no Complexo Aluízio Campos. **Revista Brasileira de Informações Científicas**, v.2, n.2, p.59-64, 2011.

LI, Y; SUN, Z; ZHUANG, X; XU, L; CHEN, S; MINGZHI, L. Research progress on microbial herbicides. **Crop Protection**, v.22, n.2, p.247-252, 2003.

LINS, S. R. O.; COELHO, R. S. B.; Ocorrência de doenças em plantas ornamentais tropicais no estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p.332-335, 2004.

LOGRIECO, A.; MORETTI, A. Occurrence and toxigenicity of *Fusarium proliferatum* from preharvest maize ear rot, and associated mycotoxins, in Italy. **Plant disease**, v.79, p. 727-731, 1995.

MAZOYER, M; ROUDART, L. História das agriculturas no mundo: do neolítico à crise contemporânea. [tradução de Cláudia F. Falluh Baldino Ferreira]. UNESP, 2008, 568p.

MEIR, S.C.; LARROCHE, A.H.; AHMAD; J. GRESSEL. Fungal transformation of *Colletotrichum coccodes* with bacterial oahA to suppress defenses of *Abutilon theophrasti*. **Crop Protection**, v.28, n.9, p.749-755, 2009.

MENDONÇA, C. G.; RAETANO, C. G.; Tensão superficial estática de soluções aquosas com óleos minerais e vegetais utilizados na agricultura. **Engenharia Agrícola**, v. 27, p. 16-23, 2007.

MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426, 1959.

MIYAZAKI, D.M.Y.; PITELLI, R.A. Evaluation of the biocontrol potential of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) for *Egeria densa* e *E.najas* and *Caratophyllum demersum*. **Planta Daninha**, v.21, número especial, p.53-59, 2003.

MONTÓRIO, G.A., VELINI, E.D. Definição de um coeficiente de eficácia para estudo de tensão superficial com surfactantes siliconados e não siliconados. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.3, p. 25-34, 2004.

MORAES, P.V.D.; PANOZZO, L.E.; VIGNOLO, G.K.; SANTOS, L.S.D.; RODRIGUES, R.R. Efeito alelopático de trevo-vesiculoso no crescimento inicial de milho e plantas daninhas. **Agrarian**, v.5, n.1, p.99-105, 2012.

MORIN, L.; GIANOTTI, A. F.; LAUREN, D. R. Trichothecene production and pathogenicity of *Fusarium tumidum* a candidate bioherbicide for gorse and broom in New Zealand. **Mycological Research**. v.104, n.8, p.993-999, 2000.

NACHTIGAL, G.F. **Controle biológico de plantas invasoras exóticas do Brasil por meio de fitopatógenos: princípios e estratégias de aplicação em ecossistemas agrícolas e naturais**. Embrapa, 2009.

NUNES, C. C.; ALVES, S. A. M. Elaboração e validação de escala diagramática para quantificação da severidade de entomosporiose em folhas de pereira. **Tropical Plant Pathology**, v, 36, p. 585, 2011.

NUNES, J.V.D.; MELO, D.; NÓBREGA, L.H.P.; LOURES, N.T.P.; SOSA, D.E.F. Atividade alelopática de extratos de plantas de cobertura sobre soja, pepino e alface. **Revista Caatinga**, v.27, n.1, p.122-130, 2014.

OOTANI, M.A.; AGUIAR, R.W.; RAMOS, A.C.C.; BRITO, D.R.; SILVA, J.B.; CAJAZEIRA, J.P. Use of essential oils in agriculture. **Journal of biotechnology and biodiversity**, v.4, n.2, p.162-174, 2013.

ORTIZ-RIBBING, L.; WILLIAMS, M.M. Potential of *Phomopsis amaranthicola* and *microsphaeropsis amaranthi*, as bioherbicides for several weedy *Amaranthus* species. **Crop Protection**, v.25, n.1, p.39-46, 2006.

PADIN, S.; DAL BELLO, G.M.; VASICEK, A.L. Potencial bioinseticida de hongos entomopatógenos de plagas em grãos armazenados. **Revista de la Facultad de Agronomía**, v.15, n.1, p.1-7, 1995.

PIRES, N.M.; PRATES, H.T.; FILHO, I.A.P.; SILVÉRIO, R. Atividade alelopática da leucena sobre espécies de plantas daninhas. **Scientia Agrícola**, v.58, n.1, p.61-65, 2001.

