



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

ALESSANDRO ULRICH

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIO-HERBICIDA DO FUNGO *Trichoderma*
koningiopsis

ERECHIM

2021

ALESSANDRO ULRICH

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIO-HERBICIDA DO FUNGO *Trichoderma*
*koningiopsis***

Dissertação de mestrado, apresentado para o Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* Erechim/RS, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Altemir Jose Mossi
Coorientadora: Dr.^a Caroline Müller

ERECHIM

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

ERS 135, Km 72, nº 200

Cep: 99.700-970

Erechim - RS

Brasil

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Ulrich, Alessandro

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIO-HERBICIDA DO FUNGO
Trichoderma koningiopsis / Alessandro Ulrich. -- 2021.
102 f.

Orientador: Doutor Altemir José Mossi

Co-orientadora: Doutora Caroline Müller

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia Ambiental, Erechim, RS, 2021.

1. Bio-herbicida. 2. Avaliação enzimática. 3.
Controle de plantas daninhas. 4. Associação com
herbicidas inibidores de EPSPs. I. Mossi, Altemir José,
orient. II. Müller, Caroline, co-orient. III.
Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

Foto da ata de Defesa de Dissertação



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS ERECHIM
COORDENAÇÃO ACADÊMICA
COORDENAÇÃO ADJUNTA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
SECRETARIA DE PÓS GRADUAÇÃO
ERS 135 – Km 72, nº 200, Caixa Postal 764, Erechim-RS, CEP 99700-970, 54 3321 7099
sec.posgrad.er@uffrs.edu.br, www.uffrs.edu.br

Ata de Defesa de Dissertação 006/PPGCTA-2021

Ao oito dias do mês de março de dois mil e vinte e um, às dezesseis horas e trinta minutos, na UFFS Campus Erechim, reuniu-se, para defesa da dissertação apresentada por **Alessandro Ulrich**, do Programa de Pós-Graduação, *Stricto Sensu*, em Ciência e Tecnologia Ambiental, intitulada: “**Avaliação do potencial bioherbicida do fungo *Trichoderma koningii*”**”, a Banca Examinadora, composta pelos professores: Prof. Dr. Altemir José Mossi (Orientador/presidente – UFFS), Profª Dra. Caroline Muller (Coorientadora – UFFS), Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti (Membro titular externo – UFSM), Prof. Dr. Rogério Luis Cansian (Membro titular externo – URI), todos participaram por videoconferência, seguindo orientações da Portaria Nº 303/GR/UFFS/2020. O professor Orientador/Presidente deu por aberta a sessão e logo a seguir passou a palavra ao mestrando, para que, em até trinta minutos, expusesse seu trabalho. Terminada a exposição, passou-se à arguição da Banca Examinadora. A seguir, a sessão foi suspensa e os examinadores decidiram por (X) aprovar () reprovar o trabalho. Observações: Realizar as alterações conforme recomendado pela banca e sugestões que estão no boneco da dissertação entregue ao discente. A banca orienta que no prazo de 45 dias seja entregue a versão final do trabalho de dissertação à Secretaria de Pós-Graduação. Nestes termos, esta ata segue assinada pelos Membros da Banca Examinadora e pelo mestrando.

Erechim/RS, 08 de março de 2021.

Alessandro Ulrich	
Prof. Dr. Altemir José Mossi	
Profª Dra. Caroline Muller	
Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti	
Prof. Dr. Rogério Luis Cansian	

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus e em segundo à Santa Terezinha, por terem estado sempre ao meu lado, me iluminando e mostrando o melhor caminho a ser seguido nesta difícil e longa jornada.

À Universidade Federal da Fronteira Sul, instituição na qual realizei o curso de Agronomia e o respectivo mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental, ambos de excelente qualidade.

Agradeço meus Orientadores: Prof. Dr. Altemir Jose Mossi e Dr^a. Caroline Müller, que durante o período do curso não mediram esforços para auxiliar no que for preciso para obter uma ótima formação.

Aos demais professores do PPG, que repassaram uma enorme bagagem de informação, experiências profissionais, ensinamentos esses que vou levar para vida toda, pessoas que além de professores, hoje são grandes amigos.

Aos meus colegas, em especial o Lindomar Alberto Lerin, Aline Frumi Camargo e Thamarys Scapini, que sempre auxiliaram nos trabalhos desenvolvidos e que contribuíram muito ao aprendizado obtido no decorrer desse período.

Aos grupos de pesquisa dos laboratórios de Agroecologia, de Microbiologia e Bioprocessos (LAMIBI), e de Manejo Sustentável dos Sistemas Agrícolas (MASSA) da UFFS, liderados pelo Prof. Dr. Altemir Jose Mossi, Prof. Dr^a. Helen Treichel, e Prof. Dr. Leandro Galon, todas as pessoas que compõem esses grupos foram indispensáveis na execução das pesquisas e demais atividades desenvolvidas durante esse período sendo elas, bolsistas, voluntários, técnicos e professores, que levarei sempre como exemplos de profissionais e amigos, em nome da ciência.

À minha mãe Almiraci Pogorzelski e irmã Edizandra Ulrich Baruffi pela educação que me foi dada, pelo amor incondicional, pelo incentivo e dedicação em todos os momentos e sacrifícios feitos para que eu pudesse chegar à conclusão de mais uma etapa.

E por fim, a todos que de alguma maneira me acompanharam e contribuíram na realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

*“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos
é um oceano.”*

Isaac Newton

RESUMO GERAL

Os bio-herbicidas destacam-se pelo potencial controle de plantas daninhas com menor impacto ambiental, o que os torna importantes substituintes de agrotóxicos na produção agrícola. O objetivo desse trabalho foi estudar o efeito bio-herbicida do fungo *Trichoderma koningiopsis* sobre as características enzimáticas, morfológicas e fitotóxicas em plantas cultivadas em casa de vegetação, bem como a sua interação com herbicidas sintéticos. Os ensaios foram conduzidos no laboratório e casa de vegetação vinculada ao laboratório de Agroecologia da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus Erechim/RS*, entre os anos de 2019 e 2020. Os ensaios foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado. Inicialmente o fungo *T. koningiopsis* foi avaliado quanto a exposição a diferentes concentrações de herbicidas sintéticos, pelo método disco-difuso. Posteriormente, foi quantificada a biomassa fúngica e feita a análise enzimática para enzimas de amilase, celulase, lipase e peroxidase no bio-herbicida em meio otimizado produzido a base do fungo. O bioproduto foi avaliado em planta bioindicadora, pepino (*Cucumis sativus*) e em plantas daninhas e culturas verão (leiteiro, papuã e soja). Foram testados os efeitos do bio-herbicida com interação de três formulações de herbicidas comerciais com mecanismo de ação de EPSPs (sal de amônio, sal isopropilamina e sal potássico), na avaliação dos efeitos sobre plantas foram avaliadas características visuais, morfológicas e fisiológicas. O fungo *T. koningiopsis* demonstrou ser resistente às doses recomendadas ou inferiores, quando exposto aos herbicidas sintéticos de Poquer (Cleotodin), Accent, Clorimuron (Classic), Glifosato (Shadow, Roundup Original, R. WG e Zapp Qi®), 2,4-D (DMA), Glufosinato de amônio (Finale), Gramoxone (Paraquate), Sulfotrazone (Boral® 500 SC), Fomesafen (Flex®), Saflufenaciz (Heat) e Atrazina + Simazina (Primatop® SC). Efeitos do bio-herbicida sobre as plantas de pepino demonstrou eficiência do extrato quando aplicado com presença da biomassa fúngica causando a morte de até 80% das plantas, quando associado a Glifosato (Zapp Qi® 620) o controle foi de 100%, e ainda o bioproduto demonstrou-se biologicamente seguro pelo teste de fugacidade em minhocas para avaliar sua ecotoxicidade. Ocorreu efeitos sinérgicos sobre a interação do fungo combinado com os produtos comerciais Glifosato (Roundup Original, Roundup WG e Zapp Qi®), que ocasionou, após 16 dias, danos irreversíveis as plantas daninhas do leiteiro e papuã, com a morte total das plantas nas doses acima de 70% dos herbicidas sintéticos associados ao bio-herbicida. Não houve efeitos fitotóxicos prejudiciais a cultura da soja. O desenvolvimento de novas alternativas de controle de pragas é essencial para a manutenção dos rendimentos agrícolas e redução dos efeitos negativos dos resíduos de pesticidas ao meio ambiente.

Palavras-chave: Bio-herbicida. *Trichoderma koningiopsis*. Disco-Difuso. Avaliação enzimática. Controle de plantas daninhas.

ABSTRACT

The use of bioherbicides stands out for the great potential in the control of weed plants with low residual capacity, which makes them important substitutes for pesticides in agricultural production. The objective of this work was to study the fungus *Trichoderma koningiopsis* on its bioherbicide effects on the physiological, biochemical and morphological characteristics of weeds and grown in greenhouse, as well as its interaction with synthetic herbicides. The tests were conducted in the laboratory and greenhouse linked to the Agroecology laboratory of the Federal University of Fronteira Sul, *Campus Erechim/RS*, between 2019 and 2020. The trials were conducted in a completely randomized experimental design. Initially the fungus *T. koningiopsis* was evaluated for exposure to different concentrations of synthetic herbicides, by the disc-diffuse method; Subsequently, fungal biomass was quantified and enzymatic analysis was performed for enzymes of amylase, cellulase, lipase and peroxidase in the bioherbicide in optimized medium produced at the base of the fungus; The bioproduct was sprayed with manual spray in the bioindicator plant of the cucumber; And in weeds and winter crops (ryegrass, turnip and wheat) and summer (dairy, papuã and soybean), the effects of bioherbicide were tested with interaction of three commercial herbicide formulations with mechanism of action of EPSPs (salof ammonium, sal isopropylamine and salpotassium), in the evaluation of the effects on plants were evaluated visual, morphological and physiological characteristics. The fungus *T. koningiopsis* has been shown to be resistant to the recommended or lower doses when exposed to the synthetic herbicides of Poquer (Cleotodin), Accent, Clorimuron (Classic), Glifosato (Shadow, R. Original, R. WG, Zapp Qi®), 2,4-D (DMA), Glufosinato de amônio (Finale), Gramoxone (Paraquate), Sulfotrazone (Boral® 500 SC), Fomesafen (Flex®), Saflufenaciz (Heat) and Atrazina + Simazina (Primatop® SC). Effects of bioherbicide on cucumber plants showed efficiency of the extract when applied with the presence of fungal biomass causing the death of up to 80% of the plants, when associated with Zapp Qi® the control was 100%, and the bioproduct was biologically safe by the worm escape test to evaluate its ecotoxicity. The synergistic effects on the interaction of the fungus combined with the commercial products Glyphosate (Roundup Original, Roundup WG and Zapp Qi®), which caused, after 16 days, irreversible damage to dairy and papuã weeds, with the total death of plants at doses above 70% of synthetic herbicides associated with bioherbicide. There were no harmful phytotoxic effects on soybean crop. The development of new pest control alternatives is essential for maintaining agricultural yields and reducing the negative effects of pesticide residues on the environment.

Keywords: Bioherbicide. *Trichoderma Koningiopsis*. Disk-Diffuse. Enzymatic evaluation. Weed control.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I – SENSIBILIDADE DO *Trichoderma koningiopsis* A HERBICIDAS SINTÉTICOS: MÉTODO DISCO-DIFUSO

Tabela 1. Características de herbicidas sintéticos e suas respectivas recomendações, dosagens para controle de plantas daninhas com as respectivas diluições em 0,025 L para teste de inibição (sensibilidade) do crescimento do fungo <i>T. koningiopsis</i> . Diluições do produto em 0,5x, 1x e 2x da dose recomendada de cada produto comercial.	27
Tabela 2. Diâmetro (mm) de halos inibitórios do <i>T. koningiopsis</i> após sete dias de exposição a diversos herbicidas sintéticos com diferentes concentrações (controle, 0,5x, 1,0x e 2x da dose recomendada, e o herbicida (produto comercial sem diluição). Erechim/RS, UFFS, 2019.	29

CAPÍTULO II – UM BIO-HERBICIDA A BASE DE *Trichoderma koningiopsis*: CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA E EFEITO SOBRE PLANTAS DE PEPINO;

Tabela 1. Análise química do substrato contendo cama de aviário e humus (1:1) utilizado no experimento com biocomposto a base de <i>T. koningiopsis</i> in cucumber plants. Coxilha/RS, 2020.	42
Tabela 2. Escala percentual de fitotoxicidade em relação às injúrias foliares apresentadas pelas plantas de pepino. Erechim/RS, 2020.	43
Tabela 3. Biomassa fúngica (g L^{-1}) e atividade das enzimas (U mL^{-1}) de amilase, celulase, lipase e peroxidase no extrato gerado a partir de <i>T. koningiopsis</i> . Erechim/RS, UFFS, 2020.	45
Tabela 4. Percentual de sintomas de fitotoxicidade visual foliar. Leve despigmentação (LD), amarelamento (AML), clorose (CL), necrose (NC), despigmentação total (TD) e área sadia (SD) em plantas de pepino (<i>Cucumis sativus</i>), tratadas com bio-herbicida de <i>Trichoderma koningiopsis</i> , sob diferentes filtragens e combinado com o herbicida comercial Zapp Qi® (HC , $1,5 \text{ L ha}^{-1}$), aos 15 dias após a aplicação dos tratamentos. Os controles negativo e positivo continham apenas meio de cultivo usado na fermentação de <i>T. koningiopsis</i> e herbicida comercial, respectivamente. UFFS, Erechim, RS, 2020.	50
Tabela 5. Altura de planta (AP, cm), diâmetro do caule (DC, mm), número de folhas (NF), massa seca da folha (MSF, g), comprimento da maior raiz (CR cm), massa seca da raiz (MSR, g), massa seca total (MST, g), e mortalidade de plantas (MP, %) de pepino após 15 dias da aplicação dos tratamentos: água (CtA, controle negativo), meio de cultivo utilizado na fermentação do bio-herbicida a base de <i>T. koningiopsis</i> (CtMC, controle negativo), extrato bruto do bio-herbicida não filtrado (EBt), bio-herbicida filtrado com papel filtro (FilP), bio-herbicida filtrado com gaze (FilG), e a combinação do herbicida comercial (HC; Zapp Qi®, $1,5 \text{ L ha}^{-1}$) com EBt (EBt+HC), FilP (FilP+HC), FilG (FilG+HC) e apenas o HC (controle positivo). UFFS, Erechim, RS, 2020.	52
Tabela 6. Teste de ecotoxicidade com ensaio de fuga de minhocas para os tratamentos com água (CtA, controle negativo), biocomposto a base de <i>T. koningiopsis</i> filtrado com gaze (FilG), e a combinação do FilG com o herbicida comercial (HC; Zapp Qi®, $1,5 \text{ L ha}^{-1}$) (FilG+HC). Erechim/RS, UFFS, 2021.	54

CAPÍTULO III – BIO-HERBICIDA DE *Trichoderma koningiopsis* ASSOCIADO À FORMULAÇÕES COMERCIAIS DE GLIFOSATO

Tabela 1. Concentrações de herbicidas formulados com base da dose recomendada dependente do estágio de desenvolvimento da planta infestante, com diluição para mL ha⁻¹ ou g ha⁻¹. Diluições de herbicidas formulados com base da dose recomendada considerando o volume de calda de 3 mL por planta em vaso cultivado (n = 10). Erechim/RS, 2020. 64

Tabela 2. Escala percentual de fitotoxicidade em relação às injúrias foliares apresentadas pelas plantas de pepino. Erechim/RS, 2020. 65

Tabela 3. Sintomas de fitotoxicidade visual foliar pela leve despigmentação (LD), clorose (CL), necrose (NC), amarelamento (AML), despigmentação total da planta (DTP) e sadia (SD), em *G. max* (soja) (meio de cultivo, controle), tratadas com bio-herbicida de *Trichoderma koningiopsis* (TK), combinação do extrato com o herbicidas comerciais Roundup Original (RO), Roundup WG (WG) e Zapp Qi® (ZQi), realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020. 71

Tabela 4. Altura de planta (AP, cm), diâmetro do caule (DC, mm), massa seca do caule (MSC, g), número de folhas (NF), área folhar (AF, mm²), perímetro foliar (PF, cm), área foliar específica (AFE), massa seca das folhas (MSF, g), diâmetro médio de raiz (DMR, mm), comprimento da maior raiz (CR cm), massa seca da raiz (MSR, g), número de nós (NN), massa seca da parte aérea (MSPA, g), razão entre a MSR e MSPA (MSR/MSPA), massa seca total (MST, g) e mortalidade de plantas (MP) de *G. max* (soja) (meio de cultivo, controle), tratadas com bio-herbicida de *Trichoderma koningiopsis* (TK), combinação do extrato com o herbicida comercial Roundup Original - sal isopropilamina (RO), e o RO isoladamente na dose recomendada, realizadas aos 16 DAT. Estação/RS, UFFS, 2020. 75

Tabela 5. Altura de planta (AP, cm), diâmetro do caule (DC, mm), massa seca do caule (MSC, g), número de folhas (NF), área folhar (AF, mm²), perímetro foliar (PF, cm), área foliar específica (AFE), massa seca das folhas (MSF, g), diâmetro médio de raiz (DMR, mm), comprimento da maior raiz (CR cm), massa seca da raiz (MSR, g), número de nós (NN), massa seca da parte aérea (MSPA, g), razão entre a MSR e MSPA (MSR/MSPA), massa seca total (MST, g) e mortalidade de plantas (MP) de *G. max* (soja) (meio de cultivo, controle), tratadas com bio-herbicida de *Trichoderma koningiopsis* (TK), combinação do extrato com o herbicida comercial Roundup WG - sal de amônio (WG), e o WG isoladamente na dose recomendada, realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020. ... 76

Tabela 6. Altura de planta (AP, cm), diâmetro do caule (DC, mm), massa seca do caule (MSC, g), número de folhas (NF), área folhar (AF, mm²), perímetro foliar (PF, cm), área foliar específica (AFE), massa seca das folhas (MSF, g), diâmetro médio de raiz (DMR, mm), comprimento da maior raiz (CR cm), massa seca da raiz (MSR, g), número de nós (NN), massa seca da parte aérea (MSPA, g), razão entre a MSR e MSPA (MSR/MSPA), massa seca total (MST, g) e mortalidade de plantas (MP) de *G. max* (soja) (meio de cultivo, controle), tratadas com bio-herbicida de *Trichoderma koningiopsis* (TK), combinação do extrato com o herbicida comercial Zapp Qi® - Sal potássico (ZQi), e o ZQi isoladamente na dose recomendada, realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020. 77

Tabela 7. Sintomas de fitotoxicidade visual foliar pela leve despigmentação (LD), clorose (CL), necrose (NC), amarelamento (AML), arroxeamneto (ARX), despigmentação total (DT) e sadia (SD), em *E. heterophylla* (leiteiro) (meio de cultivo, controle), tratadas com bio-herbicida de *Trichoderma koningiopsis* (TK), combinação do extrato com o herbicidas comerciais Roundup Original (RO), Roundup WG (WG) e Zapp Qi® (ZQi), realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020. 82

Tabela 8. Altura de planta (AP, cm), diâmetro do caule (DC, mm), massa seca do caule (MSC, g), número de folhas (NF), área folhar (AF, mm²), perímetro foliar (PF, cm), área foliar específica (AFE), massa seca das folhas (MSF, g), diâmetro médio de raiz (DMR, mm), comprimento da maior raiz (CR cm), massa seca da raiz (MSR, g), número de nós (NN), massa seca da parte aérea (MSPA, g), razão entre a MSR e MSPA (MSR/MSPA), massa seca total (MST, g) e mortalidade de plantas (MP) de *E. heterophylla* (leiteiro) (meio de cultivo, controle), tratadas com bio-herbicida de *Trichoderma koningiopsis* (TK), combinação do extrato com o herbicida comercial Roundup Original - sal isopropilamina (RO), e o RO isoladamente na dose recomendada, realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020. 85

Tabela 9. Altura de planta (AP, cm), diâmetro do caule (DC, mm), massa seca do caule (MSC, g), número de folhas (NF), área folhar (AF, mm²), perímetro foliar (PF, cm), área foliar específica (AFE), massa seca das folhas (MSF, g), diâmetro médio de raiz (DMR, mm), comprimento da maior raiz (CR cm), massa seca da raiz (MSR, g), número de nós (NN), massa seca da parte aérea (MSPA, g), razão entre a MSR e MSPA (MSR/MSPA), massa seca total (MST, g) e mortalidade de plantas (MP) de *E. heterophylla* (leiteiro) (meio de cultivo, controle), tratadas com bio-herbicida de *Trichoderma koningiopsis* (TK), combinação do extrato com o herbicida comercial Roundup WG - sal de amônio (WG), e o WG isoladamente na dose recomendada, realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020. 86

Tabela 10. Altura de planta (AP, cm), diâmetro do caule (DC, mm), massa seca do caule (MSC, g), número de folhas (NF), área folhar (AF, mm²), perímetro foliar (PF, cm), área foliar específica (AFE), massa seca das folhas (MSF, g), diâmetro médio de raiz (DMR, mm), comprimento da maior raiz (CR cm), massa seca da raiz (MSR, g), número de nós (NN), massa seca da parte aérea (MSPA, g), razão entre a MSR e MSPA (MSR/MSPA), massa seca total (MST, g) e mortalidade de plantas (MP) de *E. heterophylla* (leiteiro) (meio de cultivo, controle), tratadas com bio-herbicida de *Trichoderma koningiopsis* (TK), combinação do extrato com o herbicida comercial Zapp Qi® - Sal potássico (ZQi), e o ZQi isoladamente na dose recomendada, realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020. ... 87

Tabela 11. Sintomas de fitotoxicidade visual foliar pela leve despigmentação (LD), clorose (CL), necrose (NC), amarelamento (AML), arroxeamneto (ARX), despigmentação total da planta (DTP) e sadia (SD), em *B. plantaginea* (papuã) (meio de cultivo, controle), tratadas com bio-herbicida de *Trichoderma koningiopsis* (TK), combinação do extrato com o herbicidas comerciais Roundup Original (RO), Roundup WG (WG) e Zapp Qi® (ZQi), realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020. 91

Tabela 12. Altura de planta (AP, cm), diâmetro do caule (DC, mm), massa seca do caule (MSC, g), número de folhas (NF), área folhar (AF, mm²), perímetro foliar (PF, cm), área foliar específica (AFE), massa seca das folhas (MSF, g), diâmetro médio de raiz (DMR, mm), comprimento da maior raiz (CR cm), massa seca da raiz (MSR, g), número de nós (NN), massa seca da parte aérea (MSPA, g), razão entre a MSR e MSPA (MSR/MSPA), massa seca total (MST, g) e mortalidade de plantas (MP) de *B. plantaginea* (papuã) (meio de cultivo, controle), tratadas com bio-herbicida de *Trichoderma koningiopsis* (TK), combinação do extrato com o herbicida comercial Roundup Original - sal isopropilamina (RO), e o RO isoladamente na dose recomendada, realizadas aos 16 DAT. Estação/RS, UFFS, 2020. 94

Tabela 13. Altura de planta (AP, cm), diâmetro do caule (DC, mm), massa seca do caule (MSC, g), número de folhas (NF), área folhar (AF, mm²), perímetro foliar (PF, cm), área foliar específica (AFE), massa seca das folhas (MSF, g), diâmetro médio de raiz (DMR, mm), comprimento da maior raiz (CR cm), massa seca da raiz (MSR, g), número de nós

(NN), massa seca da parte aérea (MSPA, g), razão entre a MSR e MSPA (MSR/MSPA), massa seca total (MST, g) e mortalidade de plantas (MP) de *B. plantaginea* (papuã) (meio de cultivo, controle), tratadas com bio-herbicida de *Trichoderma koningiopsis* (TK), combinação do extrato com o herbicida comercial Roundup WG - sal de amônio (WG), e o WG isoladamente na dose recomendada, realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020.