PONGSAWASDI, P.; YAGISAWA, M. Screening and identification of a cyclomaltodextrin glucanotransferase-producing bacteria. **Journal Fermentation Technology**, v.65, n.4, p. 463-467, 1987.

QIAN, Y. S.; CAI, S.; HUO, Y. N.; MAO, P. P.; WANG, H. Z.; WU, J.B. First report of leaf blight disease of *Curcuma wenyujin* caused by *Trichoderma koningii* in China. **Journal of Plant Pathology**, v. 95, p.77, 2013.

RAMSDALE, B.K.; MESSERSMITH, C.G. Nozzle, spray volume, and adjuvant effects on carfentrazone and imazamox efficacy. **Weed Technology**, v. 15, p. 485-491. 2001.

RIBBING, O.L.; WILLIAMS, M.M. Potential of *Phomopsis amaranthicola* and *Microsphaeropsis amaranthi*, as bioherbicides for several weedy *Amaranthus* species. **Crop Protection**. v.25, p.39-46, 2006.

RIBEIRO, C. A. G.; FERRAZ, S. Resistência varietal do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Fusarium oxysporum* f. sp. phaseoli. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 9, n.1, p. 37-44, 1984.

SAMUELS G.J., DODD S.L., LU B.S. PETRINI O. SCHROERS H.J., DRUZHININA I.S. The 43 *Trichoderma koningii* aggregate species. **Studies in Mycology**, v.56, p.67-113, 2006.

SARTOR, L.R.; LOPES, L.; MARTIN, T.N.; ORTIZ, S. Alelopátia de acículas de pinus na germinação e desenvolvimento de plântulas de milho, picão preto e alface. **Bioscience Journal**, v.31, n.2, p.470-480, 2015.

SCHMITZ, A.; RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. **Analytical Biochemistry**, v. 354, p. 311-313, 2006.

SCHROEDER, D. Biological control of weeds: A review of principles and trends. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, p.191-212, 1992.

SEREMI, H.; OKHOVVAT, S.M.; Biological control of *Orobancha aegyotiaca* by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Orobanchae* in northwest Iran. **Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences**, v.73, p.931-938, 2008.

SILVA, A.A.; FERREIRA, F.A.; FERREIRA, L.R.; SANTOS, J.B. Biologia de plantas daninhas. In: Silva, A.A.; Silva, J.F. **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. Viçosa/MG: UFV, 2007a, cap.1, p-17-61.

SILVA, A.A.; FERREIRA, F.A.; FERREIRA, L.R.; SANTOS, J.B. Métodos de controle de plantas daninhas. In: SILVA, A. A.; SILVA, J. F. **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. Viçosa/MG: UFV, 2007b, cap.2, p.63-81.

Sosbai: Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado. **Arroz irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil**. Bento Gonçalves: SOSBAI, 2014. 192p.

SOUZA, A. R. C. Obtenção de isolados fúngicos a partir de recursos biológicos do bioma pampa com potencial no controle de plantas daninhas. **Tese de doutorado**. Santa Maria, UFSM, 2015, 74p.

SOUZA, J. T.; TROCOLI, R. O.; MONTEIRO, F. P. Plants from the caatinga biome harbor endophytic *Trichoderma* species active in the biocontrol of pineapple fusarioses. **Biological Control**, v.94, p.25-32, 2016.

STERGIOPOULOS, I., COLLEMARE, J., MEHRABI, R., DE WIT, P., 2013. Phytotoxic secondary metabolites and peptides produced by plant pathogenic Dothideomycete fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v.37, p.67-93, 2013.

TAGAMI, O. K.; GASPARIN, M. D. G.; ESTRADA, K. R. F. S.; CRUZ, M. E. S.; ITAKO, A. T.; TOLENTINO JÚNIOR, J. B.; MORAES, L. M.; STANGARLIN, J. R. Fungitoxicidade de *Bidens pilosa*, *Thymus vulgaris*, *Lippia alba* e *Rosamarinus officinalis* no desenvolvimento *in vitro* de fungos fitopatogênicos. **Semina: Ciências Agrárias**, v.30, p.285-294, 2009.

TESSMANN, D.J. Controle biológico: aplicações na área de ciência das plantas daninhas. In: Oliveira Jr., R.S.; Constantin, J.; Inoue, M.H. **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba: Omnipax, 2011. cap.4, p.79-94.

TREICHEL, H.; SBARDELOTTO, M.; VENTURIN, B.; DALL AGNOL, A.; MULINARI, J.; GOLUNSKI, S. M.; BALDONI, D. B.; BEVILACQUA, C. B.; JACQUES, R. J. S.; VARGAS, G. D. L. P.; MOSSI, A. J. Lipase production from a newly isolated *Aspergillus niger* by solid state fermentation using canola cake as substrate. **Current Biotechnology**, v.5, p. 1-7, 2016.

TREMACOLDI, C.R.; SOUZA FILHO, A.P. DA S. **Fitopatógenos: possibilidades de uso no controle de plantas daninhas**. Embrapa Amazônia Oriental: Belém, 2006, 22p.

VICTÓRIA FILHO, R.; NETO, A.L.; PELISSARI, A.; REIS, F.C.; DALTRO, F.P. Manejo sustentável de plantas daninhas em pastagens. In: Monquero, P.A. **Manejo de plantas daninhas em cultivos agrícolas**. São Carlos/SP: RiMa, 2014. cap.5, p.179-207.

WANDSCHEER, A.C.D.; BORELLA, J.; BONATTI, L.C.; PASTORINI, L.H. Atividade alelopática de folhas e pseudofrutos de *Hovenia dulcis* Thunb.(Rhamnaceae) sobre a germinação de *Lactuca sativa* L.(Asteraceae). **Acta Botanica Brasilica**, v.25, n.1, p.25-30, 2011.

WHITE, T. J., T. BRUNS, S. LEE, AND J. W. TAYLOR. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. Pp. 315-322 In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York. 1990.

WUNDERLICH, N., ASH, G.J., HARPER, J.D.I., COWLEY, R.B., LUCKETT, D.J. Penetration and symptom development of *Pleiochaeta* root rot in susceptible and resistant *Lupinus albus* cultivars. **Australasian Plant Pathology**, v.37, p.387-391, 2008.

YORINORI, J. T.; GAZZIERO, D. L. P. **Control of Milk Weed (*Euphorbia heterophylla*) with *Helminthosporium* sp.** VII International Symposium of Biological Control of Weeds, 1 ed. p.571-576, 1989.

YOU, J.; ZHANG, J.; WU, M.; YANG, L.; CHEN, W.; LI, G.; Multiple criteria-based screening of *Trichoderma* isolates for biological control of *Botrytis cinerea* on tomato. **Biological Control**, v.101, p.31-38, 2016.

ZAGONEL, J; VENÂNCIO, W. S; KUNZ, P. R; Efeitos de métodos e épocas de controle das plantas daninhas na cultura do milho. **Planta Daninha**, v.18, p.143-150, 2000.

ZIMDAHL, R.L. **Fundamentals of Weed Science**. San Diego: Academic Press Inc., 1993. 450 p.

APÊNDICE

Tabela de códigos formulada para identificação dos microrganismos

| Código | Nome comum | Nome científico | Local |
|---------------|-------------------|-------------------------------|----------------------|
| 1ErC1,2,3,4 | Leiteiro | <i>Euphorbia heterophylla</i> | Erechim |
| 2QI1,2,3,4 | Milhã | <i>Digitaria horizontalis</i> | Quatro Irmãos |
| 3SV1,2,3,4 | Picão preto | <i>Bidens</i> sp. | Severiano de Almeida |
| 4SVC1,2,3,4 | Buva | <i>Conyza bonariensis</i> | Severiano de Almeida |
| 5ERC1,2,3,4 | Erva Lanceta | <i>Solidago chilensis</i> | Erechim |

Em que: o primeiro número equivale a espécie da planta; as letras, as iniciais dos municípios em que as coletas foram realizadas e o último número, a planta em que o fungo foi isolado.

Exemplos:

Leiteiro coletado em Severiano de Almeida, terceira planta a ser coletada = 1SV3

Leiteiro coletado em Erechim – campus UFFS, segunda planta a ser coletada = 1ErC2

Buva coletada em Erechim – campus UFFS, quarta planta a ser coletada = 4ErC4

Picão preto coletado em Severiano de Almeida, primeira planta a ser coletada = 3SV1.