95

Tabela 14. Altura de planta (AP, cm), diâmetro do caule (DC, mm), massa seca do caule (MSC, g), número de folhas (NF), área folhar (AF, mm²), perímetro foliar (PF, cm), área foliar específica (AFE), massa seca das folhas (MSF, g), diâmetro médio de raiz (DMR, mm), comprimento da maior raiz (CR cm), massa seca da raiz (MSR, g), número de nós (NN), massa seca da parte aérea (MSPA, g), razão entre a MSR e MSPA (MSR/MSPA), massa seca total (MST, g) e mortalidade de plantas (MP) de *B. plantaginea* (papuã) (meio de cultivo, controle), tratadas com bio-herbicida de *Trichoderma koningiopsis* (TK), combinação do extrato com o herbicida comercial Zapp Qi® - Sal potássico (ZQi), e o ZQi isoladamente na dose recomendada, realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020. ... 96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma das etapas e métodos realizados para o desenvolvimento da dissertação. Erechim/RS, UFFS, 2020. Fonte: Elaborado pelo autor. 21

CAPÍTULO I – SENSIBILIDADE DO *Trichoderma koningiopsis* A HERBICIDAS SINTÉTICOS: MÉTODO DISCO-DIFUSO

Figura 1. Esquema da preparação das placas de Petri para análise de sensibilidade do *T. koningiopsis* na presença de 18 herbicidas comerciais em 4 diferentes concentrações. O controle foi realizado com a aplicação de igual volume de água ultrapura. Erechim/RS, UFFS, 2019. Fonte: Elaborado pelo autor. 28

Figura 2. Halos de inibição de crescimento do fungo *T. koningiopsis* pelo produto puro dos herbicidas Cleotodin (Poquer) ao terceiro dia de crescimento (A) e herbicida Nicosulfuron (Accent) aos 7 dias de crescimento (B). Eixo x (indicado pelas linhas vermelhas) e eixo y (indicados pelas linhas pretas) foram utilizados para o cálculo do diâmetro do halo de inibição. Erechim/RS, UFFS, 2019. 28

Figura 3. Fungo *T. koningiopsis* repicado em placas de Petri contendo discos embebidos com os herbicidas Paraquate (Gramoxone) e (A), nicosulfuron (B) e atrazina + simazina (C). O ponto de interseção entre as retas representa o disco embebido com o herbicida e, ao redor, em coloração preta, a formação do halo de inibição do crescimento fúngico. Erechim/RS, UFFS, 2019. 30

Figura 4. Diâmetro (mm) de halos inibitórios de crescimento de *T. koningiopsis* tratados com 18 diferentes herbicidas, com a aplicação do produto comercial sem diluição. Barras representam média \pm DP ($n = 3$). Erechim/RS, UFFS, 2019. 31

Figura 5. Fungo *T. koningiopsis* repicado em placas de Petri contendo discos embebidos com 2x da dose recomendada dos herbicidas Clorimuron (Classic) (A), Glufosinato de amônio (Finale) (B) e Paraquate (Gramoxone) (C). Asteriscos indicam o crescimento do fungo *T. koningiopsis*, com 7 dias de crescimento. Erechim/RS, UFFS, 2019. 32

CAPÍTULO II – UM BIO-HERBICIDA A BASE DE *Trichoderma koningiopsis*: CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA E EFEITO SOBRE PLANTAS DE PEPINO;

Figura 1. A) Tratamento com biocomposto de *T. koningiopsis* em plantas de pepino, método de filtragem do biocomposto, em que, T: testemunho com água (3 mL planta^{-1}), 1: extrato filtrado com papel filtro (3 mL planta^{-1}), 2: extrato filtrado com gaze (3 mL planta^{-1}); 3: extrato bruto (3 mL planta^{-1}); C: controle negativo com meio de cultivo (3 mL planta^{-1}), 4: extrato filtrado com papel filtro + herbicida comercial (3 mL planta^{-1} + HC: Zapp Qi®, na dose de $1,5 \text{ L ha}^{-1}$), 5: extrato filtrado com gaze + herbicida comercial (3 mL planta^{-1} + HC: Zapp Qi®, na dose de $1,5 \text{ L ha}^{-1}$); e 6: extrato bruto + herbicida comercial (3 mL planta^{-1} + HC: Zapp Qi®, na dose de $1,5 \text{ L ha}^{-1}$); B) Injúria em plantas de pepino com tratamento de extrato filtrado com gaze, sintomas característicos do fungo pela necrose do tecido foliar. Erechim/RS, UFFS, 2020. 47

Figura 2. Folhas de pepino (15 DAT) tratadas com meio de cultivo (controle negativo), herbicida comercial (HC, controle positivo), extrato bruto (EBt) de *T. koningiopsis*, extrato filtrado com papel filtro (FilP), extrato filtrado com gaze (FilG), e os extratos combinados com o herbicida comercial (Zapp Qi® Qi, $1,5 \text{ L ha}^{-1}$): Ebt+HC, FilP+HC e FilG+HC. SD, área sadia; LD, leve despigmentação, AML, amarelamento; CL, clorose; NC, necrose; despigmentação total (DT). Erechim, RS, UFFS, 2020. 49

CAPÍTULO III – BIO-HERBICIDA DE *Trichoderma koningiopsis* ASSOCIADO À FORMULAÇÕES COMERCIAIS DE GLIFOSATO

- Figura 1.** Comparação das lesões observadas em folhas de *G. max* (soja), tratadas com meio de cultivo (controle negativo), e pelas respectivas diluições de bio-herbicida com herbicida comercial Roundup Original (Sal isoprolamina) sobre a dose de 2,4 L ha⁻¹, realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020. 68
- Figura 2.** Comparação das lesões observadas em folhas de *G. max* (soja), tratadas com meio de cultivo (controle negativo), e pelas respectivas diluições de bio-herbicida com herbicida comercial Roundup WG (Sal de amônio) sobre a dose de 0,75 Kg ha⁻¹, realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020. 69
- Figura 3.** Comparação das lesões observadas em folhas de *G. max* (soja), tratadas com meio de cultivo (controle negativo), e pelas respectivas diluições de bio-herbicida com herbicida comercial Zapp Qi® (Sal potássico) sobre a dose de 1,5 L ha⁻¹, realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020. 70
- Figura 4.** Comparação das lesões observadas em folhas de *E. heterophylla* (leiteiro), tratadas com meio de cultivo (controle negativo), e pelas respectivas diluições de bio-herbicida com herbicida comercial Roundup Original (Sal isopropilamina) sobre a dose de 4 L ha⁻¹, com bio-herbicida, realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020. 79
- Figura 5.** Comparação das lesões observadas em folhas de *E. heterophylla* (leiteiro), tratadas com meio de cultivo (controle negativo), e pelas respectivas diluições de bio-herbicida com herbicida comercial Roundup WG (Sal de amônio) sobre a dose de 1,5 Kg ha⁻¹, realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020. 80
- Figura 6.** Comparação das lesões observadas em folhas de *E. heterophylla* (leiteiro), tratadas com meio de cultivo (controle negativo), e pelas respectivas diluições de bio-herbicida com herbicida comercial Zapp Qi® (Sal potássico) na dose de 2,8 L ha⁻¹, realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020. 81
- Figura 7.** Comparação das lesões observadas em folhas de *B. plantaginea* (papuã), tratadas com meio de cultivo (controle negativo), e pelas respectivas diluições de bio-herbicida com herbicida comercial Roundup Original (Sal isopropilamina) sobre a dose de 1 L ha⁻¹, realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020. 88
- Figura 8.** Comparação das lesões observadas em folhas de *B. plantaginea* (papuã), tratadas com meio de cultivo (controle negativo), e pelas respectivas diluições de bio-herbicida com herbicida comercial Roundup WG (Sal de amônio) sobre a dose de 0,5 Kg ha⁻¹, realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020. 89
- Figura 9.** Comparação das lesões observadas em folhas de *B. plantaginea* (papuã), tratadas com meio de cultivo (controle negativo), e pelas respectivas diluições de bio-herbicida com herbicida comercial Zapp Qi® (Sal potássico) sobre a dose de 1,5 L ha⁻¹, realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020. 90

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	15
OBJETIVO GERAL.....	17
Objetivos específicos	17
REFERÊNCIAS	18
APRESENTAÇÃO DOS TRABALHOS	20
CAPÍTULO I: SENSIBILIDADE DO <i>Trichoderma koningiopsis</i> A HERBICIDAS SINTÉTICOS: MÉTODO DISCO-DIFUSO	22
INTRODUÇÃO	23
MATERIAL E MÉTODOS	25
RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
LITERATURA CITADA	34
CAPÍTULO II: BIO-HERBICIDA ALTERNATIVO A BASE DE <i>Trichoderma koningiopsis</i>: CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA E EFEITO SOBRE PLANTAS DE PEPINO.	35
INTRODUÇÃO	36
MATERIAL E MÉTODOS	38
<i>Produção e caracterização enzimática do biocomposto</i>	38
<i>Avaliação do efeito bio-herbicida em plantas de pepino</i>	41
<i>Ecotoxicidade</i>	43
RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
<i>Caracterização enzimática do biocomposto</i>	45
<i>Efeito bio-herbicida em plantas de pepino</i>	46
<i>Ecotoxicidade</i>	53
CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
LITERATURA CITADA	54
CAPÍTULO III: BIO-HERBICIDA DE <i>Trichoderma koningiopsis</i> ASSOCIADO A FORMULAÇÕES COMERCIAIS DE GLIFOSATO	59
INTRODUÇÃO	60
MATERIAL E MÉTODOS	62
RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
<i>Efeitos do bio-herbicida associado a herbicidas na cultura de soja</i>	67
<i>Efeitos do bio-herbicida associado a herbicidas na planta de leiteiro</i>	78
<i>Efeitos do bio-herbicida associado a herbicidas na planta de papuã</i>	88
CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
LITERATURA CITADA	97
CONCLUSÕES FINAIS	101

INTRODUÇÃO GERAL

Até meados da Segunda Guerra Mundial, para o manejo de plantas daninhas, utilizava-se principalmente o controle mecânico, rotação de culturas e seleção de sementes, o que demandava intenso trabalho com resultado muito variável (SCHROEDER, 1992). A partir dos anos de 1960, com a Revolução Verde, houve um avanço na agricultura contemporânea ao se basear principalmente na seleção de variedades de maior rendimento, uso de fertilizantes químicos e intenso uso de agrotóxicos para o controle de patógenos, insetos e plantas daninhas (MAZOYER & ROUDART, 2008).

Quando comparadas com as técnicas da agricultura convencional, a utilização de bio-herbicidas consiste em ser uma prática relativamente nova. Os primeiros estudos ocorreram em 1971 com a utilização do fungo *Puccinia chondrillina* para o controle de *Chondrilla juncea* (BARTON, 2004; KLAIC et al., 2015). Atualmente 57 produtos de biocontrole já estão registrados como métodos de controle de pragas na plataforma brasileira do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, mas nenhum bio-herbicida até o presente momento (AGROFIT, 2020).

O controle biológico pode ser oriundo da utilização de microrganismos fitopatogênicos, no caso dos fungos existe uma serie de enzimas e compostos químicos que podem ser fitotóxicos e patogênico (tóxicos para plantas e causadores de doenças) ou até mesmo o próprio microrganismo pode agir como parasita na planta, assim apresentando o seu potencial bio-herbicida (BAILEY et al., 2011; CHARUDATTAN & DINOOR, 2000; KLAIC et al., 2015).

Os fungos do gênero *Trichoderma*, são habitantes naturais do solo e encontrados em todos os ecossistemas; colonizam raízes, folhas e tem a capacidade de empregar mais de um mecanismo de ação para exercer o biocontrole de doenças, antagonistas desse gênero (BETTIOL & GHINI, 1995; HARMAN et al. 2004; ROSA & HERRERA, 2009; VITERBO & HORWITZ, 2010, CONSOLO et al. 2012). O *Trichoderma koningiopsis* utiliza basicamente quatro mecanismos de ação no biocontrole, sendo eles antibiose, micoparasitismo, competição e indução de resistência, como mecanismos de defesa da planta (VAN DRIESCHE & BELLOWS, 1996).

Ortiz-Ribbing e Williams (2006) observaram que suspensões conidiais dos fungos *Phomopsis amaranthicola* e *Microsphaeropsis amaranthi* promoveram sintomas severos de infecção, redução no crescimento e mortalidade entre 80 e 100% de plantas daninhas do gênero *Amaranthus*. O fungo *Phoma macrostoma* já foi demonstrado ser fitopatogênico para

38 espécies de 12 famílias, representadas em sua maioria por dicotiledôneas (BAILEY et al., 2011). Fungos do gênero *Phoma* são descritos por produzir diferentes fitotoxinas (ZHANG et al., 2012; HYNES, 2018), capazes de atuar na inibição de diversas plantas daninhas em pré (BRUN, 2019) e pós-emergência (BASTOS et al., 2017; KLAIC et al., 2017; TODERO et al., 2018).

Bordin et al. (2018) verificaram que a composição do meio de cultura e as condições de cultivo do fungo *Trichoderma koningiopsis* influenciam a toxicidade dos biocompostos nas folhas de *Euphorbia heterophylla*. Além disso, a seleção do adjuvante para a aplicação do bio-herbicida pode potencializar a sua eficiência (BASTOS et al., 2017). No cenário atual, a produção em larga escala desses metabólitos fúngicos ainda requer estudos para a melhoria nas formulações e registro de produtos.

À medida que novos produtos são desenvolvidos, as plantas daninhas continuarão a evoluir em resposta a qualquer pressão seletiva aplicada. Para tanto, o desenvolvimento contínuo de novos métodos de controle é essencial para a manutenção dos rendimentos agrícolas, diminuição do uso contínuo de agrotóxicos e redução dos efeitos negativos dos pesticidas, como a contaminação ambiental, efeito residual no ambiente e nos alimentos, bem como a intoxicação dos agricultores.

A hipótese deste estudo é que o bio-herbicida a base de *Trichoderma koningiopsis* seja uma alternativa eficiente no controle de plantas daninhas. A pesquisa objetivou a caracterização dos efeitos causado pelo bio-herbicida produzido a base de *T. koningiopsis* nas características enzimáticas, morfológicas, fitotóxicas e ecotoxicológicas de plantas daninhas de inverno e de verão, bem como quando associado a agrotóxicos para a construção de uma ponte direcionada aos olhos do mercado agrícola como uma alternativa sustentavelmente viável e ecologicamente inofensiva.

OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial bioherbicida do *Trichoderma koningiopsis* em plantas daninhas do leiteiro e papuã e nas culturas da soja e pepino, em associação com herbicidas sintéticos.

Objetivos específicos

Avaliar o efeito de herbicidas sintéticos sobre o fungo *T. koningiopsis*;

Quantificar a atividade das enzimas amilases, celulasas, lipases e peroxidases e a biomassa fúngica no bio-herbicida a base de *T. koningiopsis*;

Avaliar o efeito de diferentes doses de herbicidas sintéticos associados ao bio-herbicida nas características morfofisiológicas de plantas daninhas e cultivadas, em casa de vegetação;

Identificar efeitos ecotoxicológicos do herbicida sobre organismos (minhocas).

REFERÊNCIAS

- AGROFIT. SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons>. Acessado em 05 de setembro de 2020.
- BAILEY, K. L.; PITT, W. M.; FALK, S.; DERBY, J. The effects of *Phoma macrostoma* on nontarget plant and target weed species. **Biological Control**, v.58, p.379-386, 2011.
- 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.
- BASTOS, B. O.; DEOBALD, G. A.; BRUN, T.; DAL PRÁ, V.; JUNGES, E.; KUHN, R. C.; MAZUTTI, M. A. Solid-state fermentation for production of a bioherbicide from *Diaporthe* sp. and its formulation to enhance the efficacy. **Biotech**, v.7, p.135, 2017.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico. **Manual de fitopatologia**, p. 717-728, 1995.
- BORDIN, E.R.; CAMARGO, A.F.; ROSSETTO, V.; SCAPINI, T.; MODKOVSKI, T.A.; WEIRICH, S.; CAREZIA, C.; FRANCESCHETTI, M.B.; BALEM, A.; GOLUNSKI, S.M.; GALON, L.; FUZINATTO, C.F.; REICHERT JÚNIOR, R.W.; FONGARO, G.; MOSSI, A.J.; TREICHEL, H. Non-toxic bioherbicides obtained from *Trichoderma koningiopsis* can be applied to the control of weeds in agriculture crops. **Industrial Biotechnology**, v.14, n.3, p.157-163, jun. 2018. doi: [dx.doi.org/10.1089/ind.2018.0007](https://doi.org/10.1089/ind.2018.0007).
- BRUN, T. **Produção de herbicida por fermentação submersa a partir do fungo *Phoma* sp. em biorreator**. 2015. 59 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016. Disponível em: <<http://repositorio.ufsm.br/handle/1/7621>>. Acesso em 14 maio 2019.
- CHARUDATTAN, R.; DINOOR, A. et al. Biological control of weeds using plant pathogens: accomplishments and limitations. **Crop Protection**, v.19, p.691-695, 2000.
- CONSOLO, V. F., MÓNACO, C. I., CORDO, C. A., SALERNO, G. L. Characterization of novel *Trichoderma* spp. isolates as a search for effective biocontrollers of fungal diseases of economically important crops in Argentina. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1389-1398, 2012.
- HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Natural Reviews. Microbiology**, v.2,

p.43-56, 2004.

HYNES, R. K. *Phoma macrostoma*: as a broad spectrum bioherbicide for turfgrass and agricultural applications. **CAB Reviews**, v.13, n.5, p.1-9, 2018.

KLAIC, R.; KUHN, R. C.; FOLETTO, E. L.; DAL PRÁ, V.; JACQUES, R. J. S.; GUEDES, J. V. C.; TREICHEL, H.; MOSSI, A. J.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V.; JAHN, S. L.; MAZUTTI, M. A. In: An overview regarding bioherbicide and their production methods by fermentation. **Fungal Biomolecules: Sources, Applications and Recent Developments**. 1 ed.: John Wiley & Sons, Ltda, 2015.

KLAIC, R.; SALLET, D.; FOLETTO, E. L.; JACQUES, R. J. S.; GUEDES, J. V. C.; KUHN, R. C.; MAZUTTI, M. A. Optimization of solid-state fermentation for bioherbicide production by *Phoma* sp. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.34, n.2, p.377-384, 2017.

MAZOYER, M.; ROUDART, L. **História das agriculturas no mundo: do neolítico à crise contemporânea**. UNESP, p.568, 2008.

ORTIZ-RIBBING, 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.

ROSA, R. D.; HERRERA, L. C. J. Avaliação de *Trichoderma* spp. como agentes de biocontrole contra a podridão da raiz branca de abacate. **Controle biológico**, v. 51, n. 1, p. 66-71, 2009.

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

TODERO, I.; CONFORTIN, T. C.; LUFT, L.; et al. Formulation of a bioherbicide with metabolites from *Phoma* sp. **Scientia Horticulturae**, v.241, p.285-292, 2018.

VITERBO, A; HORWITZ, B. A. Mycoparasitism. In: **Cellular and molecular biology of filamentous fungi**. American Society of Microbiology, 2010. p. 676-693.

ZHANG, X.; LI, C.; NAN, Z. Effects of cadmium stress on seed germination and seedling growth of *Elymus dahuricus* infected with the *Neotyphodium endophyte*. **Sci China Life Sci**. v.55(9), p.723-799, 2012.

APRESENTAÇÃO DOS TRABALHOS

Este trabalho é composto por três capítulos, os quais foram elaborados utilizando respostas de três experimentos, o primeiro em laboratório objetivando verificar a viabilidade no desenvolvimento do fungo *Trichoderma koningiopsis* em conjunto com herbicidas comerciais.

No segundo, ainda em laboratório o objetivo foi a produção e caracterização de compostos químicos e enzimáticos do bio-herbicida produzido através do fungo de estudo, e após em casa de vegetação testado sobre a planta modelo do pepino para verificar seu efeito bio-herbicida.

E no terceiro capítulo, os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação para testar os efeitos do herbicida combinado com diferentes formulações e doses de glifosato no controle de plantas daninhas e culturas agrícolas.

Diante do exposto, os capítulos foram divididos de acordo com as análises, da seguinte forma:

CAPÍTULO I – Sensibilidade do *Trichoderma koningiopsis* a herbicidas sintéticos: método disco-difuso;

CAPÍTULO II – Um bio-herbicida a base de *Trichoderma koningiopsis*: Caracterização enzimática e efeito sobre plantas de pepino;

CAPÍTULO III – Bio-herbicida de *Trichoderma koningiopsis* associado a formulações comerciais de glifosato.

Os capítulos I e III foram formatados de acordo com as normas da Revista Planta Daninha (ISSN: 1806-9681, Classificação 2020: B1; JCR 2020: 0,46).

DIRETRIZES PARA AUTORES: <https://www.scielo.br/revistas/pd/iinstruc.htm>

O capítulo II foi formatado de acordo com as normas da Revista Biological Agriculture & Horticulture (ISSN: 0144-8765, Classificação 2020: A3; JCR 2020: 1,67).

DIRETRIZES PARA AUTORES: <https://www.tandfonline.com/action/author>

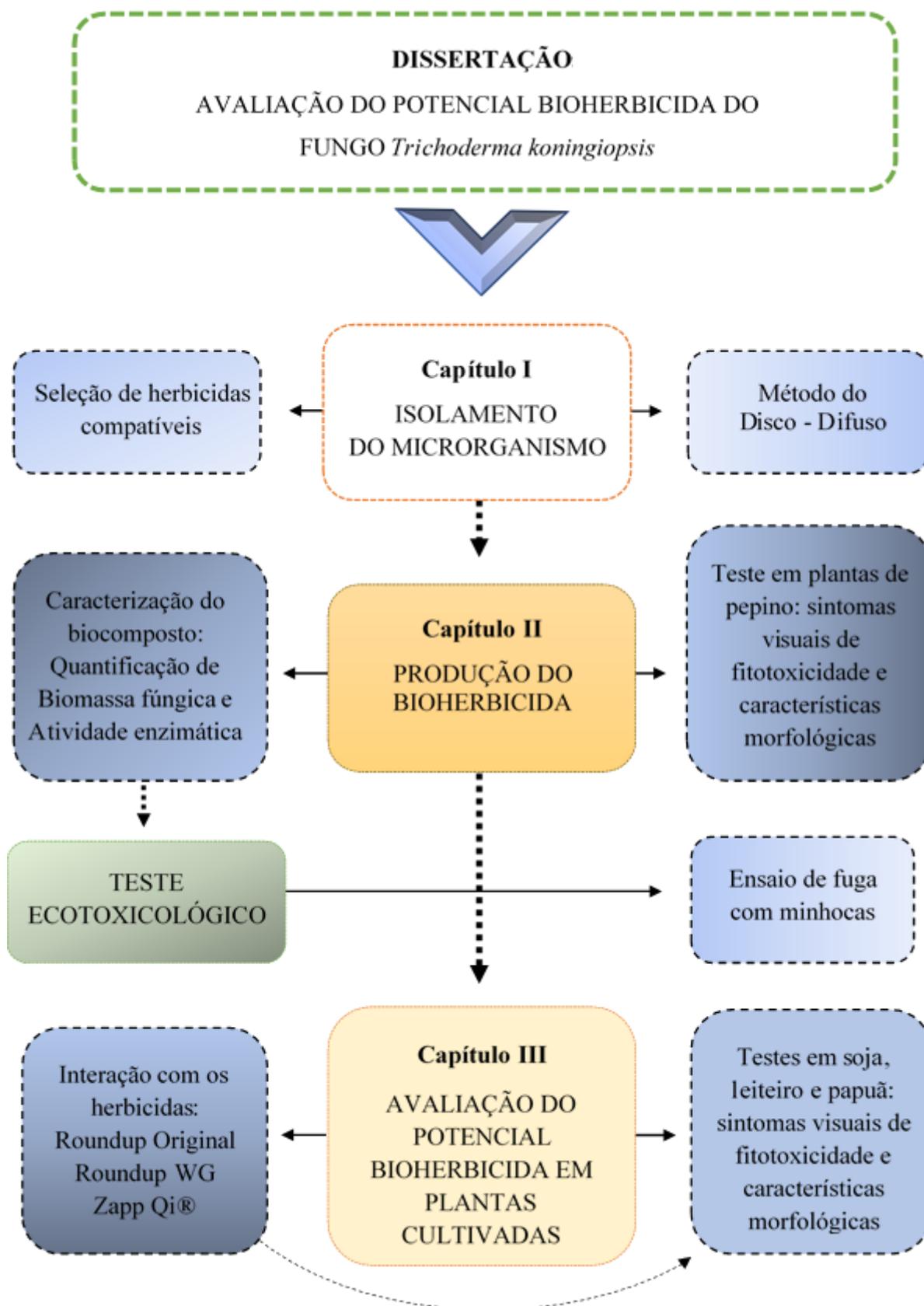


Figura 1. Fluxograma das etapas e métodos realizados para o desenvolvimento da dissertação. Fonte: Elaborado pelo autor.

CAPÍTULO I

SENSIBILIDADE DO *Trichoderma koningiopsis* A HERBICIDAS SINTÉTICOS: MÉTODO DISCO-DIFUSO

SENSITIVITY OF *Trichoderma koningiopsis* TO SYNTHETIC HERBICIDES: DISCO- DIFFUSED METHOD

RESUMO - O microrganismo *Trichoderma* spp. demonstrou potencial bio-herbicida para o controle de plantas daninhas. Entretanto, sua eficiência pode ser comprometida quando não manejado em condições favoráveis ao seu desenvolvimento ou quando associado a produtos que podem causar interferências em sua atuação como bio-herbicida. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência fúngica de *Trichoderma koningiopsis* frente a exposição de diferentes concentrações de herbicidas comerciais, através da metodologia de disco-difuso para posterior classificação de sensibilidade. O ensaio foi realizado no laboratório de Agroecologia da Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Erechim/RS. Observou-se que, para os ensaios utilizando discos embebidos com a dose recomendada dos herbicidas, sem diluição o microrganismo apresentou formação de halos de inibição. Sem diluição dos produtos, o *T. koningiopsis* foi classificado como sensível para os herbicidas poquer (Cleotodin), nicosulfuron (Accent), clorimuron (Classic), glifosato (Shadow, R. Original, R WG, Zapp Qi®), 2,4-D (DMA), glufosinato de amônio (Finale), gramoxone (Paraquate), sulfotrazone (Boral® 500 SC), fomesafen (Flex®), saflufenaciz (Heat) e atrazina + simazina (Primatop® SC). Ao avaliar 2x a dose recomendada, não foi observada a formação de halos para nenhum dos herbicidas testados, mas foi possível verificar retardo no crescimento fúngico quando exposto ao nicosulfuron (Accent), clorimuron (Classic), glufosinato de amônio (Finale) e gramoxone (Paraquate), sendo caracterizados como moderadamente sensíveis. Nas concentrações de 0,5x e 1x da dose não foram observados halos de inibição ao crescimento fúngico. Concluiu-se que o *T. koningiopsis* pode ser associado aos produtos testados nesta pesquisa quando na dose recomendada sem afetar o desenvolvimento fúngico.

Palavras-chave: bio-herbicida, resistência fúngica, herbicidas comerciais.

ABSTRACT – The microorganism *Trichoderma* spp. is an alternative biological control that presents bioherbicide capacity for weed control. However, its efficiency can be compromised when not in conditions favorable to its development or when associated with products that may cause air interference in its performance as a bioherbicide. The objective of this work was to evaluate the fungal resistance of *Trichoderma koningiopsis* against the exposure of different concentrations of commercial herbicides, through the diffuse disc methodology for subsequent sensitivity classification. The assay was carried out in the Agroecology Laboratory of the Federal University of the Southern Border, *Campus Erechim/RS*. It was observed that, for the tests using discs soaked with the recommended dose of herbicides, without dilution the microorganism presented formation of inhibition halos. Without dilution of the products, *T. koningiopsis* has been classified as sensitive to the herbicides poquer (Cleotodin), nicosulfuron (Accent), Clorimuron (Classic), glifosato (Shadow, R. Original, R. WG, Zapp Qi®), 2,4-D (DMA), Glufosinato de amônio (Finale), Gramoxone (Paraquate), Sulfotrazone (Boral® 500 SC), Fomesafen (Flex®), Saflufenaciz (Heat) and Atrazina + Simazina (Primatop® SC). When evaluating 2x the recommended dose, halo formation was not observed for any of the herbicides tested, but it was possible to verify delayed fungal growth when exposed to Nicosulfuron (Accent), Clorimuron (Classic), Glufosinato de amônio (Finale) and Gramoxone (Paraquate), being characterized as moderately sensitive. At concentrations of 0.5x and 1x of the dose, no halos of inhibition to fungal growth were observed. It was concluded that *T. koningiopsis* can be associated with the products tested in this research when at the recommended dose without affecting fungal development.

keywords: bioherbicide, fungal resistance, commercial herbicides.

INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos, apesar de largamente utilizados na agricultura, possuem moléculas potencialmente danosas para todos os organismos expostos aos produtos. Dependendo da persistência e toxicidade, esses produtos podem interferir em processos básicos do ecossistema (Ibama, 2010), representando um risco para o solo e plantas não-alvo. Por outro lado, dentro de um sistema de produção agroecológico, Gliessman (2000) ressalta que quanto maior a similaridade estrutural e funcional de um agroecossistema com os ecossistemas naturais existentes em sua região biogeográfica, e portanto, menor

contaminação de produtos químicos, maior é a possibilidade de que um agroecossistema seja sustentável.

Assim, o sistema agroecológico, além de não utilizar insumos e pesticidas sintéticos, explora métodos alternativos importantes para a convivência das pragas e doenças. O uso de produtos naturais, como bio-herbicidas, são uma estratégia alternativa que podem auxiliar tanto na substituição como na redução da dose do herbicida sintético quando tiver eficiência comprovada no campo (Fernandes e Favero, 2014).

Os investimentos de indústrias químicas no desenvolvimento de bio-herbicidas ainda apresentam uma taxa de sucesso abaixo de 1%, quando comparada aos 5% no desenvolvimento de herbicidas sintéticos (Klaic et al., 2015). No entanto, ao longo do tempo, o assunto tem sido cada vez mais abordado em pesquisas brasileiras e artigos científicos principalmente para o desenvolvimento de novos bio-herbicidas.

Alguns microrganismos fitopatogênicos possuem potencial investigatório quanto ao efeito sobre outros organismos considerados indesejáveis. Dentre estes, o gênero *Trichoderma* possui 104 espécies listadas na comissão internacional da taxonomia de fungos (Druzhinina, Kubicek e Komon-Zelazowska, 2008), e 193 no GenBank (2019).

O uso de fungos em programas de controle de plantas daninhas depende da produção de conídios em larga escala, podendo ser gerado como bioproduto de meios de cultura líquidos ou sólidos, em sistema bifásico. O meio de cultura é dependente da espécie de fungo de interesse. Moraes et al. (2014) observou que, para a produção de conídios de *Bipolaris euphorbiae*, um patógeno específico de *Euphorbia heterophylla*, há maior crescimento do fungo em meio sólido.

Estudos prévios dos grupos de pesquisa em Bioprocessos e Agroecologia da UFFS visaram otimizar o meio de cultivo para a produção de bio-herbicida a base de *T. koningiopsis* (Bordin et al., 2018) e testar a viabilidade da produção e aplicação de biocompostos a partir do fungo *T. koningiopsis* por processo fermentativo submerso (meio líquido) em biorreator. Foram observados resultados promissores para efeitos fitotóxicos do extrato em plantas de *Bidens* sp., *Euphorbia heterophylla* (Camargo et al., 2020) e *Urochloa plantaginea* (Reichert Júnior et al., 2019).

Neste cenário, tem-se como objetivo deste estudo avaliar o desenvolvimento do microrganismo *T. koningiopsis* frente a exposição de diferentes concentrações de herbicidas, sendo testados produtos comerciais de diferentes mecanismos de ação.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo

O microrganismo *Trichoderma koningiopsis* (Código do Cadastro SISGEN - A8675F0), foi obtido do banco de microrganismos do Laboratório de Agroecologia e Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos da Universidade Federal da Fronteira Sul - Campus Erechim/RS. O *T. koningiopsis*, sendo previamente isolado a partir da planta milhã (*Digitaria horizontalis*) coletada no município de Quatro Irmãos/RS (Reichert Júnior et al., 2019).

Para os ensaios, o fungo foi inicialmente repicado em 20 mL de meio de cultura ágar batata dextrose (39 g L⁻¹) solidificado, em câmara de fluxo laminar (Biotec, Master Lab, Brasil). Os fungos foram incubados a 26 °C em estufa incubadora BOD (SL-200, Solab, Brasil) para atingir a maturidade fisiológica (7 dias), visualizada pela formação de esporos, conforme metodologia descrita por Souza et al. (2017).

Herbicidas avaliados

Os herbicidas sintéticos foram fornecidos pelo grupo de pesquisa de Manejo Sustentável dos Sistemas Agrícolas da UFFS. Os herbicidas avaliados compreendem 11 grupos químicos de grande utilização na agricultura, sendo eles:

- ❖ Poquer (Cleotodin) Nortox (são inibidores de acetil coenzima *a* carboxilase – ACCase, grupo A);
- ❖ Nicosulfuron (Accent), Clorimuron (Classic) e Metsulfuram (Ally) (inibidores de acetolacto sintase – ALS, grupo B);
- ❖ Atrazina + Simazina (Primatop® SC) (inibidores de fotossíntese no fotossistema II – FS2, grupo C);
- ❖ Gramoxone (desvio de elétrons do fotossistema I (FS1, grupo D);
- ❖ Sulfotrazone (Boral® 500 SC), Fomesafen (Flex®) e Saflufenaciz (Heat) (protoporfirogen Oxidase – Protox (grupo E);
- ❖ Mesotrione 480SC (inibidores da biossíntese de carotenoides - Caro, grupo F);
- ❖ Glifosato (Shadow, Roundup Original, Roundup WG e Zapp QI® 620) (síntese do 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato – EPSPs, grupo G);
- ❖ Glufosinato de amônio (Finale) (inibidores da glutamina sintetase, grupo H);
- ❖ 2,4-D DMA (memitizadores de Auxina, grupo O);
- ❖ Tembotriona (Soberan) (inibidores de raízes ou microtúbulos, grupo K1);

- ❖ S-Metolacoloro (Dual Gold) (inibidores da parte aérea, grupo N e K3).

Os herbicidas foram avaliados em quatro concentrações: 50% (0,5x); 100% (1x); 200% (2x) da dose recomendada e o produto sem diluição; e o controle contendo água destilada em igual volume. As concentrações foram calculadas para o volume final de 0,025 L conforme a equação 1.

$$\text{Volume de diluição} = \frac{\text{Dose recomendada (g ou L ha}^{-1}\text{)}}{\text{Volume da calda terrestre (L ha}^{-1}\text{)}} * 0,025 \text{ L} \quad \text{Equação (1)}$$

As características dos herbicidas utilizados e respectivas diluições são apresentadas como material suplementar (Tabela 1).

Condução do experimento e delineamento experimental

Para avaliar a sensibilidade do fungo *T. koningiopsis* à presença de herbicidas foi utilizado o método disco-difuso, método de Kirby-Bauer (Bauer et al. 1966), com adaptações. Essa técnica fundamenta-se na disposição de um agente antimicrobiano (no caso o herbicida) em um disco de papel filtro que é sobreposto ao meio de cultivo presente em placas de Petri. A difusão do agente poderá apresentar um halo de inibição ao crescimento do fungo, indicando sensibilidade do fungo ao agente antimicrobiano.

O experimento foi conduzido no laboratório de agroecologia da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus Erechim/RS*. Esporos do fungo *T. koningiopsis* ($6,2 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$) foram diluídos em 40 mL água peptonada autoclavada. Dez microlitros da solução fúngica diluída foram pipetados em placas de Petri esterilizadas, contendo o meio de cultura. Os esporos foram semeados em toda a sua superfície com auxílio de alça de Drigalski. Discos de papel com aproximadamente 5 mm de diâmetro embebidos nas respectivas concentrações de herbicidas nas doses recomendadas para o controle de plantas daninhas, e alocados nas placas de Petri, conforme esquematizado na Figura 1. Para o crescimento do fungo, as placas foram incubadas a 26 °C por um período de 7 dias.

Tabela 1. Características de herbicidas sintéticos e suas respectivas recomendações, dosagens para controle de plantas daninhas com as respectivas diluições em 0,025 L para teste de inibição (sensibilidade) do crescimento do fungo *T. koningiopsis*. Diluições do produto em 0,5x, 1x e 2x da dose recomendada de cada produto comercial.

MECANISMO DE AÇÃO	PRINCÍPIO ATIVO	NOME COMERCIAL	CONTROLA *	FORMULAÇÃO **	Dose recomendada por hectare (g ou L ha ⁻¹)				Dose (g ou L) de diluição em 0,025 L de calda			
					0,5x	1x	2x	v. calda	0,5x	1x	2x	
FOLHA Sistêmico	ACCase	Oxima ciclohexanodiona	Cleotodin (Poquer)	G	EC (mL)	0,15	0,3	0,6	200	0,000018	0,000037	0,000075
		Sulfoniluréias (nicossulfuron)	Accent		WG (g)	30	60	120	200	0,00375	0,0075	0,02
	ALS	Sulfoniluréias (clorimuron)	Classic	DCG	WG (g)	40	80	160	100	0,01	0,02	0,04
		Sulfoniluréias (metsulfurom)	Ally		WG (g)	3,3	6,6	13,2	100	0,000825	0,00165	0,0033
		Glicina substituída (Gs-SIsop)	Shadow		SL (mL)	2	4	8	100	0,0005	0,001	0,002
		Gs (Sal isopropilamina)	Roundup Original		SL (mL)	1	2	4	100	0,00025	0,0005	0,001
	EPSPs	Gs (Sal de amônio)	Roundup WG	DG	WG (g)	1250	2500	5000	100	0,3125	0,625	1,25
		Gs (Sal potássico)	Zapp Qi® 620		SL (mL)	1,05	2,1	4,2	100	0,000262	0,000525	0,00105
	Auxina	Ácido diclorofenoxiacéti	2,4-D Nortox	D	SL (mL)	0,75	1,5	3	200	0,000093	0,000187	0,000375
	GS	Glufosinato (sal de amônio)	Finale	DCG	SL (mL)	1	2	4	300	0,000083	0,000166	0,000333
FOLHA Contato	FS1	Bipiridílio (paraquate)	Gramoxone 200	DG	SL (mL)	1	2	4	300	0,000083	0,000166	0,000333
		Triazolona (sulfentrazone)	Boral® 500 sc		SC (mL)	0,4	0,8	1,6	250	0,00004	0,00008	0,00016
	Protox	Éter difenílico (fomesafem)	Flex®	D	SL (mL)	0,5	1	2	200	0,000062	0,000125	0,00025
		Pirimidinadiona (uracila)	Heat		WG (g)	25	50	100	150	0,004167	0,008333	0,016666
SOLO Moveis	FS2	Triazinas (C1) (atrazina + simazina)	Primatop® sc	D	SC (mL)	4	8	16	200	0,0005	0,001	0,002
	Caroteno	Tricetona (mesotrione)	Callisto 480 sc	DG	SC (mL)	0,2	0,4	0,8	100	0,00005	0,0001	0,0002
SOLO Imóveis	Prt. Aérea	Cloroacetanilida	Dual Gold		SL (mL)	1	2	4	200	0,000125	0,00025	0,0005
	Raízes	Benzoilciclohexanodiona	Soberan(sistêmico)	G	SL (mL)	0,12	0,24	0,48	200	0,000015	0,00003	0,00006

*Planta a que controla: C= Ciperáceas, D= Dicotiledôneas, G= Gramíneas; **Formulação do produto comercial: EC= Concentrado emulsionável, WG= Granulado dispersível, SL= Concentrado solúvel, SC= Suspensão concentrada aquosa.

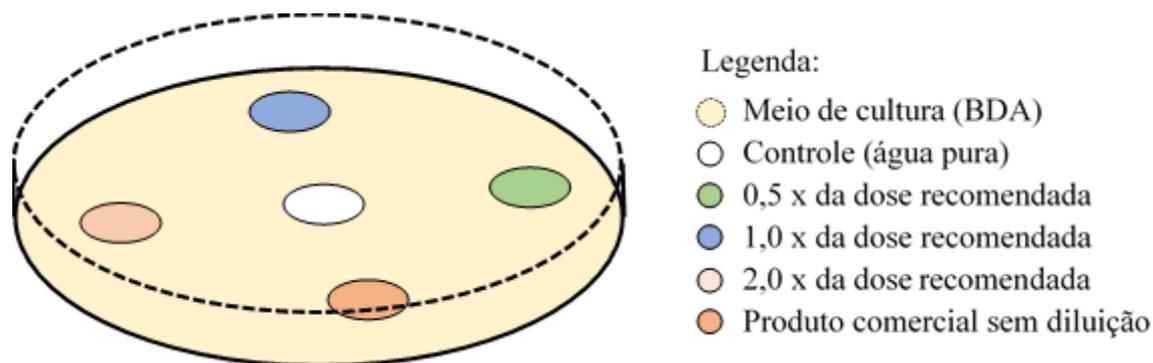


Figura 1. Esquema da preparação das placas de Petri para análise de sensibilidade do *T. koningiopsis* na presença de 18 herbicidas comerciais em 4 diferentes concentrações. O controle foi realizado com a aplicação de igual volume de água ultrapura. Erechim/RS, UFFS, 2019. Fonte: Elaborado pelo autor.

O diâmetro referente ao halo de inibição do crescimento fúngico foi medido a cada 24 horas com paquímetro (PDV 1500, Vonder, Brasil). Posteriormente o microrganismo *T. koningiopsis* foi classificado como sensível, moderadamente sensível ou tolerante para cada herbicida testado (Figura 2).

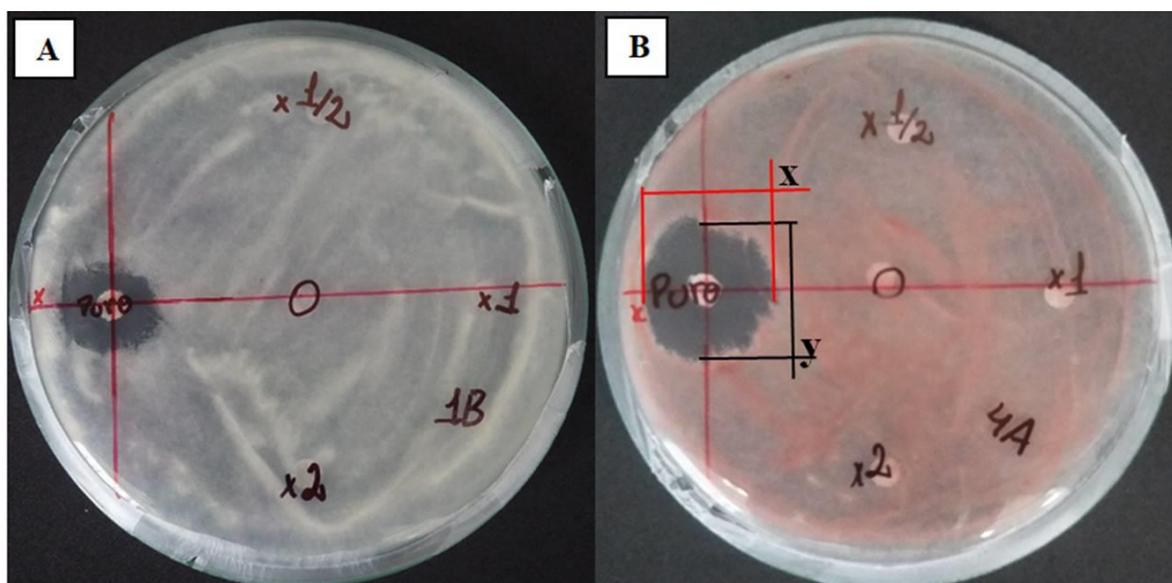


Figura 2. Halos de inibição de crescimento do fungo *T. koningiopsis* pelo produto puro dos herbicidas Cleotodin (Poquer) ao terceiro dia de crescimento (A) e herbicida Nicosulfuron (Accent) aos 7 dias de crescimento (B). Eixo x (indicado pelas linhas vermelhas) e eixo y (indicados pelas linhas pretas) foram utilizados para o cálculo do diâmetro do halo de inibição. Erechim/RS, UFFS, 2019.

Análise estatística

O diâmetro dos halos inibitórios foi avaliado por análise de variância, seguido pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade utilizando o software Statistica v. (StatSoft Inc., USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O microrganismo *T. koningiopsis* demonstrou comportamento diferencial quando associado a herbicidas sintéticos. Na Tabela 2 é possível observar a formação de halos de inibição, aos 7 dias de crescimento para o produto comercial sem diluição. Nesse tratamento, os halos de inibição do crescimento fúngico iniciaram nas primeiras 24 h após a repicagem (dados não mostrados). Os herbicidas testados nas concentrações de 0,5x, 1,0x e 2x da dose recomendada não ocasionou halos de inibição em *T. koningiopsis* (Tabela 2).

Tabela 2. Diâmetro (mm) de halos inibitórios do *T. koningiopsis* após sete dias de exposição a diversos herbicidas sintéticos com diferentes concentrações (controle, 0,5x, 1,0x e 2x da dose recomendada, e o herbicida (produto comercial sem diluição). Erechim/RS, UFFS, 2019.

Herbicida	Controle	0,5x	1x	2x	Herbicida sem diluição
Poquer (Cleotodin)	0,0	0,0	0,0	0,0	16,4 ± 1,9 ¹ cd ²
Nicosulfuron (Accent)	0,0	0,0	0,0	0,0	27,6 ± 4,3ab
Clorimuron (Classic)	0,0	0,0	0,0	0,0	7,4 ± 2,2f
Metsulforom (Ally)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Glifosato (Shadow)	0,0	0,0	0,0	0,0	10,8 ± 0,4de
Glifosato (Roundup Original)	0,0	0,0	0,0	0,0	11,0 ± 1,2de
Glifosato (Roundup WG)	0,0	0,0	0,0	0,0	11,1 ± 1,3de
Glifosato (Zapp Qi® 620)	0,0	0,0	0,0	0,0	10,5 ± 1,0de
2,4-D (DMA)	0,0	0,0	0,0	0,0	12,8 ± 4,2de
Glufosinato de amônio (Finale)	0,0	0,0	0,0	0,0	21,5 ± 2,7bc
Paraquate (Gramoxone 200)	0,0	0,0	0,0	0,0	33,0 ± 3,2a
Sulfotrazone (Boral® 500 SC)	0,0	0,0	0,0	0,0	12,5 ± 1,7de
Fomesafen (Flex®)	0,0	0,0	0,0	0,0	13,6 ± 3,8de
Saflufenaciz (Heat)	0,0	0,0	0,0	0,0	8,2 ± 2,0e

Atrazina + Simazina (Primatop® SC)	0,0	0,0	0,0	0,0	27,2 ± 1,1ab
Mesotrione (Callisto)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
S-Metolacoloro (Dual Gold)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Tembotriona (Soberan)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

¹dados representam média ± DP ($n = 3$); ²médias seguidas por letras iguais, dentro da coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

Os maiores halos de inibição formados ocorreram nos discos embebidos com Paraquate (Gramoxone) (33,07 mm), Accent (27,67 mm), Atrazina + Simazina (Primatop® SC) (27,28 mm), Poquer (Cleotodin) (16,48 mm) e Glufosinato de amônio (Finale) (21,53 mm), indicando uma alta sensibilidade de *T. koningiopsis* (Figuras 3, 4).

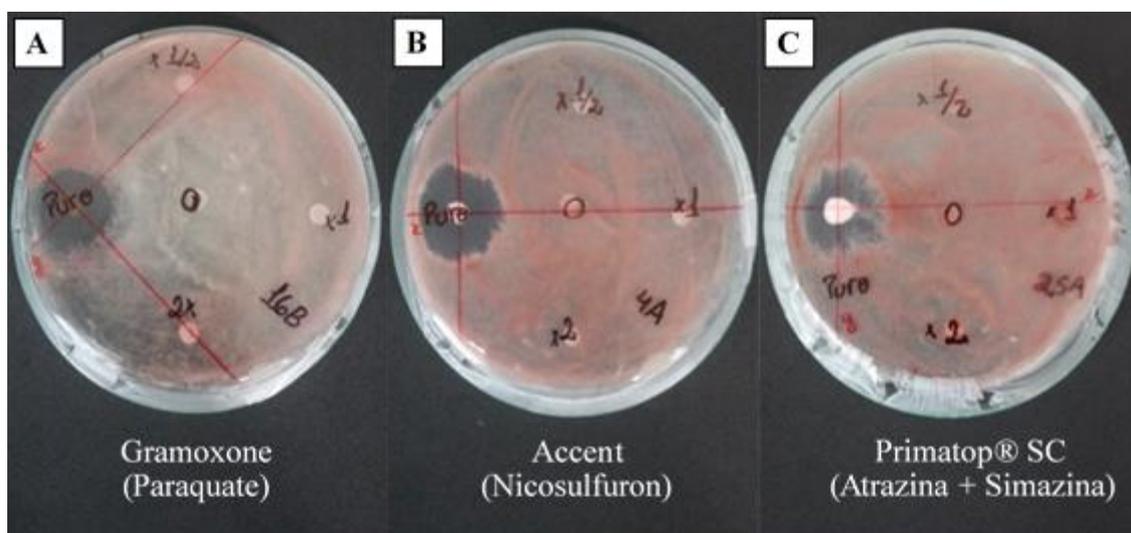


Figura 3. *T. koningiopsis* repicado em placas de Petri contendo discos embebidos com os herbicidas Paraquate (Gramoxone) e (A), nicosulfuron (B) e atrazina + simazina (C). O ponto de interseção entre as retas representa o disco embebido com o herbicida e, ao redor, em coloração preta, a formação do halo de inibição do crescimento fúngico. Erechim/RS, UFFS, 2019.

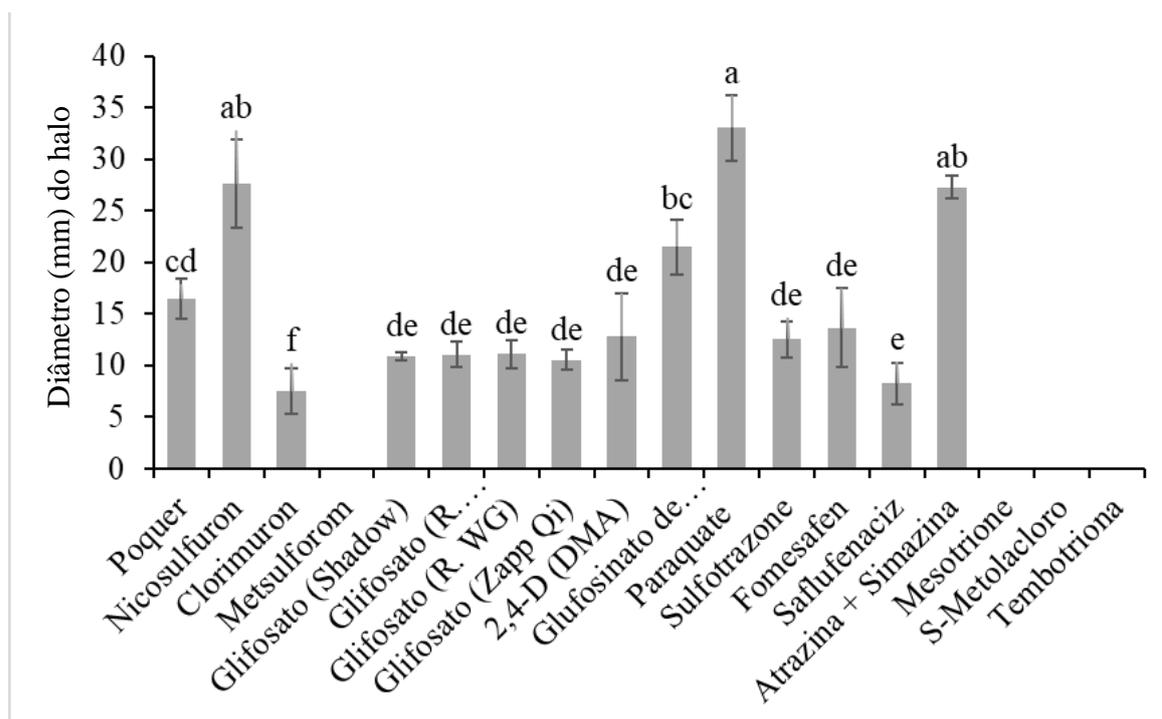


Figura 4. Diâmetro (mm) de halos inibitórios de crescimento de *T. koningiopsis* tratados com 18 diferentes herbicidas, com a aplicação do produto comercial sem diluição. Barras representam média \pm DP ($n = 3$). Erechim/RS, UFFS, 2019.

Por outro lado, os herbicidas Fomesafen (Flex®) (13,66 mm), 2,4-D (DMA) (12,84 mm), Sulfotrazone (Boral® 500 SC) (12,56 mm), Glifosato (Roundup WG) (11,10 mm), Glifosato (Roundup Original) (11,06 mm), Glifosato (Shadow) (10,89 mm), Glifosato (Zapp Qi® 620)0 (10,55 mm), Saflufenaciz (Heat) (8,28 mm) e Clorimuron (Classic) (7,47 mm) apresentaram halos e inibição inferiores a 14 mm, indicando uma baixa interferência no crescimento do fungo com o produto sem diluição (Tabela 3, Figura 4).

Mesmo com a aplicação do produto comercial sem diluição, não foram observados halos de inibição para os herbicidas Metsulfurorom (Ally), Mesotrione (Callisto), S-Metolacloro (Dual Gold) e Tembotriona (Soberan), demonstrando a alta resistência *T. koningiopsis* a esses produtos (Figura 3, Tabela 4).

A exposição de 0,5x, 1,0x e 2x da dose recomendada para cada herbicida não ocasionou a formação de halos de inibição do crescimento do fungo *T. koningiopsis* (Tabela 3, Figuras 4 e 5). Os dados corroboram com os resultados obtidos por Camargo et al. (2019), os quais verificaram visualmente a resistência do *T. koningiopsis* a altas doses de herbicidas 2,4-D (DMA), Glifosato e Glufosinato de amônio (Finale), sugerindo que esse fungo

apresente capacidade de adaptação ao meio contendo doses extremas de herbicidas químicos.

Apesar de não gerar halo de inibição, o herbicida Glufosinato de amônio (Finale), na dose recomendada (1x) causou um retardo no desenvolvimento do fungo *T. koningiopsis* (dados não mostrados). O mesmo ocorreu com 2x da dose recomendada para os herbicidas Accent (dados não mostrados), Clorimuron (Classic), Glufosinato de amônio (Finale) e Paraquate (Gramoxone) (Figura 5). Esse retardo no desenvolvimento caracteriza o fungo como moderadamente sensível à exposição destes herbicidas sintéticos.

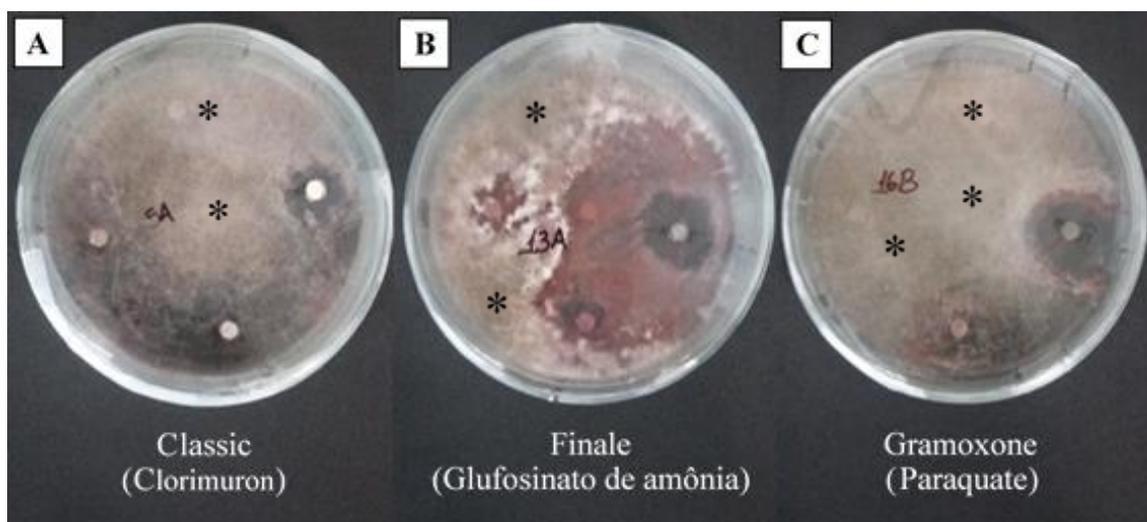


Figura 5. *T. koningiopsis* repicado em placas de Petri contendo discos embebidos com 2x da dose recomendada dos herbicidas Clorimuron (Classic) (A), Glufosinato de amônio (Finale) (B) e Paraquate (Gramoxone) (C). Asteriscos indicam o crescimento do fungo *T. koningiopsis*, com 7 dias de crescimento. Erechim/RS, UFFS, 2019.

Mesmo pela ausência de halos de inibição no crescimento do fungo *T. koningiopsis* com 0,5x, 1,0x e 2x da dose recomendada para cada herbicida, deve-se manter a cautela na associação do fungo com os produtos; uma vez que, de forma geral, a aplicação dos herbicidas é realizada com surfactantes. Os surfactantes podem potencializar ou anular os efeitos observados, podendo comprometer a eficácia do bio-herbicida a base de *T. koningiopsis*. Pier et al. (2019), por exemplo, verificaram que *A. alternata*, *B. cinerea*, *F. oxysporum* e *P. crustosum* tiveram o crescimento inibido quando expostos a concentrações de éster $\geq 1 \text{ mg mL}^{-1}$, os quais combinados com surfactantes reduzem a tensão superficial e melhoram a absorção dos herbicidas na superfície foliar.

No caso de produtos inibidores da enzima 5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintase (EPSPs), como Roundup WG e Roundp Original, diversos ingredientes inertes já estão adicionados a formulação do produto comercial, e mesmo assim, neste estudo não ocorreu

interferências no crescimento do fungo de forma considerável a ponto de evitar a sua associação. Ao contrário também pode ocorrer, o desenvolvimento do fungo pode ser beneficiado com a adição dos demais produtos comerciais, bem como a potencialização de seus efeitos dependendo da finalidade prevista.

Além da caracterização da inibição fúngica, a produção de bio-herbicidas requer a caracterização enzimática do biocomposto, além da otimização dos meios, como pH, temperatura, dentre outros. Estudos recentes dos grupos de pesquisa em Bioprocessos e Agroecologia da UFFS otimizaram e iniciaram a avaliação do bio-herbicida a base de *T. Koningiopsis* (Bordin et al. 2018; Reichert Júnior et al. 2019; Camargo et al. 2020).

O processo de obtenção de um herbicida natural é complexo, e poucos microrganismos serão potencialmente efetivos quanto um produto sintético. No entanto, a utilização combinada de um bio-herbicida e a menor dose de um herbicida sintético já é um passo importante para a redução do uso intensivo de agrotóxicos, e a degradação do meio por eles causada.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O *T. koningiopsis* demonstrou ser resistente a todos os herbicidas nas doses recomendadas (1x) e metade da dose recomendada (0,5x). Os tratamentos contendo 2x da dose recomendada, apesar de não alterar o crescimento após 7 dias de exposição, promoveram retardo no crescimento fúngico quando expostos aos herbicidas Accent, Clorimuron (Classic), Glufosinato de amônio (Finale) e Paraquate (Gramoxone).

O fungo apresentou sensibilidade aos herbicidas comerciais sem diluição (puro) Poquer (Cleotodin), Accent, Clorimuron (Classic), Glifosato (Shadow, Roundup Original, Roundup WG e Zapp Qi® 620), 2,4-D (DMA), Glufosinato de amônio (Finale), Gramoxone (Paraquate), Sulfotrazone (Boral® 500 SC), Fomesafen (Flex®), Heat e Atrazina + Simazina (Primatop® SC).

A resistência de *T. koningiopsis* demonstra que bio-herbicidas produzidos a base deste fungo podem auxiliar no controle de plantas daninhas, principalmente quando aplicado em combinação com herbicidas sintéticos. Essas informações permitem novos estudos sobre o comportamento do fungo *T. koningiopsis* e contribuem para futuros trabalhos que almejem reduzir o uso excessivo de produtos químicos e a contaminação ambiental gerada pelos agrotóxicos.

LITERATURA CITADA

- Bauer A.W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **America Journal of Clinical Pathology**, v.45, p.493-496, 1966.
- Bordin E.R. et al. Non-Toxic Bioherbicides Obtained from *Trichoderma koningiopsis* Can Be Applied to the Control of Weeds in Agriculture Crops. **Industrial Biotechnology**, v.14, n.3, p.157-163, jun. 2018. doi: <http://dx.doi.org/10.1089/ind.2018.0007>.
- Camargo, A.F. et al. Resistant weeds were controlled by the combined use of herbicides and bioherbicides. **Environmental Quality Management**, v. 29, n. 1, p. 37-42, 2019. doi: <https://doi.org/10.1002/tqem.21643>
- Camargo A.F. et al. A Low-Genotoxicity Bioherbicide Obtained from *Trichoderma koningiopsis* Fermentation in a Stirred-Tank Bioreactor. **Industrial Biotechnology**, 2020. doi: <https://doi.org/10.1089/ind.2019.0024>
- Druzhinina I.S., Kubicek C P., Komon-Zelazowska M. Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 9, n. 10, p. 753, 2008.
- Fernandes E.T., Favero S. Óleo essencial de *Schinus molle* L. para o controle de *Sitophilus zeamais* Most.1855 (Coleoptera: Curculionidae) em milho. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Rio de Janeiro, v.5, n.8, p.265-231, 21 out. 2014.
- Genbank. NCBI - National Center for Biotechnology Information. **Taxonomy Browser**. Disponível: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=29859>> Acesso em: 24 maio. 2019.
- Gliessman S.A. Interação entre agroecossistemas e ecossistemas naturais. **Agroecologia: processos ecológicos em Agricultura Sustentável**. Editora de UFRGS, p. 541-559, 2000.
- Ibama - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Produtos Agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil**. Brasília: Ibama, 2010, 84p.
- Klaic R. et al. **An overview regarding bioherbicide and their production methods by fermentation**. **Fungal Biomolecules**. 1ed.: John Wiley & Sons, Ltd, p. 183-199, 2015. <https://doi.org/10.1002/9781118958308.ch14>
- Moraes C. et al. Production of a bioherbicide agent in liquid and solid medium and in a biphasic cultivation system. **Planta Daninha**, v. 32, n. 2, p. 255-264, 2014. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582014000200002>
- Pier G.P. et al. Continuous production of eugenol esters using enzymatic packed bed microreactors and an evaluation of the products as antifungal agents. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 34, n. 3, p. 201-210, 2019. doi: <https://doi.org/10.1002/ffj.3492>
- Reichert Júnior F.W. et al. New perspectives for weeds control using autochthonous fungi with selective bioherbicide potential. **Heliyon**, v. 5, n. 5, p. e01676, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01676>
- Souza, A.R.C. et al. Selection, isolation, and identification of fungi for bioherbicide production. **brazilian journal of microbiology**, v. 48, n. 1, p. 101-108, 2017. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.09.004>

CAPÍTULO II

BIO-HERBICIDA ALTERNATIVO A BASE DE *Trichoderma koningiopsis*: CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA E EFEITO SOBRE PLANTAS DE PEPINO

ALTERNATIVE BIOHERBICIDE BASED ON *Trichoderma koningiopsis*: ENZYMATIC CHARACTERIZATION AND EFFECT ON CUCUMBER PLANTS

RESUMO - Estudos relacionados a métodos alternativos do controle de plantas daninhas na agricultura são importantes para produção de alimentos livres de resíduos de agrotóxicos. Dentre esses métodos alternativos, destaca-se a utilização de bioprodutos. Assim, o trabalho objetivou produzir e caracterizar um biocomposto a base de *Trichoderma koningiopsis*; avaliar o efeito fitotóxico e na morfologia de plantas de pepino (*Cucumis sativus*), como planta modelo; e estudar a ecotoxicidade do bioproduto em minhocas. O biocomposto foi produzido por fermentação submersa para obtenção do extrato bruto (EBt), solução filtrada com papel filtro (FilP) e com gaze (FilG) nos laboratórios de Agroecologia e de Bioprocessos da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* Erechim, RS. A partir do extrato bruto foi determinada a atividade das enzimas amilase, celulase, lipase e peroxidases totais, com 3 repetições. Dentre as enzimas avaliadas, observou-se alta concentração de peroxidases totais (44 U mL⁻¹). Os preparados do biocomposto EBt, FilP e FilG foram aplicados em plantas de pepino, de forma isolada e combinada com o herbicida comercial a base de glifosato potássico (Zapp Qi®). O experimento foi conduzido em casa de vegetação, com delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. O tratamento FilG ocasionou o controle de até 80% das plantas de pepino, 15 dias após a aplicação. Quando FilG foi combinado com o herbicida comercial, houve despigmentação total de 95% das folhas e mortalidade total das plantas de pepino. A avaliação de ecotoxicidade com minhocas (*Eisenia andrei*), não houve mortalidade quando os organismos foram expostos ao biocomposto; porém observou-se rejeição de 68% ao biocomposto filtrado com gaze e associado ao herbicida comercial.

Palavras-chave: atividade enzimática, biomassa fúngica, fitotoxicidade, *Cucumis sativus*, ecotoxicidade.

ABSTRACT – Studies related to alternative methods of weed control in agriculture are important for the production of food free of pesticide residues. Among these alternative methods, the use of bioproducts stands out. Thus, the work aimed to produce and characterize a bioherbicide based on *Trichoderma koningiopsis*; to evaluate the phytotoxic and morphological effects on cucumber plants (*Cucumis sativus*), as a model plant; and to study the ecotoxicity of the bioproduct in earthworms. The bioherbicide was produced by submerged fermentation to obtain the crude extract (EBt), filtered solution with filter paper (FilP) and gauze (FilG) in the Agroecology and Bioprocess laboratories of the Federal University of Fronteira Sul, *Campus* Erechim, RS. From the EBt, the activity of the enzyme's amylase, cellulase, lipase and total peroxidases was determined, with 3 replicates. Among the evaluated enzymes, a high concentration of total peroxidases (44 U mL⁻¹) was observed. The EBt, FilP and FilG bioherbicide preparations were applied to cucumber plants, isolated and combined with the commercial herbicide based on potassium glyphosate (Zapp Qi®). The experiment was carried out in a greenhouse, with a completely randomized design, with three replicates. The FilG treatment caused the control of up to 80% of the cucumber plants, 15 days after application. When FilG was combined with the herbicide glyphosate potassium, there was total depigmentation of 95% of the leaves, and mortality of more than 90% of the cucumber plants. The evaluation of ecotoxicity with earthworms (*Eisenia andrei*), there was no mortality when the organisms were exposed to the bioherbicide preparations; however, 68% rejection of the bioherbicide associated with potassium glyphosate was observed.

keywords: enzymatic activity, fungalbiomass, phytotoxicity, *Cucumis sativus*. ecotoxicity.

INTRODUÇÃO

Os bio-herbicidas são estudados desde a década de 70, porém o primeiro bio-herbicida registrado para uso comercial foi o DeVine®, nos Estados Unidos na década de 80 (revisado por Boyetchko et al. 2002). A formulação líquida era composta de clamidósporos de *Phytophthora palmivora*, recomendado para o controle de *Morrenia odorata* em citrus. Esse produto permitia taxas superiores a 90% no controle da planta daninha alvo, e poderia persistir por até 2 anos no ambiente (Li et al. 2003).

Apesar das mais de 4 décadas de estudos, em 2015, apenas 11 bio-produtos estavam disponíveis comercialmente. Porém no mercado brasileiro, atualmente ainda não há registro

de bio-herbicidas comerciais (AGROFIT 2021). Novos estudos são necessários devido o aumento de casos de resistência de diversas plantas daninhas, além da variedade de infestantes existentes que já não são mais eficientemente controladas por produtos sintéticos.

Os bio-herbicidas podem ser obtidos principalmente a partir de fungos. Diversos fungos ascomicetos e basidiomicetos foram descritos como fitotóxicos, como: *Trametes versicolor*, *Phellinus* sp., *Aureobasidium pullulans*, *Auricularia auricula*, *Botryosphaeria rhodina*, *Fusarium oxysporum*, entre outros (Osińska-Jaroszuk et al. 2015). Porém complexidade na produção de bio-herbicidas é dependente da ampla variação no metabolismo dos fungos (Mahapatra e Banerjee 2013; Kumaran et al. 2014).

A produção de produtos biológicos tem avançado nos últimos anos; porém, ainda é limitada pela falta de investimentos em pesquisa, e o alto custo de caracterização dos fungos e do processo de produção do bio-herbicida (Klaic et al. 2015). No processo de produção, a escolha do tipo de fermentação é crucial, e pode ser realizada em substrato sólido (Krauss et al. 2002; Moraes et al. 2014; Bastos et al. 2017), ou submersa (meio líquido) que também permite o crescimento de bactérias (Chen et al. 2003; Bo et al. 2019). No entanto, em ambos os processos, é importante a otimização dos parâmetros operacionais para posterior ampliação da escala de produção de biocompostos (Yang 2010; Kobori et al. 2015; Bordin et al. 2018; Coban e Sargin 2019).

Bordin et al. (2018), otimizaram os meios de cultivo para a produção de biocompostos a partir de *T. koningiopsis* em que foram observados maior crescimento e desenvolvimento do fungo pela biomassa fúngica e produção de enzimas, essas condições favoreceram a reprodução do biocomposto para subsequente aplicação na agricultura.

Diversos trabalhos têm avaliado o efeito de extratos produzidos a base de fungos e bactérias, como extratos produzidos a base de fungos como *Fusarium graminearum* (Bastos 2016) e *Diaporthe* sp. (Bastos et al. 2017), os quais causaram a redução do comprimento das raízes e crescimento da parte aérea e aumento da fitotoxicidade em plantas modelo muito sensíveis como o pepino (*Cucumis sativus*). Isso é percebido também em trabalhos com extrato de *Phoma* sp. (Brun et al. 2016) em plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*) e pepino. Souza et al. (2017) avaliaram 39 fungos e verificaram que um fungo do gênero *Diaporthe* apresentou maior atividade herbicida em plantas de pepino, e outras 27 cepas apresentaram algum sintoma de fitotoxicidade. O composto ativo extraído ($125 \mu\text{g mL}^{-1}$) da bactéria *Streptomyces anulatus* apresentou controle total das plantas daninhas de folha larga *Solanum*

nigrum e *Aeschynomene indica*, e 90% de controle da planta daninha da *Digitaria sanguinalis* (Bo et al. 2019).

A caracterização de um bio-herbicida deve, ainda ser avaliado quanto a possíveis impactos toxicológicos no meio. Ensaio ecotoxicológicos são comumente realizados através de testes de fugacidade, os quais envolvem a exposição de organismos edáficos, como minhocas, ao produto, para avaliar o efeito no ecossistema (Tarazona e Ramos-Peralonso 2014). O teste de fugacidade é caracterizado pela migração ou não dos organismos para o lado oposto, rejeitando o solo contaminado com o extrato (Basile 2008; Xavier 2020; Soares et al. 2020).

Assim o objetivo desse trabalho foi i) produzir um biocomposto a base de *T. koningiopsis*, e quantificar a atividade das enzimas e a biomassa fúngica no extrato bruto; ii) avaliar os efeitos do extrato bruto e com dois tipos de filtragem, aplicados de forma isolada ou combinada com um herbicida comercial, em plantas modelo de pepino, em condições de casa de vegetação; e iii) avaliar a ecotoxicidade dos preparados em minhocas como organismos não alvos pelo teste de fugacidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção e caracterização enzimática do biocomposto

O fungo *Trichoderma koningiopsis* (Código do Cadastro SISGEN - A8675F0), foi crescido em meio de cultura contendo ágar-batata-dextrose (39 g L^{-1}). Para a produção do biocomposto, foi utilizada metodologia conforme descrito por Souza et al. (2017) e meio de cultura otimizado por Bordin et al (2018), o que foi constituído por glicose ($3,00 \text{ g L}^{-1}$), peptona ($0,75 \text{ g L}^{-1}$) e extrato de levedura ($0,37 \text{ g L}^{-1}$).

O meio de cultura foi esterilizado em autoclave vertical (AV-75 Plus, Phoenix Lufesco, Brasil) a $121 \text{ }^\circ\text{C}$, por 20 min. Ao atingir a temperatura ambiente, na câmara de fluxo laminar (Biotec, Master Lab, Brasil), devidamente higienizada e esterilizada, uma pequena quantidade foi vertida para as placas de Petri contendo o microrganismo *T. koningiopsis* já isolado, os esporos do fungo foram raspados com o auxílio de uma alça de platina flambada em chama (concentração de esporos em uma placa de petri $6,2 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$), e após vertidos novamente para os Erlenmeyer.

As fermentações foram realizadas a uma temperatura de $28 \text{ }^\circ\text{C}$ em agitador orbital (120 rpm) (Starf FT38, Fortinox, Brasil), por 72 horas. Após esse período, a solução foi

filtrada para obtenção da biomassa fúngica e determinação da atividade das amilases, celulases, peroxidases e lipases.

Quantificação da biomassa fúngica

Para a quantificação da biomassa fúngica, 3 L do meio de cultura, foi previamente filtrado em papel filtro Quantitativo (JP40, Faixa Branca, Ø= 24 cm), e a massa do micélio seca a 40 °C em estufa (SOLAB, SL 100, Brasil), por 48 horas. A biomassa fúngica do microrganismo *T. koningiopsis* foi expressa em g L⁻¹.

Determinação da atividade enzimática nos biocompostos

A atividade das enzimas amilase, celulase, lipase e peroxidase foram determinadas nos extratos brutos fermentados.

Atividade enzimática de amilases

A atividade das enzimas amilases foi determinada conforme metodologia descrita por Fuwa (1954) e adaptada por Pongsawasdi e Yagisawa (1987). Amostras do extrato enzimático foram adicionadas à uma solução de amido diluído em tampão acetato 100 mM (1:100, m:V), pH 5,0, na proporção de 1:1. As amostras, em tubos de ensaio, foram mantidas em banho termostático com circulação interna (AL152/22, AmericanLab, Brasil), a 38 °C, por 10 min. A atividade das amilases foi então determinada pelo método de DNS (ácido dinitrossalicílico; Miller 1959). O extrato enzimático (extrato + solução de amido diluído) teve adição de igual volume de DNS. A solução foi mantida em banho termostático por 10 min, a 100 °C. Para o controle (branco), o extrato enzimático foi substituído por 1 mL de água destilada. O DNS atua como agente redutor, e a glicose formada foi quantificada, utilizando uma curva de glicose (0 a 1%), onde 0,5 mL da solução mais 0,5 mL de DNS foram adicionados em tubos de ensaio e mantidos em banho termostático por um período de 10 minutos a uma temperatura de aproximadamente 100 °C. Para o controle (branco), o extrato enzimático foi substituído por 1 mL de água destilada. Após 10 minutos, os tubos de ensaio foram adicionados ao banho de gelo até atingirem a temperatura ambiente, e neste momento foram adicionados 8 mL de tartarato de sódio para posterior leitura em espectrofotômetro UV-VIS a 540 nm (Cirrus 80, FEMTO, Brasil). A atividade da amilase foi calculada baseada em uma curva de glicose e expressa em U mL⁻¹.

Atividade enzimática de celulases

Para a determinação da atividade das enzimas celulases foi seguido o proposto por Ghose (1987). Dessa forma, foi pesados aproximadamente 50 mg (7 cm²) de papel filtro Whatman número 1, responsável pela fonte de celulose. Os mesmos foram adicionados a tubos de ensaio contendo 2 mL de tampão acetato 0,2 M, pH 5,5. Após, 1 mL da solução enzimática foi adicionada aos tubos de ensaio, e foram mantidos em banho termostático a uma temperatura de 50 °C por um período de 1 hora. No controle, a solução enzimática foi substituída por 1 mL de água destilada.

A liberação de açúcares redutores vai ser determinada pelo método de ácido dinitrossalicílico (DNS), descrito por Miller (1959). A medida de atividade das enzimas celulases foi realizada pela Equação 1:

$$ABS = 0,2672 * [] ART$$

$$\text{Logo: } [] ART = ABS/0,2672 \quad \text{Equação (1)}$$

Onde: ART corresponde aos açúcares redutores totais.

ABS corresponde as leituras de absorbância

A atividade da amilase foi calculada baseada em uma curva de glicose e expressa em U mL⁻¹.

Atividade enzimática de lipases

A medida de atividade das enzimas lipases foi determinada de acordo com o proposto por Treichel et al. (2016), onde 1 mL da solução enzimática foi pipetado em 9 mL de emulsão. A emulsão foi composta por 5% (v/v) de goma arábica, 10% (v/v) de óleo de oliva e tampão fosfato 100 mM, pH 6,0, a mistura foi homogeneizada com o auxílio de um mixer. Posteriormente, os béqueres contendo a solução foram levados ao agitador orbital por 32 minutos a uma temperatura de 35 °C e 165 rpm. Para cessar a reação, depois de retirados do agitador orbital, foram adicionados 10 mL da solução acetona etanol (1:1, v/v). Eles foram titulados, adicionando-se hidróxido de sódio (NaOH) 0,049 M até a solução atingir pH 11. O controle (branco reacional) foi composto por 9 mL de emulsão, 10 mL de acetona etanol, e 1 mL da enzima, porém ele não foi levado ao agitador orbital. A atividade da lipase foi calculada pela molaridade do hidróxido de sódio, conforme a equação 2, e expressa em U mL⁻¹.

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

Equação (2)

Onde: $\bar{A}a$ = média dos valores observados; Vb = valor apresentado pelo controle; $MNaOH$ = molaridade do Hidróxido de sódio; t = tempo de reação; Vc = volume enzimático utilizado.

Atividade enzimática de peroxidases

Para determinar a atividade das enzimas peroxidases vai ser seguido o proposto por Khan e Robinson (1994), onde foi necessário preparar um meio reacional, em tubos de ensaio, contendo 1,5 mL de tampão fosfato 5 mM, pH 5,0; 2 mL de água destilada; 0,5 mL de guaiacol (1%) e 1 mL de peróxido de hidrogênio (8%). O meio reacional foi exposto a banho termostático por um período de 10 minutos a uma temperatura de 35 °C. Após a estabilização da temperatura foi adicionado 1 mL do extrato enzimático ao meio reacional, mantendo-o por 20 minutos em banho termostático. O controle (branco) deverá ser preparado nas mesmas condições, porém o extrato enzimático foi substituído por água destilada. A leitura de absorvância foi realizada em espectrofotômetro UV-VIS (Cirrus 80, FEMTO, Brasil), 470 nM. O cálculo da medida de atividade foi realizado através da média dos valores da triplicata multiplicado por 100.

Avaliação do efeito bio-herbicida em plantas de pepino

Devido á testes preliminares não bem sucedidos com o bio-produto filtrado com papel filtro, para avaliação do efeito bio-herbicida do composto produzido, utilizou-se o extrato bruto (EBt; não filtrado), extrato filtrado com papel filtro (FilP) e extrato filtrado com gaze (FilG), além da combinação dos extratos com o herbicida comercial (Zapp Qi®, dose de 1,5 L ha⁻¹) O experimento foi conduzido na casa de vegetação da Agroecologia da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* Erechim/RS. Sementes de pepino (*Cucumis sativus*, variedade *Pickling cucumber* “SMR 58”) foram semeadas em vasos de 0,5 dm⁻³ contendo substrato composto por cama de aviário e humus (1:1). A análise de solo está apresentada na Tabela 1. As plantas foram irrigadas diariamente com sistema de irrigação automática.

Tabela 1. Análise química do substrato contendo cama de aviário e humus (1:1) utilizado no experimento com biocomposto a base de *T. koningiopsis* in cucumber plants. Coxilha/RS, 2020.

pH	MO	P	H+Al ³⁺	K ⁺	Ca ⁺²	Mg ⁺²	T	V
CaCl ₂	g dm ⁻³	mg dm ⁻³	----- cmolc dm ⁻³ -----					%
--	21,3	>50,0	0,96	>400	17,00	>8,00	6,24	96,66

MO = matéria orgânica; T = capacidade de troca catiônica; V = porcentagem de saturação de bases.

Os tratamentos utilizados consistiram na aplicação do extrato bruto (EBt), extrato filtrado com filtro de papel (FitP) e extrato filtrado com gaze (FilG), e da aplicação combinada dos extratos com o herbicida comercial (HC; Zapp Qi®, 1,5 L ha⁻¹; Syngenta, Reino Unido). Em paralelo, foram avaliados dois tratamentos controle negativos: aplicação apenas de água (TestA) e contendo apenas o meio de cultivo da fermentação fúngica (TestMC); e como controle positivo a aplicação isolada do HC. As aplicações dos tratamentos ocorreram aos 10 dias após a emergência (DAE), sob pulverização foliar com borrifador manual (\pm 3 mL do produto por planta). Com exceção do extrato bruto que foi pincelado sobre as folhas.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 9 tratamentos (EBt, FilP, FilG, EBt+HC, FilP+HC, FilG+HC, TestA, TestMC e HC), 10 repetições, totalizando 90 unidades experimentais. Cada unidade experimental foi constituída por uma planta.

Características Visuais

Para a avaliação do efeito fitotoxicidade das plantas foram realizadas avaliações visuais aos 15 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT). Registros fotográficos (13 MP) das folhas foram realizados para determinação da proporção da área foliar com injúrias (%) verificada pelo programa Compu Eye, Leaf & Symptom Area (Bakr 2005) A partir desses valores, utilizou-se a escala percentual (0% para ausência de fitotoxicidade a 100% para a morte completa das plantas) conforme metodologia descrita por Frans e Crowley (1986) e pela Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas (SBCPD, 1995), como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Escala percentual de fitotoxicidade em relação às injúrias foliares apresentadas pelas plantas de pepino. Erechim/RS, 2020.

%	DESCRIÇÕES DAS CATEGORIAS PRINCIPAIS	DESCRIÇÃO DETALHADA DA FITOTOXIDADE NA CULTURA
0	Sem efeito	Sem injúria ou redução
10		Leve descoloração ou atrofia
20	Efeito leve	Alguma descoloração ou atrofia, ou perda por atrofia
30		Injúria mais pronunciada, mas não duradoura
40		Injúria moderada, mas normalmente com recuperação
50	Efeito moderado	Injúria mais duradoura, recuperação duvidosa
60		Injúria duradoura, sem recuperação
70		Injúria pesada, redução de estande
80	Efeito severo	Cultura próxima da destruição (poucas sobreviventes)
90		Raramente restam algumas plantas
100	Efeito total	Destruição completa da cultura

Características Morfológicas

As características morfológicas foram avaliadas aos 15 DAT para obtenção da altura da planta (AP, cm), diâmetro do caule (DC, mm), número de folhas (NF), e comprimento da maior raiz (CMR, cm). Para obtenção da massa seca de folhas (MSF, g), massa seca de raiz (MSR, g), e massa seca total (MST, g), o material vegetal (folhas, caules e raízes) foram secos em estufa de circulação forçada de ar (400-5ND, Ethik Technology, Brasil), a 65 °C, até atingir peso constante.

A mortalidade de plantas (MP, %) foi avaliada aos 15 DAT, calculada conforme a equação 3. A mortalidade foi determinada para plantas com estrutura distendida através da coloração predominantemente de necrose e clorose; e que permaneceram com o corpo completamente distendido após este período.

$$MP (\%) = n^{\circ} \text{ de plantas mortas} / n^{\circ} \text{ total de plantas} \times 100$$

Equação (3)

Ecotoxicidade

Criação dos organismos

Minhocas da espécie *Eisenia andrei*, popularmente conhecida como minhoca australiana, foram selecionadas por serem organismos modelo para teste de fuga (Azevedo e Coronas 2018), apresentarem elevada sensibilidade a substâncias químicas, boa representatividade no solo e de fácil cultivo laboratorial. Os organismos foram obtidos

comercialmente e mantidos em recipientes contendo latossolo vermelho aluminoso férrico. Para a recriação dos organismos, preparou-se o solo artificial tropical (SAT) com 75% de areia, 20% de argila (caulim) e 5% de fibra de coco (peneirada em peneira de 2 mm), de acordo com Garcia (2004). O pH foi ajustado para $6,0 \pm 0,5$, a umidade inicial correspondente a 60% da capacidade máxima de retenção de água do solo, e temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ conforme as especificações da ISO 11.268-2 (ISO 2012) para recriação de organismos.

As minhocas foram então selecionadas de acordo com os seguintes critérios: minhocas adultas (com clitelo aparente), idade entre 2 meses a um ano e peso corporal entre 250 mg e 550 mg por indivíduo. Para a multiplicação e manutenção, as minhocas foram selecionadas e acondicionadas em caixas plásticas ($7,0 \text{ dm}^3$) contendo tampas perfuradas para a troca de gases. Cada caixa recebeu 500 g de substrato composto por esterco equino seco (peneirado, 2,0 mm) e pó de fibra de coco seco (2:1). Posteriormente foi adicionado água destilada e o pH do substrato para 5,5 - 6,0, para ser inseridas cerca de 300 minhocas adultas em cada caixa, em um total de 3 caixas. As minhocas foram alimentadas semanalmente com uma mistura de aveia cozida em flocos grossos e água destilada na proporção de 1:1 (v/v). As caixas foram mantidas em ambiente com temperatura de $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, e fotoperíodo de 12/12h (luz/escuro).

Teste de Fugacidade

Os ensaios de fuga foram realizados de acordo com a ISO 17.512-1 (ISO 2008). Esse tipo de ensaio é um ensaio subletal rápido que indica a presença de contaminantes em solos pelo comportamento de minhocas adultas, como *E. andrei*, que se movimentam em direção do solo sem contaminantes quando identifica um solo contaminado. Os ensaios de fuga foram realizados em caixas plásticas (16,7 cm x 11,5 x 6,1, c x l x a), contendo um divisor de plástico rígido, inserido verticalmente no centro da caixa. Em um lado foi adicionado 250 g de solo SAT contendo as soluções FilG (100%), FilG+HC [Zapp Qi® ($1,5 \text{ L ha}^{-1}$)], com 5 repetições. No outro lado, o substrato foi umedecido com água destilada, como controle. Para os ensaios, 10 minhocas adultas previamente lavadas com água destilada foram colocadas sobre a divisão central (na ausência do divisor). Os recipientes foram fechados com tampas perfuradas para permitir as trocas gasosas e mantidos isolados por 48 h. Após esse período, foi contabilizado o número de indivíduos presentes em cada substrato. Os valores de pH e umidade do solo foram determinados no início e ao final dos testes, para todas as caixas utilizadas.

Análise estatística

Para a análise dos dados de atividade enzimática, biomassa fúngica e ecotoxicidade foi realizada a análise de variância (ANOVA), seguida pela comparação de médias pelo teste de Tukey. Os dados de fitotoxicidade foram transformados em $\arcsen \sqrt{(x + 0,5)}$, para correção da heterocedasticidade, seguido pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Todas análises estatísticas foram realizadas considerando o nível de significância de 5%, com auxílio do software Statistica 10.1 (StatSoft Inc., USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização enzimática do biocomposto

Na Tabela 3 estão representadas as quantificações de biomassa fúngica (g L^{-1}) e atividade das enzimas (U mL^{-1}) de amilase, celulase, lipase e peroxidase no extrato bruto gerado a partir de *T. koningiopsis*. A coloração vermelha-arroxeadada do extrato representou a atividade metabólica e saudável na produção de micélios fúngicos.

Tabela 3. Biomassa fúngica (g L^{-1}) e atividade das enzimas (U mL^{-1}) de amilase, celulase, lipase e peroxidase no extrato gerado a partir de *T. koningiopsis*. Erechim/RS, UFFS, 2020.

Biomassa	$3,68 \pm 0,0$
Amilase	$0,11 \pm 0,0$
Celulase	$0,07 \pm 0,0$
Lipase	$1,7 \pm 0,1$
Peroxidase	$44,0 \pm 0,0$

Dados representam médias \pm DP ($n = 3$).

Foi observado uma produção de $3,68 \text{ g L}^{-1}$ da biomassa fúngica, valores similares aos obtidos por Camargo et al. (2020). Por outro lado, Klaic et al. (2014) utilizaram alta concentração do meio com glicose (20 g L^{-1}), peptona (20 g L^{-1}) e extrato de levedura ($7,5 \text{ g L}^{-1}$), o que permitiu uma biomassa máxima de 22 g L^{-1} (Klaic et al., 2014). Em sistemas de biorreatores, também utilizando meio submerso, Coban & Sargin (2019) verificaram que o meio contendo 8 g L^{-1} de glicose favorecendo a produção de biomassa do fungo *Trichoderma harzianum* $17 \pm 2 \text{ g L}^{-1}$.

No entanto, a alta atividade enzimática é mais determinante no potencial bio-herbicida em comparação à produção de biomassa fúngica (Bordin et al. 2018). Os autores verificaram o maior potencial fitotóxico (90%) na área foliar de *Euphorbia heterophylla*, com meio de cultura com baixa biomassa fúngica ($1,85 \text{ g L}^{-1}$), porém alta atividade das enzimas amilase e celulase, principalmente, em relação aos demais meios testados.

A atividade das enzimas amilase e celulase no extrato bruto de *T. koningiopsis* foram de $0,11 \text{ U mL}^{-1}$ e $0,07 \text{ U mL}^{-1}$, respectivamente. Segundo Faria (2020), a glicose influencia na produção de celulases, visto que altas concentrações de glicose reprimem a atividade dessas enzimas.

As peroxidases totais apresentaram atividade de 44 U mL^{-1} , valores similares aos obtidos por Camargo et al. (2020) e $1,7 \text{ U mL}^{-1}$ para a atividade das lipases. A alta atividade de peroxidases pode ocasionar redução na atividade de amilases e celulases. Além disso, as peroxidases presentes no biocomposto atuam na estrutura dos polissacarídeos que constituem a parede celular vegetal, causando estresse e danos nas plantas (Stefanski et al. 2020).

Bordin et al. (2018) reforçam ainda, que, mesmo tendo picos baixos na produção de algumas enzimas, do ponto de vista econômico, a produção do biocomposto ainda é vantajosa pelos teores encontrados de enzimas que potencializam o efeito bio-herbicida.

Efeito bio-herbicida em plantas de pepino

O biocomposto a base de *T. koningiopsis* causou severa fitotoxicidade nas plantas de pepino aos 15 DAT (Figuras 1 e 2, Tabela 2).



Figura 1. A) Tratamento com biocomposto de *T. koningiopsis* em plantas de pepino, método de filtragem do biocomposto, em que, T: testemunho com água (3 mL planta⁻¹), 1: extrato filtrado com papel filtro (3 mL planta⁻¹), 2: extrato filtrado com gaze (3 mL planta⁻¹); 3: extrato bruto (3 mL planta⁻¹); C: controle negativo com meio de cultivo (3 mL planta⁻¹), 4: extrato filtrado com papel filtro + herbicida comercial (3 mL planta⁻¹ + HC: Zapp Qi®, na dose de 1,5 L ha⁻¹), 5: extrato filtrado com gaze + herbicida comercial (3 mL planta⁻¹ + HC: Zapp Qi®, na dose de 1,5 L ha⁻¹); e 6: extrato bruto + herbicida comercial (3 mL planta⁻¹ + HC: Zapp Qi®, na dose de 1,5 L ha⁻¹); B) Injúria em plantas de pepino com tratamento de extrato filtrado com gaze, sintomas característicos do fungo pela necrose do tecido foliar. Erechim/RS, UFFS, 2020.

Foram observados sintomas de leve despigmentação (LD), amarelecimento (AMR), clorose (CL) e necrose (NC), e despigmentação total (TD) das folhas de pepino expostas aos tratamentos as diferentes filtragens do biocomposto e com a aplicação combinada do biocomposto com o herbicida comercial (Figura 2). Esses sintomas também foram observados por outros autores em plantas de pepino, descritos por manchas foliares e amarelecimento das plantas após aplicação do biocomposto produzido a base de *Diaporthe* sp. (Souza et al. 2017), além do branqueamento das folhas quando em contato com composto produzido a partir do fungo *Phoma* sp. (Klaic et al. 2015).

Os sintomas de LD foram observados, em média, em 38,9% da área foliar no controle positivo (HC), e em todos os tratamentos com o biocomposto e biocomposto+HC (Tabela 4). O AML ocorreu com maior intensidade (~26,9%) nos tratamentos contendo o herbicida comercial (HC, EBt+ HC, FilP+HC, FilPG+HC), em relação aos tratamentos contendo apenas o biocomposto (EBt, FilP, FilG), os quais apresentam, em média 15,9% de amarelecimento nas folhas de pepino. Além do amarelecimento, aspecto de mucha foi

relatado em plantas de *Curcuma wenyujin* (Qian et al. 2013) e em *Euphorbia heterophylla* (Reichert Júnior et al. 2019), após o tratamento com biomcompostos fúngicos.

Sintomas de clorose (CL) foram observados principalmente nos tratamentos com HC (34,6%) e EBt+HC (31,6%), sendo inferior a 9% nos demais tratamentos, e praticamente ausente nos tratamentos FilP (0,5%) e FilP+HC (0,3%) (Tabela 4). Já a necrose foi mais evitende nos tratamentos contendo EBt (25,2%), FilG (22,2%) e FilG+HC (19,6%). A necrose promove um dano irreversível nas folhas, o que também foi verificado em plantas de *E. heterophylla* expostas a um biocomposto fúngico (Camargo et al. 2020).

Os sintomas acima descritos ocasionaram uma despigmentação total das folhas de pepino entre 92 e 100% para os tratamentos EBt, FilG+HC, EBt+HC, HC; e entre 52,7 a 81,4% para os tratamentos com FilP, FilG e FilP+HC (Tabela 4). Isso ocasionou uma reduzida área sadia das folhas de pepino, inferior a 8% para os tratamentos com EBt, FilG+HC e EBt+HC, chegando a 0% com a aplicação de HC.

Apesar de diferentes estudos envolvendo sintomas visuais com a aplicação de biocomposto a base de fungos (Klaic et al. 2015, Souza et al. 2017, Bordin et al. 2018, Reichert Júnior et al. 2019, Camargo et al. 2019, 2020, Stefanski et al. 2020), esse é o primeiro estudo avaliando o percentual de injúrias causados nas folhas após a aplicação de um biocomposto a base de *T. koningiopsis*. Cabe destacar ainda que outros trabalhos já reportaram a correlação positiva entre a ocorrência de fitotoxicidade e a atividade das peroxidases (Morra et al. 2018; Yu and Zhang 2013), como observado neste presente estudo.

**Fitotoxicidade
*C. sativus***

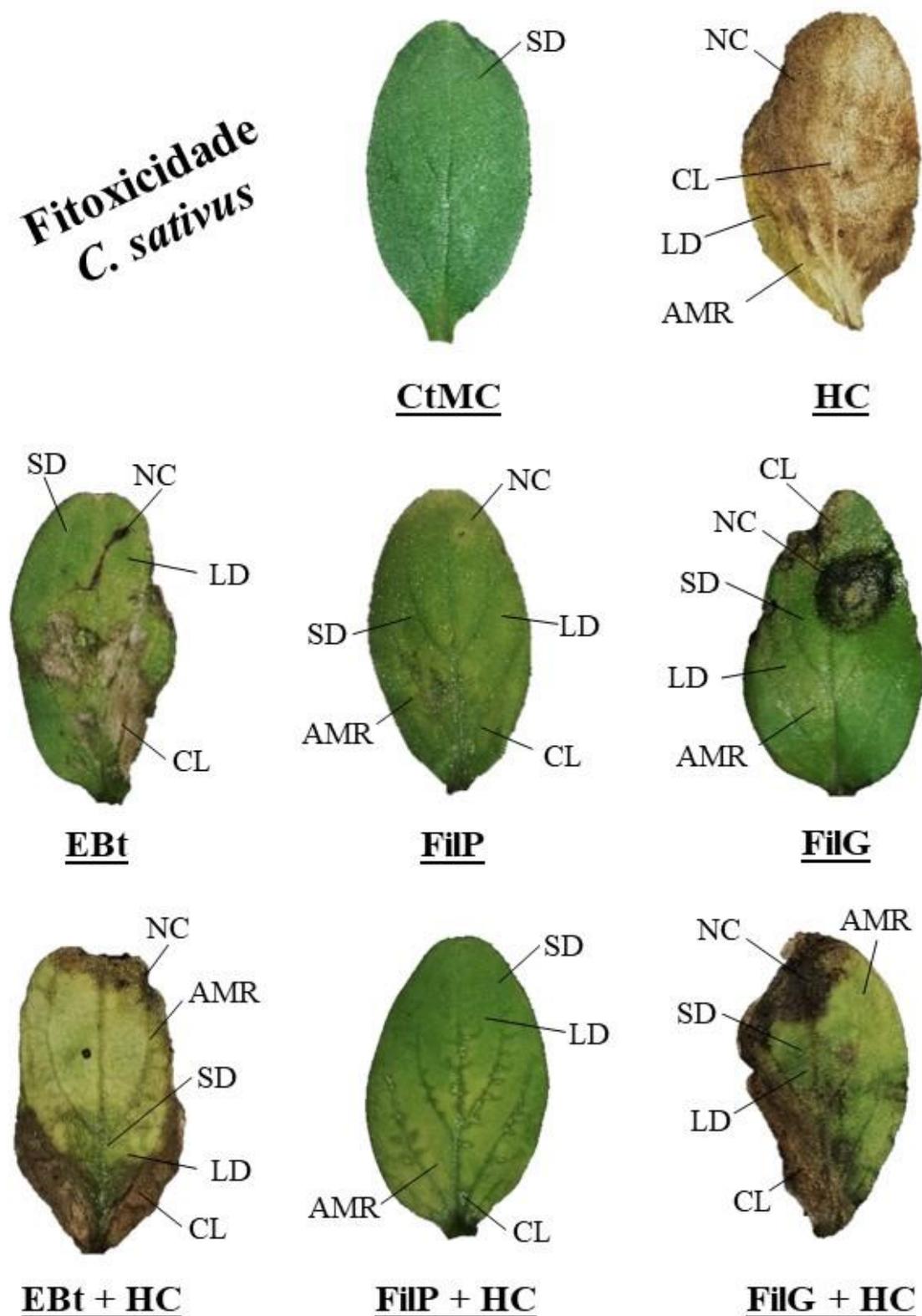


Figura 2. Folhas de pepino (15 DAT) tratadas com meio de cultivo (controle negativo), herbicida comercial (HC, controle positivo), extrato bruto (EBt) de *T. koningiopsis*, extrato filtrado com papel filtro (FilP), extrato filtrado com gase (FilG), e os extratos combinados com o herbicida comercial (Zapp Qi® Qi, 1,5 L ha⁻¹): Ebt+HC, FilP+HC e FilG+HC. SD, área sadia; LD, leve despigmentação, AML, amarelamento; CL, clorose; NC, necrose; despigmentação total (DT). Erechim, RS, UFFS, 2020.

A área sadia das plantas diferiu entre os tratamentos aplicados, sendo de 47,23% para FilP, 26,92% para FilG, 8,05% para EBt e 0% para o herbicida comercial (HC) (Tabela 4). Em estudos como o de Toderó et al. (2019), também na planta do pepino, essas porcentagens são verificadas para considerar os efeitos fitotóxicos com bio-herbicidas produzidos com fungos, porém na literatura com o *T. koningiopsis*, até agora, não há esse tipo de análise visual para comparação dos dados.

Tabela 4: Percentual de sintomas de fitotoxicidade visual foliar. Leve despigmentação (LD), amarelamento (AML), clorose (CL), necrose (NC), despigmentação total (DT) e área sadia (SD) em plantas de pepino (*Cucumis sativus*), tratadas com bio-herbicida de *Trichoderma koningiopsis*, sob diferentes filtragens e combinado com o herbicida comercial Zapp Qi® (HC, 1,5 L ha⁻¹), aos 15 dias após a aplicação dos tratamentos. Os controles negativo e positivo continuam apenas meio de cultivo usado na fermentação de *T. koningiopsis* e herbicida comercial, respectivamente. UFFS, Erechim, RS, 2020.

Ensaio	Percentual de Sintomas (%)					
	LD	CL	NC	AML	DT	SD
Controle negativo (Meio de cultivo)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	100
Controle positivo (Herbicida)	37,9	34,6	2,8	24,5	100	0,00
Extrato Filtrado Papel	28,6	0,5	3,8	19,7	52,7	47,2
Extrato Filtrado Gaze	33,2	1,8	22,2	15,7	73,0	26,9
Extrato Bruto	45,8	8,4	25,2	12,3	91,9	8,0
Extrato Filtrado Papel + HC	49,5	0,3	0,00	31,6	81,4	18,5
Extrato Filtrado Gaze + HC	43,3	6,0	19,6	26,1	95,1	4,8
Extrato Bruto + HC	34,2	31,6	7,9	25,3	99,2	0,7

Acompanhado dos sintomas de fitotoxicidade, a aplicação dos bio-herbicidas e/ou combinação com o herbicida comercial ocasionaram alterações nas características morfológicas de plantas de pepino. A altura das plantas de pepino foi reduzida, em média, 63% para os tratamentos contendo o herbicida comercial (EBt+HC, FilP+HC, FilG+HC e HC), em relação ao controle com meio de cultura (CtMC) (Tabela 5). As maiores reduções no diâmetro do caule foram verificadas nas plantas tratadas com EBt_HC (22%) e FilG+HC (39%), as quais tiveram praticamente 100% de redução no número de folhas e reduzido valor de MSF (0,05 g). Por outro lado, os tratamentos EBt e HC não alteraram significativamente o NF, porém reduziram em 71,4% a MSF, em relação ao tratamento com meio de cultura (CtMC) (Tabela 5).

As alterações observadas no desenvolvimento foliar são proporcionais aos sintomas visuais de fitotoxicidade verificadas nas plantas de pepino. Um dos principais fatores

limitantes à eficácia de bio-herbicidas é a limitação na absorção foliar pela cutícula da face adaxial, quando esta é muito espessa (Ferreira et al. 2003; Magiero 2009). Assim, plantas modelo, como o pepino, com cutícula fina e baixo teor de cera epicuticular permitem uma caracterização mais precisa do efeito bio-herbicida do composto. As alterações desenvolvimento da parte aérea das plantas de pepino corroboram, ainda com os danos foliares de 67% e 75% causados por extrato a base de *T. koningiopsis* aos 7 e 15 dias após a aplicação do tratamento, respectivamente (Cavalcante et al. 2021). O que confirma o extrato de *T. koningiopsis* como potencial bio-herbicida.

A aplicação de bio-herbicidas naturais pode, ainda, ocasionar alterações desde o desenvolvimento do hipocótilo e raiz primária das plantas, como observado por Stefanski et al. (2020). Os autores verificaram que o extrato de *T. koningiopsis* produzido com substrato contendo microalgas, em condições de temperatura e agitação mais próximas ao nosso experimento, apesar de permitir 99% de germinação, causaram reduções de 91 e 59% no comprimento do hipocótilo e da raiz primária de plântula de pepino, respectivamente.

Mesmo com a aplicação pós emergência (10 DAE) dos diferentes tratamentos contendo o extrato de *T. koningiopsis*, foi possível observar redução significativa no sistema radicular das plantas de pepino. O comprimento radicular foi reduzido principalmente para os tratamentos EBt+HC e FilG+HC (~71%), seguido pelos tratamentos HC (66%), EBt (62%) e FilP+HC (59%), em relação ao controle positivo contendo meio de cultura (CtMC). (Tabela 5). Extratos de *Fusarium graminearum* causaram redução de 100% do CR de *C. sativus* aos 21 dias após a aplicação do tratamento (Bastos et al., 2017). Isso demonstra que o maior tempo de atuação do extrato sobre a planta pode aumentar a eficácia como bio-herbicida, como também observado por Cavalcante et al. (2021).

Tabela 5. Altura de planta (AP, cm), diâmetro do caule (DC, mm), número de folhas (NF), massa seca da folha (MSF, g), comprimento da maior raiz (CR cm), massa seca da raiz (MSR, g), massa seca total (MST, g), e mortalidade de plantas (MP, %) de pepino após 15 dias da aplicação dos tratamentos: água (CtA, controle negativo), meio de cultivo utilizado na fermentação do bio-herbicida a base de *T. koningiopsis* (CtMC, controle negativo), extrato bruto do bio-herbicida não filtrado (EBt), bio-herbicida filtrado com papel filtro (FilP), bio-herbicida filtrado com gaze (FilG), e a combinação do herbicida comercial (HC; Zapp Qi®, 1,5 L ha⁻¹) com EBt (EBt+HC), FilP (FilP+HC), FilG (FilG+HC) e apenas o HC (controle positivo). UFFS, Erechim, RS, 2020.

Tratamento	AP	DC	NF	MSF
CtA	87,7±11,7 ¹ a ²	5,61±0,3a	2,2±0,4ab	0,11 ± 0,01ab
CtMC	80,8±12,8a	5,33±0,3a	2,4±0,5a	0,14 ± 0,03a
EBt	36,4±9,1b	4,46±0,4ab	2,2±0,4ab	0,04 ± 0c
FilP	72,1±22,0a	4,94±0,6a	2,0±0ab	0,1 ± 0,04ab
FilG	43,7±5,6b	4,58±0,8ab	2,0±0ab	0,06 ± 0c
EBt+HC	28,3±3,5b	4,16±0,3ab	0,0± 0 c	0,05 ± 0,01c
FilP+HC	30,7±13,5b	4,39±0,3ab	0,0± 0 c	0,08 ± 0,01bc
FilG+HC	21,99±13,5b	3,27±1,8b	1,2±0,0b	0,05 ± 0,03c
HC	29,2±5,5b	4,45±0,1ab	2,6±0,5a	0,04 ± 0c
	CR	MSR	MST	MP
CtA	28,2±0,5ab	0,014±0,003a	0,170±0,02a	0 % d
CtMC	32,0±2,3a	0,015±0,003a	0,208±0,04a	0 % d
EBt	12,2±1,4cd	0,004±0,006c	0,052±0,01b	80 % c
FilP	27,5±1,0ab	0,011±0,002ab	0,151±0,06a	40 % cd
FilG	19,7±5,4bc	0,007±0,001bc	0,080±0,00b	80 % c
EBt+HC	9,3±3,1d	0,002±0,002c	0,061±0,01b	100 % a
FilP+HC	13,2±2,3cd	0,003±0,004c	0,093±0,01b	90 % b
FilG+HC	9,3±2,5d	0,003±0,002c	0,060±0,03b	100 % a
HC	10,8±0,5cd	0,002±0,001c	0,047±0,00b	90 % b

¹Dados representam média ± DP (n = 5). ²Médias seguidas de letras iguais, dentro de cada coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

A produção de MSR foi severamente alterada pelos tratamentos, com maiores reduções para EBt+HC e HC (~87%), FilP+HC e FilG+HC (~80%) e EBt (73%), em relação ao CtMC (Tabela 5). Os efeitos observados na MSR contribuíram para a redução de, em média, 74% na MST de plantas de pepino tratadas com EBt, EBt+HC, FilG+HC e HC.

O potencial bio-herbicida do extrato a base de *T. koningiopsis* foi corroborado com os dados de mortalidade de plantas. Mesmo para as plantas de pepino tratadas com FilP, que apresentaram as menores reduções no desenvolvimento das plantas, tiveram mortalidade de 40% após 15 dias da aplicação. Os tratamentos EBt e FilG causaram 80% de MP, seguido pelos tratamentos FilP+HC e HC, com 90% MP, e EBt+HC e FilG+HC com 100% de mortalidade (Figura 5).

Os efeitos do *T. koningiopsis* sobre as plantas apresenta grande importância agrônômica, uma vez que fungos desse gênero atuam como decompositores primários de

matéria orgânica, e se destacam pelo rápido crescimento, esporulação profusa, capacidade de crescimento em diferentes substratos e tolerância a compostos nocivos (Kubicek et al. 2003, Howell 2003, Harman et al. 2004). Pode-se observar que, tanto os extratos a base de biomcompostos (EBt e FilG), quanto todos os tratamentos em combinação com o herbicida comercial causaram alta taxa de mortalidade (> 80%) nas plantas de pepino. O controle total das plantas foi verificado pelos tratamentos EBt+HC e FilG+HC, o que indica que, mesmo com a utilização de herbicida comercial, o uso de bio-herbicidas já reduziria o uso intensivo dos herbicidas sintéticos e, portanto, a possível contaminação ambiental gerada.

Ecotoxicidade

Devido ao alto controle das plantas de pepino com os tratamentos FilG+HC, além do filtrado poder ter a escala ampliada, e uma maior facilidade de aplicação, os testes de fuga foram realizados com este tratamento.

Os resultados para o teste de fuga, realizado com o bio-herbicida a base de *T. koningiopsis* (FilG) e FilG combinado com o herbicida comercial (HC; Zapp Qi®, 1,5 L ha⁻¹) (FilG+HC), sobre as minhocas da espécie *Eisenia andrei* estão demonstrados na Tabela 7.

A presença do biocomposto no solo não causou diferença significativa de migração das minhocas, em relação ao solo contendo apenas água (CtA) (Tabela 6), o que demonstra que o biocomposto produzido com *T. koningiopsis* não é agressivo à bioindicadores de contaminação do solo. Já no ensaio contendo uma lateral do solo com FilG+HC e a outra lateral com CtA foi possível verificar que apenas 32% das minhocas presentes no substrato se direcionaram para o solo FilG+HC, enquanto que 68% das minhocas migraram para o solo referente o tratamento control (CtA), evitando, assim, o solo contaminado. Isso demonstra que utilização de herbicidas pode causar alterações no comportamento dos organismos. Estudos anteriores reportaram resposta significativa de fuga quando os organismos foram expostos a altas concentrações de soluções a base de glifosato (Buch et al. 2013; Tonetti et al. 2016). A toxicidade do biocomposto pode, ainda, ser aumentada na presença de adjuvantes (Bastos et al. 2017, Pech et al. 2018).

Tabela 6. Teste de ecotoxicidade com ensaio de fuga de minhocas para os tratamentos com água (CtA, controle negativo), biocomposto a base de *T. koningiopsis* filtrado com gaze (FilG), e a combinação do FilG com o herbicida comercial (HC; Zapp Qi®, 1,5 L ha⁻¹) (FilG+HC). Erechim/RS, UFFS, 2021.

Tratamento	N° de minhocas em SAT com extrato	N° de minhocas em SAT sem extrato	Organismos mortos
CtA	5,8 ± 1,30 a	4,2 ± 1,30 b	0,0
FilG	5,6 ± 1,81 ab	4,4 ± 1,81 ab	0,0
FilG+HC	3,2 ± 1,30 b	6,8 ± 1,30 a	0,0
Média geral	4,87	5,13	-
CV (%)	31,8	28,6	-

Dados representam médias ($n = 5$). SAT = Solo artificial tropical. CV= Coeficiente de variação. HC= Herbicida comercial (glifosato potássico, Zapp Qi®).

Embora tenha ocorrido uma maior rejeição das minhocas ao substrato contendo o herbicida comercial, não foi observada a morte ou alterações comportamentais como ausência de movimentos e aglomeração em pontos específicos (dados não mostrados) nos ensaios realizados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O fungo *T. koningiopsis* é um agente promissor de biocontrole devido a sua capacidade de produzir enzimas que incrementaram a sua ação fitotóxica sob as plantas.

A aplicação do biocomposto a base de *T. koningiopsis* causou mortalidade de até 80% em plantas de pepino.

A combinação do biocomposto com o herbicida comercial ocasionou mortalidade de 90 a 100% das plantas de pepino.

O estudo de ecotoxicidade não relatou interferências comportamentais ou morte aos microrganismos expostos ao biocomposto.

O biocomposto produzido com *T. koningiopsis* demonstrou a ação potencial como bio-herbicida; dados relevantes para o setor agrícola, na busca de métodos alternativos para reduzir custos e promover a segurança alimentar e ambiental.

LITERATURA CITADA

AGROFIT - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. [accessed 2021 Feb 28]. http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons

Azevedo AR; Coronas MV. 2018. Use of avoidance tests with earthworms *Eisenia andrei* e

Eisenia fetida for identification of pesticides toxicity in Brazil: a brief review of the literature. *Ciência e Natura*. 40:18-26.

Bakr EM. 2005. A new software for measuring leaf area, and damaged area by *Tetranychus urticae* Koch. *Journal of Applied Entomology* 129(3): 173-175.

Bastos JO. 2016. Obtenção de bioherbicida a partir de fungo isolado do bioma Mata Atlântica. UFSM. 87. <http://repositorio.ufsm.br/handle/1/18034>

Bastos BO, Deobald GA, Brun T, Dal Prá V, Junges E, Kuhn RC, Mazutti MA. 2017. Solid-state fermentation for production of a bioherbicide from *Diaporthe* sp. and its formulation to enhance the efficacy. *Biotech*. 7(1):135.

Bordin ER, Camargo AF, Rossetto V, Scapini T, Modkovski TA, Weirich S, Carezia C, Franceschetti MB, Balem A, Golunski SM, et al. 2018. Non-Toxic Bioherbicides Obtained from *Trichoderma koningiopsis* Can Be Applied to the Control of Weeds in Agriculture Crops. *Industrial Biotechnology*. 14(3):157-163.

Boyetchko SM, Roskopf EN, Caesar AJ, Charudattan R. (2002). Biological weed control with pathogens: search for candidates to applications. *Agriculture and Food Production*. 2(2):239-266.

Buch AC, Brown GG, Niva CC, Sautter KD Sousa JP. 2013. Toxicity of three pesticides commonly used in Brazil to *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857) and *Eisenia andrei* (Bouché, 1972). *Appl. Soil Ecol*. 69(1):32-38.

Camargo AF, Venturin B, Bordin ER, Scapini T, Stefanski FS, Klanovicz N, Dalastra C, Kubeneck S, Preczeski KP, Rossetto V. 2020. A Low-Genotoxicity Bioherbicide Obtained from *Trichoderma koningiopsis* Fermentation in a Stirred-Tank Bioreactor. *Industrial Biotechnology*. 16(3):176-181.

Cavalcante BDM, Scapini T, Camargo AF, Ulrich A, Bonatto C, Dalastra C, Mossi AJ, Fongaro G, Pieroa RMD, Treichel H. 2021. Orange peels and shrimp shell used in a fermentation process to produce an aqueous extract with bioherbicide potential to weed control. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 32:101947.

Cheng J, Jiang D, Yi X, Fu Y, Li G, Whipps J M. 2003. Production, survival and efficacy of *Coniothyrium minitans* conidia produced in shaken liquid culture. *FEMS Microbiology Letters*. 227(1): 127-131.

Coban I, Sargin S. 2019. Production of *Trichoderma* micropropagules as a biocontrol agent in static liquid culture conditions by using an integrated bioreactor system. *Biocontrol Science and Technology*. 29(12):1197-1214.

Ferreira EA, Procópio SO, SilvaEAM, Silva AA, RufinoRJR. 2003. Leaf anatomical studies in weed species widely common in Brazil: IV - *Amaranthus deflexus*, *Amaranthus spinosus*, *Alternanthera tenella* e *Euphorbia heterophylla*. *Planta Daninha*. 21(2):263-271.

Frans R, Crowley H. 1986. Experimental design and techniques for measuring and analyzing plant responses to weed control practices. In: In: Camper ND (ed.). *Research Methods in Weed Science*. 3.ed. Champaign: Southern Weed Science Society. p. 29-46.

Fuwa HA. 1954. New method for microdetermination of amylase activity by the use of amylase as the substrate. *Journal of Biochemistry*. 41(1):583-603.

Garcia MVB. 2004. Effects of pesticides on soil fauna: development of ecotoxicological test methods for tropical regions. Ph. D University of Bonn. 19(1):283.

Ghose TK. 1987. Measurement of cellulase activities. Pure and Applied Chemistry, 59(2):257-268.

ISO - International Organization for Standardization. 17.512-1: Soil quality-avoidance teste for determining the quality of soils and effects of chemicals on behavior. Pt 1: test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*). 2008. 26.

ISO - International Organization for Standardization. 11.268-2: Soil quality-effects of pollutants on earthworms. Pt 2: Determination of effects on reproduction of *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*. 2012. 21.

Khan AA, Robinson DS. 1994. Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. Food Chemistry. 49(4):407-410.

Klaic R, Kuhn RC, Foletto EL, Dal Pra V, Jacques RJ, Guedes JV, Treichel H, Mossi AJ, Oliveira DJ, Oliveira V, et al. 2015. An overview regarding bioherbicide and their production methods by fermentation. Fungal Biomolecules: Sources, Applications and Recent Developments. John Wiley & Sons, Ltda. 1:183-199.

Klaic R, Sallet D, Foletto EL, Jacques RJ, Guedes JV, Kuhn RC, Mazutti MA. 2017. Optimization of solid-state fermentation for bioherbicide production by *Phoma* sp. Brazilian Journal of Chemical Engineering. 34(2):377-384.

Sharmila K, Thillaimaharani KA, DurairajR, Kalaiselvam M. 2014. Production and characterization of exopolysaccharides (EPS) from mangrove filamentous fungus, *Syncephalastrum* sp. African Journal of Microbiology Research. 8(21):2155-2161.

Magiero EC, Assmann JM, Marchese JA, Capelin D, Paladini, MV, Trezzi MM. 2009. Efeito alelopático de *Artemisia annua* L. na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) e leiteiro (*Euphorbia heterophylla* L.). Revista Brasileira de plantas medicinais. 11(3), 317-324.

Mahapatra S, Banerjee D. 2013. Optimization of a bioactive exopolysaccharide production from endophytic *Fusarium solani* SD5. Carbohydr Polym. 97(2):627-634.

Faria SP, de Melo GR, Cintra LC, Ramos LP, Jesuino RSA, Ulhoa CJ, de Faria FP. 2020. Production of cellulases and xylanases by *Hemicella grisea* var. *thermoidea* and application in sugarcane bagasse arabinoxylan hydrolysis. Industrial Crops and Products. 158(1):112968.

Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical chemistry. 31(3):426-428.

Morra MJ, Popova IE, Boydston RA. 2018. Bioherbicidal activity of *Sinapis alba* seed meal extracts. Industrial Crops & Products. 115(1):174-181.

Osińska-Jaroszuk M, Jarosz-Wilkolazka A, Jaroszuk-Ściśiel J, Szałapata K, Nowak A, Jaszek M, Ozimek E, Majewska M. 2015. Polissacarídeos extracelulares de Ascomycota e Basidiomycota: condições de produção, características bioquímicas e propriedades biológicas. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 31(12):1823-1844.

- Pech TM, Silva M, De Santo FB, Niemeyer JC. 2018. Avaliação da ecotoxicidade do herbicida metsulfuronmethyl: ensaios multiespécie com minhocas e isópodos. In: XV Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, Aracaju: Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia. [accessed 2019 Apr 24]:[269-271 p.]. <http://www.ecotox2018.com.br>
- Pereira DEP. 2013. Análise de celulasas e xilanases por fungo isolado a partir do Bioma Cerrado. 101
- Pongsawasdi P, Yagisawa M. 1987. Screening and identification of a cyclomaltodextrin glucanotransferase-producing bacteria. *Journal Fermentation Technology*. 65(1):463-467.
- Qian YS, Cai S, Huo YN, Mao PP, Wang HZ, Wu JB. 2013. First report of leaf blight disease of *Curcuma wenyujin* caused by *Trichoderma koningiopsis* in China. *Journal of Plant Pathology*. 95(4):77.
- Reichert Júnior FW, Júnior FWR, Scariot MA, Forte CT, Pandolfi L, Dil JM, Weirich S, Carezia C, Mulinari J, Mazutti MA, Fongaro G, et al. 2019. Novas perspectivas para o controle de plantas daninhas com fungos autóctones com potencial bioherbicida seletivo. *Heliyon*. 5(5)01676.
- [SBCPD] Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas. 1995. Procedimentos para instalação, avaliação e análise de experimentos com herbicidas. 42.
- Souza ARCD, Baldoni DB, Lima J, Porto V, Marcuz C, Machado C, Ferraz RC, Kuhn RC, Jacques RJS, Guedes JVC. et al. 2017. Selection, isolation, and identification of fungi for bioherbicide production. *Brazilian Journal of Microbiology*. 48(1):101-108.
- Statsoft. INC. Programa computacional Statistica 10.1. E.A.U. 2011.
- Stefanski FS, Camargo AF, Scapini T, Bonatto C, Venturin B, Weirich SN, Ulkovski C, Carezia C, Ulrich A, Michelon W. 2020. Potential use of biological herbicides in a circular economy context: A sustainable approach. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. 4(1):195.
- Swain H, Adak T, Mukherjee AK, Mukherjee PK, Bhattacharyya P, Behera S, Bagchi TB, Patro R, Shasmita, Khandual A. et al. 2018. Novel *Trichoderma* strains isolated from tree barks as potential biocontrol agents and biofertilizers for direct seeded rice. *Microbiological research*. 214(1):83-90.
- Tarazona JV, Ramos-Peralonso MJ. 2014. Ecotoxicology. *Encyclopedia of Toxicology*. Elsevier. 276-280.
- Treichel H, Sbardelotto M, Venturin B, Agnol AD, Mulinari J, Golunski SM, Baldoni DB, Bevilacqua CB, Seminoti RJJ, Vargas, GDLP. et al. (2017). Lipase production from a newly isolated *Aspergillus niger* by solid state fermentation using canola cake as substrate. *Current Biotechnology*. 6(4):295-300.
- Todero I, Confortin TC, Luft L, Seibel J, Kuhn RC, Tres MV, Zabot GL, Mazutti MA. et al. 2020. Concentration of exopolysaccharides produced by *Fusarium fujikuroi* and application of bioproduct as an effective bioherbicide. *Environmental technology*. 41(21):2742-2749.
- Tonetti CL, Gorte T, Bartz M, Vasconcelos E, Sautter K, Brown G, Oliveira C. 2016. Toxicidade de Ácido Aminometilfosfônico (AMPA), em solo artificial e natural sobre oligochaeta terrestre: ensaios de fuga com *Eisenia andrei*. In: Anais do XIV Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia; Curitiba. Anais de resumos. Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia. [accessed 2020 Jun 24]: [620-621 p.]. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/>

Toni LRM, De Santana H, Zaia DAM. 2006. Adsorção de glifosato sobre solos e minerais. *Química Nova*. 29(4):829.

Yang X. Scale-up of microbial fermentation process. 2010. In: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 3:669-675.

Yu XZ, Zhang FZ. 2013. Effects of exogenous thiocyanate on mineral nutrients, antioxidative responses and free amino acids in rice seedlings. *Ecotoxicology*. 22(1):752-760.

Zhu H, Ma Y, Guo Q, Xu B. 2020. Biological weed control using *Trichoderma polysporum* strain HZ-31. *Crop Protection*. 105161.

CAPÍTULO III

BIO-HERBICIDA DE *Trichoderma koningiopsis* ASSOCIADO A FORMULAÇÕES COMERCIAIS DE GLIFOSATO

BIOHERBICIDE OF *Trichoderma koningiopsis* ASSOCIATED WITH COMMERCIAL FORMULATIONS OF GLYPHOSATE

RESUMO – Um dos maiores desafios da agricultura é o manejo de plantas daninhas resistentes, devido à diminuição da eficiência dos herbicidas comerciais manejados muitas vezes de forma inadequada. Diante disso, o objetivo foi avaliar o efeito do bio-herbicida produzido a base de *Trichoderma koningiopsis* associado a diferentes doses de três formulações comerciais de glifosato (sal isopropilamina, sal de amônio e sal potássico), nas características morfofisiológicas em plantas daninhas de verão e na cultura da soja. Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com 5 repetições, onde as plantas daninhas do leiteiro e papuã foram cultivadas nos vasos de 500 mL em casa de vegetação. Os tratamentos consistiram em manter as plantas testadas na presença e ausência do bio-herbicida produzido com o fungo *T. koningiopsis* de forma isolada e associado a 10, 20, 50, 70, 90, 100% da dose recomendada pelo fabricante dos herbicidas testados, foram aplicados 16 dias após a emergência (DAE) e avaliados aos 7 e 15 dias após o tratamento (DAT). As sementes foram coletas em lavouras do município de Estação/RS em 2020 e o experimento foi conduzido na UFFS, *Campus Erechim/RS*. Foram amostradas e analisadas 5 plantas em cada unidade experimental, com vistas a avaliações morfológicas da altura de plantas, comprimento e diâmetro de raízes e colmo e massa. Foram analisadas outras 5 repetições para determinar os efeitos fitotóxicos visuais nas folhas submetidas aos respectivos tratamentos. O bio-herbicida mostrou-se eficiente no controle de plantas daninhas. Não houve danos fitotóxicos significativos na cultura da soja e o controle das plantas daninhas foi eficiente em até metade da concentração da dose recomendada dos três herbicidas testados quando associados ao *T. Koningiopsis*.

Palavras-chave: bio-herbicida, biocontrole, controle alternativo de plantas daninhas, fitotoxicidade.

ABSTRACT – One of the biggest challenges of agriculture is the management of resistant weeds, due to the loss of efficiency of commercial herbicides often handled inadequately. Therefore, the objective was to evaluate the effect of the bioherbicide produced based on *Trichoderma koningiopsis* associated with different doses of three commercial formulations of glyphosate (isopropylamine salt, ammonium salt and potassium salt), on morphophysiological characteristics in summer weeds and in soybean crop. The experimental design was adopted completely randomized, with 5 replications, where the leiteiro and papuã weeds were cultivated in the pots of 500 mL in a greenhouse. The treatments consisted of keeping the plants tested in the presence and absence of the bioherbicide produced with the fungus *T. koningiopsis* alone and associated with 10, 20, 50, 70, 90, 100% of the dose recommended by the manufacturer of the herbicides tested, were applied 16 days after emergence (DAE) and evaluated at 7 and 15 days after treatment (DAT). The seeds were collected in crops in the municipality of Estação/RS in 2020 and the experiment was conducted at UFFS, Campus Erechim/RS. Five plants were sampled and analyzed in each experimental unit, with a view to morphological evaluations of plant height, length and diameter of roots and stem and mass. Another 5 replications were analyzed to determine the visual phytotoxic effects on the leaves submitted to the respective treatments. The bioherbicide proved to be efficient in weed control when isolated. No significant phytotoxic damage is heard in soybean crop and weed control was efficient in up to half the recommended dose concentration of the three herbicides tested when associated with *T. Koningiopsis*.

keywords: bioherbicide, biocontrol, alternative weed control, phytotoxicity.

INTRODUÇÃO

As plantas daninhas (PD) de *Euphorbia heterophylla* (leiteiro) e *Brachiaria plantaginea* (papuã) afetam frequentemente a cultura da *Glycine max* (soja), sendo importante que sejam controladas dentro do período considerado como crítico de prevenção à interferência (Galon et al., 2008). No caso de *B. plantaginea*, estas PD exercem forte competição com as culturas pelos nutrientes essenciais (os quais quase sempre estão em quantidades inferiores às necessidades das culturas no solos) não permitindo que a cultura expresse todo o seu potencial produtivo (Fleck, 1996), podendo ocasionar a redução de até 90% na produtividade caso nenhum controle seja realizado (Merotto Jr. et al., 1997).

Entretanto, o uso demasiado e incorreto de herbicidas químicos permitiu o surgimento de biótipos resistentes a diversos mecanismos de ação (Vidal, Lamego e Trezzi, 2006), existindo atualmente 519 casos de diversas PD resistentes a herbicidas no mundo, além do crescente surgimento de casos de resistência cruzada ou múltipla a vários mecanismos de ação (Heap, 2021).

Em sistemas de plantio direto, a *E. heterophylla* também tem sido de difícil controle no Brasil, por ser tolerante ao glifosato e com resistência múltipla aos herbicidas inibidores de ALS e de PROTOX, além disto são espécies fotoblásticas negativas que encontraram ambiente ideal para seu desenvolvimento (Vargas et al., 2013; Xavier et al., 2013; Prigol et al., 2014). No estudo de Vidal e Fleck (1997), este problema já era alertada através de previsões matemáticas que indicavam alto risco de ocorrência de resistência em áreas com alta infestação de plantas daninhas, principalmente quando usados herbicidas cujos mecanismos de ação já apresentam histórico de alta frequência inicial do alelo de resistência.

Para realizar um manejo eficiente de plantas daninhas é fundamental conhecer sua biologia, seus hábitos e riscos às culturas para então definir estratégias mais sustentáveis, eficientes e econômicas para seu manejo, controle e erradicação. De modo geral, o glifosato é um dos herbicidas mais utilizados, tanto na dessecação como também no controle de plantas daninhas em lavouras de soja no Brasil, em especial a tecnologia Roundup Ready®. O glifosato ainda é uma tecnologia importante no manejo de PD, pois é de amplo espectro de ação; apresenta translocação via floemasimplástica atuando também sobre partes subterrâneas das plantas; previamente ocorre paralisação do crescimento logo após aplicação; contudo possui atividade herbicida lenta onde a morte das plantas tratadas ocorre entre 7 e 21 dias, assim caracterizando o grupo G de herbicidas, inibidores da EPSPs (enol-piruvil-shikimato-fosfato sintetase) (Christoffoleti e López-Ovejero, 2008).

Tendo em vista os impactos ambientais e a necessidade do controle das plantas daninhas resistentes, surge uma crescente demanda por produtos alternativos que sejam menos agressivos à saúde humana e ao meio ambiente, as associações de controle biológico com o químico caracterizam o controle integrado de pragas e doenças, tornam-se uma ferramenta importante para o manejo das plantas resistentes sem afetar fortemente o equilíbrio ecológico (Dayan e Duke, 2014; Zhou et al., 2004).

Cabe salientar que a utilização de herbicidas comerciais associados a bioprodutos pode ser uma boa alternativa para o controle de plantas infestantes, especialmente porque algumas espécies já apresentam resistência a certos herbicidas comercializados (Bajwa,

Mahajan e Chauhan, 2015; Duke e Powles, 2009; Gealy, Mitten e Rutger, 2003; Givens et al., 2009). Entretanto é necessário avaliar se os herbicidas não interferiram na eficiência do bioproduto, bem como o inverso.

Portanto essa pesquisa tem como hipótese que bio-herbicidas podem resultar em efeitos sinérgicos quando associado a herbicidas comerciais, possibilitando a redução nas doses recomendadas no controle das plantas daninhas de *E. heterophylla*, *B. plantaginea*, e na cultura da *G. max*. Diante disso, o objetivo foi avaliar o efeito do bio-herbicida produzido a base de *T. koningiopsis* associado a diferentes doses de três formulações de herbicidas comerciais (Roundup Original - sal isopropilamina, Roundup WG - sal de amônio e Zapp Qi® - sal potássico), nas características morfofisiológicas de plantas daninhas e cultivadas, em casa de vegetação.

MATERIAL E MÉTODOS

O bio-herbicida a base de *Trichoderma koningiopsis* (Código do Cadastro SISGEN - A8675F0), foi produzido por fermentação submersa conforme metodologia descrita por Souza et al. (2017) e Reichert Júnior et al. (2019). A otimização da produção do bio-herbicida seguiu os parâmetros descritos por Bordin et al. (2018), com 3,00 g L⁻¹ de glicose, 0,75 g L⁻¹ de peptona e 0,37 g L⁻¹ de extrato de levedura. As fermentações foram realizadas a uma temperatura de 28 °C em agitador orbital, “Shaker” (Starf FT38, Fortinox, Brasil), sob agitação de 120 rpm, por 72 horas.

O substrato utilizado para o preenchimento das unidades experimentais (vasos de 500 mL) foi provido da mistura cama de aviário e humus de minhoca (1:1). O período de condução do experimento foi no ano agrícola 2019/20. O Trabalho foi desenvolvido em casa de vegetação da Agroecologia, pertencente a Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus Erechim/RS*, na seguinte localização geográfica -27°72'72.42”S e -52°28'76.99”O.

Previamente na instalação do experimento, foi coletada amostra do substrato e enviada para análise, foi classificado classe textural média (IN 02/2008 - MAPA, Tipo 2, areia: 36,25 %; argila: 33,75%; silte: 30 %), com as seguintes características: pH (água) = 7,26; matéria orgânica = 21,3%; argila = 31%; P = 50 mg dm⁻³; K = 18,25 mg dm⁻³; Ca +2 = 17 cmol_c dm⁻³; Mg+2 = 8 cmol_c dm⁻³; Al+3 = 0 cmol_c dm⁻³; H + Al = 0,96 cmol_c dm⁻³; e CTC_{efetiva} = 27,62 cmol_c dm⁻³.

Sementes de *Euphorbia heterophylla* L. e *Brachiaria plantaginea* (Link) Hitchc., foram coletadas na safra do ano agrícola de 2019/2 em Estação (RS, sul do Brasil), e

armazenadas imediatamente no banco de sementes do Laboratório de Agroecologia (geladeira, $\pm 2^{\circ}\text{C}$), de tal maneira que alterações na qualidade da semente sejam as mínimas possíveis (dormência, grau de umidade e porcentagem de germinação) conforme descrito nas Regras para análise de sementes, RAS (Brasil, 2009). A identidade das plantas foi confirmada pelo Balduino Rambo Herbário da Universidade Regional Integrada em Erechim, sul do Brasil (*E. heterophylla*: HBPR N° 12.376 e *B. plantaginea*: HBPR N° 12.377).

Foram utilizados vasos com capacidade de $0,5\text{ dm}^3$ e semeadas seis sementes das plantas daninhas de *Euphorbia heterophylla* (leiteiro) e *Brachiaria plantaginea* (papuã), esendo após mantida uma plântula por vaso. Foi realizado o encharcamento das sementes com água morna a fim de garantir a germinação e emergência da cultura. A semeadura foi realizada no dia 04 de janeiro de 2020. As irrigações foram feitas diariamente por microaspersão, de forma a suprir as exigências hídricas das plantas.

O delineamento adotado foi inteiramente casualizados (DIC), com nove tratamentos e dez repetições. Os tratamentos incidiram no uso de três herbicidas pós-emergentes com ingredientes ativos diferentes e concentrações fracionadas (10, 20%, 50%, 70%, 90%, 100% da dose recomendada pelo fabricante) em associação com a dose de 3 mL do bio-herbicida de *T. koningiopsis*, tendo, um controle positivo somente com o bio-herbicida e outro controle positivo com o herbicida na dose recomendada, e uma testemunha (controle negativo) com a aplicação do meio de cultivo utilizado na fermentação submersa do fungo (Tabela 1).

Tabela 1. Concentrações de herbicidas formulados com base da dose recomendada dependente do estágio de desenvolvimento da planta infestante, com diluição para mL ha⁻¹ ou g ha⁻¹. Diluições de herbicidas formulados com base da dose recomendada considerando o volume de calda de 3 mL por planta em vaso cultivado (n = 10). Erechim/RS, 2020.

PD	PRODUTO COMERCIAL	Fração de doses de herbicida					
		10%	20%	50%	70%	90%	100%
<i>G. max</i> (soja)	Roundup	240	600	1200	1800	2160	2400
	Original	0,14	0,36	0,72	1,08	1,29	1,44
	Roundup	75	187,5	375	562,5	675	750
	WG	0,04	0,11	0,22	0,33	0,40	0,45
	Zapp Qi®	150	375	750	1125	1350	1500
		0,09	0,22	0,45	0,67	0,81	0,90
<i>E. heterophylla</i> (leiteiro)	Roundup	400	1000	2000	3000	3600	4000
	Original	0,24	0,6	1,2	1,8	2,16	2,4
	Roundup	150	375	750	1125	1350	1500
	WG	0,168	0,42	0,84	1,26	1,512	1,68
	Zapp Qi®	280	700	1400	2100	2520	2800
		0,09	0,225	0,45	0,675	0,81	0,9
<i>B. plantaginea</i> (papuã)	Roundup	100	250	500	750	900	1000
	Original	0,06	0,15	0,3	0,45	0,54	0,6
	Roundup	50	125	250	375	450	500
	WG (g)	0,09	0,225	0,45	0,675	0,81	0,9
	Zapp Qi®	150	375	750	1125	1350	1500
	(mL)	0,03	0,075	0,15	0,225	0,27	0,3

*Dose padrão recomendada pela bula do produto sem adição de *T. koningiopsis* (menores doses para a fase inicial de desenvolvimento). **Plantas cultura, tem as dosagens respectivamente às maiores recomendadas possíveis. PD= Planta daninha.

Os alto número de casos registrados de resistências a herbicidas em PD de *E. heterophylla* e *B. plantaginea*, corroboram na escolha dos herbicidas a testados, foram utilizados 3 produtos herbicidas do grupo G (Christoffoleti e Nicolai, 2016), inibidores da EPSPs (enol-piruvil-shikimato-fosfato sintetase), com diferentes formulações: Roundup Original (Sal isopropilamina), Roundup WG (Sal de amônio) e Zapp Qi® (Sal potássico) (Monsanto, 2011; Monsanto, 2020; Syngenta, 2020).

Dentro do período de 11 a 27 dias após a emergência (DAE), período recomendado para o controle de *B. plantaginea* (Galon et al. 2008), aos 16 dias foi realizada a aplicação dos tratamentos (DAT). A pulverização ocorreu manualmente com auxílio de borrifador. Os tratamentos foram aplicados a 15 cm do alvo, com velocidade de passada de 1 m s⁻¹ com 4 borrifadas equivalentes a 3 mL da calda aplicada diretamente na parte aérea de cada planta.

Características Visuais

As avaliações visuais de fitointoxicação ocorreram aos 31 DAE das plantas de *E. heterophylla* e *B. plantaginea*. Para quantificar a fitointoxicação utilizou-se uma escala percentual (MP) de notas variando entre 0 (zero) a 100 (cem), onde 0 implica ausência de quaisquer sintomas e 100 a morte de plantas (Sbcpd, 1995; Frans & Crowley, 1986) (Tabela 2).

Tabela 2. Escala percentual de fitotoxicidade em relação às injúrias foliares apresentadas pelas plantas de pepino. Erechim/RS, 2020.

%	DESCRIÇÕES DAS CATEGORIAS PRINCIPAIS	DESCRIÇÃO DETALHADA DA FITOTOXIDADE NA CULTURA
0	Sem efeito	Sem injúria ou redução
10		Leve descoloração ou atrofia
20	Efeito leve	Alguma descoloração ou atrofia, ou perda por atrofia
30		Injúria mais pronunciada, mas não duradoura
40		Injúria moderada, mas normalmente com recuperação
50	Efeito moderado	Injúria mais duradoura, recuperação duvidosa
60		Injúria duradoura, sem recuperação
70		Injúria pesada, redução de estande
80	Efeito severo	Cultura próxima da destruição (poucas sobreviventes)
90		Raramente restam algumas plantas
100	Efeito total	Destruição completa da cultura

Avaliações de altura de plantas ocorreram também aos 31 DAE, sendo essa variável resultante das médias de cinco das plantas em cada unidade experimental. Os resultados foram comparados com a testemunha, preparada nas mesmas condições de substrato.

Para efeito de avaliação os tratamentos foram transformados pelo critério da proporcionalidade obtidos através da relação entre o tratamento e a testemunha. Após transformação, os tratamentos foram analisados quanto aos efeitos na haste e no sistema radicular das plantas. Com base nos valores obtidos, foram atribuídos sinais para definir se houve efeito de inibição, efeito nulo ou efeito de crescimento. As classificações foram utilizadas na seleção dos tratamentos que apresentaram efeito inibitório no crescimento e desenvolvimento das plantas testes em todas as análises realizadas. Os dados da variável fitotoxicidade de plantas aos 07 e 15 DAT foram transformados em $\arcsen \sqrt{(x + 0,5)}$, a fim de se corrigir a heterocedasticidade.

Para avaliação da injúria (dano) foliar foi utilizado o programa Compu Eye, Leaf & Symptom Area (Bakr, 2005) com o auxílio câmera digital (Celular Samsung A3-2015, câmera de 13 MP) para a área total de sintomas visíveis (%) de leve despigmentação (LD), clorose (CL), necrose (NC), amarelamento (AML) arroxamento (ARX), despigmentação total da planta (DTP) e porcentagem de folha sadia (SD).

Características Morfológicas

Aos 15 dias após tratamento (DAT; ou 31 DAE) foi realizado o corte das plantas na base da haste, separando-se a parte aérea das raízes, sendo o sistema radicular lavado a fim de retirar o excesso de solo. As amostras da parte aérea e raízes foram colocadas em sacos de papel devidamente identificados e encaminhados para o Laboratório de Agroecologia, onde foram seccionadas em estufa com circulação forçada de ar (400-5ND, Ethik Technology, Brasil) a 65°C por um período de 72 h, no qual foi suficiente para que estas amostras alcançassem peso constante para mensuração da massa seca.

Para as análises morfológicas da parte aérea as plantas foram consideradas: altura (AP, cm) com auxílio de fita métrica, comprimento e diâmetro de caule (DC, mm) com auxílio de paquímetro digital, número de nós (NN) e número de folhas (NF); diâmetro médio de raiz (DMR, mm), do comprimento da maior raiz (CMR, cm) e massa seca da raiz (MSR). A área foliar (AF, m²) é calculada pelo software de Bakr (2005); massa seca de folhas (MSF, g), massa seca de caule (MSC, g) e massa seca de raiz (MSR, g); A partir desses valores foi possível calcular a massa seca da parte aérea (MSPA = MSF + MSC) e massa seca total (MST = MSPA + MSR). A partir dos dados de área foliar e massa seca da planta foram calculados a área foliar específica (AFE = AF/MSF), razão de área foliar (RAF = AF/MST) e razão entre a MSR e a MSPA (MSR/MSPA).

Análise estatística.

Efetuiu-se análise de variância (ANOVA) nos dados, quando constatada significância para determinada variável-resposta, procedeu-se a comparação dos tratamentos por meio do teste de Tukey a 5% de probabilidade com a utilização do software Statistica 10.1 (StatSoft Inc., USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir os resultados obtidos neste estudo demonstram os efeitos causado pelo bio-herbicida a base de *T. koningiopsis* associado a diferentes formulações de glifosato (Roundup Original, Roundup WG e Zapp Qi®), sobre a cultura *G. max* e nas plantas daninhas de *E. heterophylla* e *B. plantaginea*.

Efeitos do bio-herbicida associado a herbicidas na cultura da soja

Nas Figuras 1, 2 e 3 são observados os efeitos dos tratamentos aplicados em plantas da soja. Em todos os ensaios o tratamento controle ou testemunha, caracterizada pela aplicação do meio de cultivo somente, não apresentou nenhum tipo de efeitos ou injurias na cultura, sendo esta utilizada como parâmetro para pigmentação característica de planta sadia.

Após a aplicação dos tratamentos realizados foram avaliados sintomas nas folhas das plantas como leve despigmentação (LD), clorose (CL), necrose (NC) e amarelamento (AML) do tecido foliar.

Apesar da cultivar utilizada neste experimento ser resistente ao glifosato algumas injurias foram observadas aos 16 DAT resultando que, a associação dos produtos formulados por sais de isopropilamina, amônio e potássico, em determinadas doses com o bio-herbicida, podem causar fitotoxicidade na cultura, mas sem danos irreversíveis ou prejudiciais para o seu desenvolvimento vegetativo.

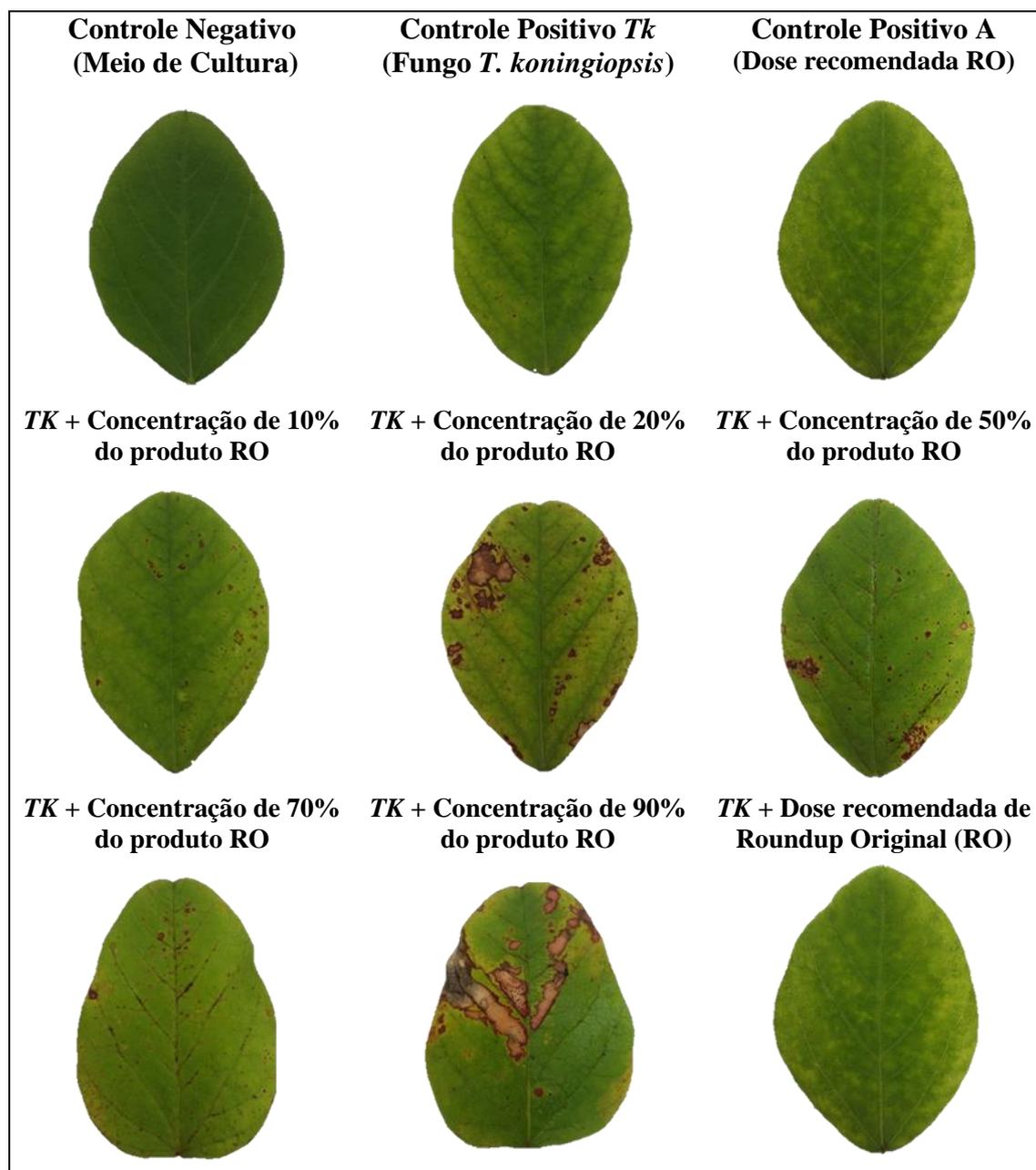


Figura 1. Comparação das lesões observadas em folhas de *G. max* (soja), tratadas com meio de cultivo (controle negativo), e pelas respectivas diluições de bio-herbicida com herbicida comercial Roundup Original (Sal isoprolamina) sobre a dose de 2,4 L ha⁻¹, realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020.

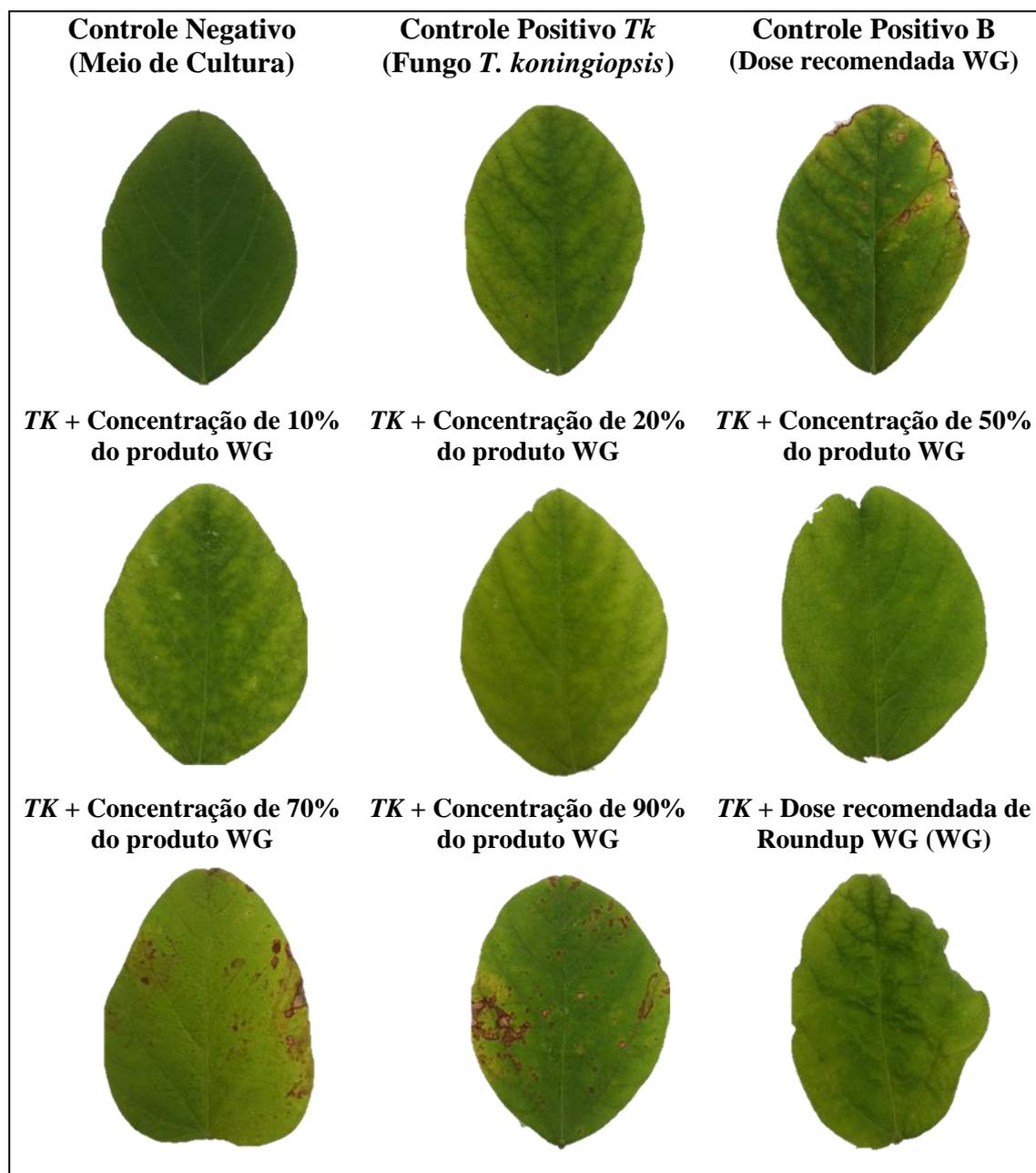


Figura 2. Comparação das lesões observadas em folhas de *G. max* (soja), tratadas com meio de cultivo (controle negativo), e pelas respectivas diluições de bio-herbicida com herbicida comercial Roundup WG (Sal de amônio) sobre a dose de 0,75 Kg ha⁻¹, realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020.

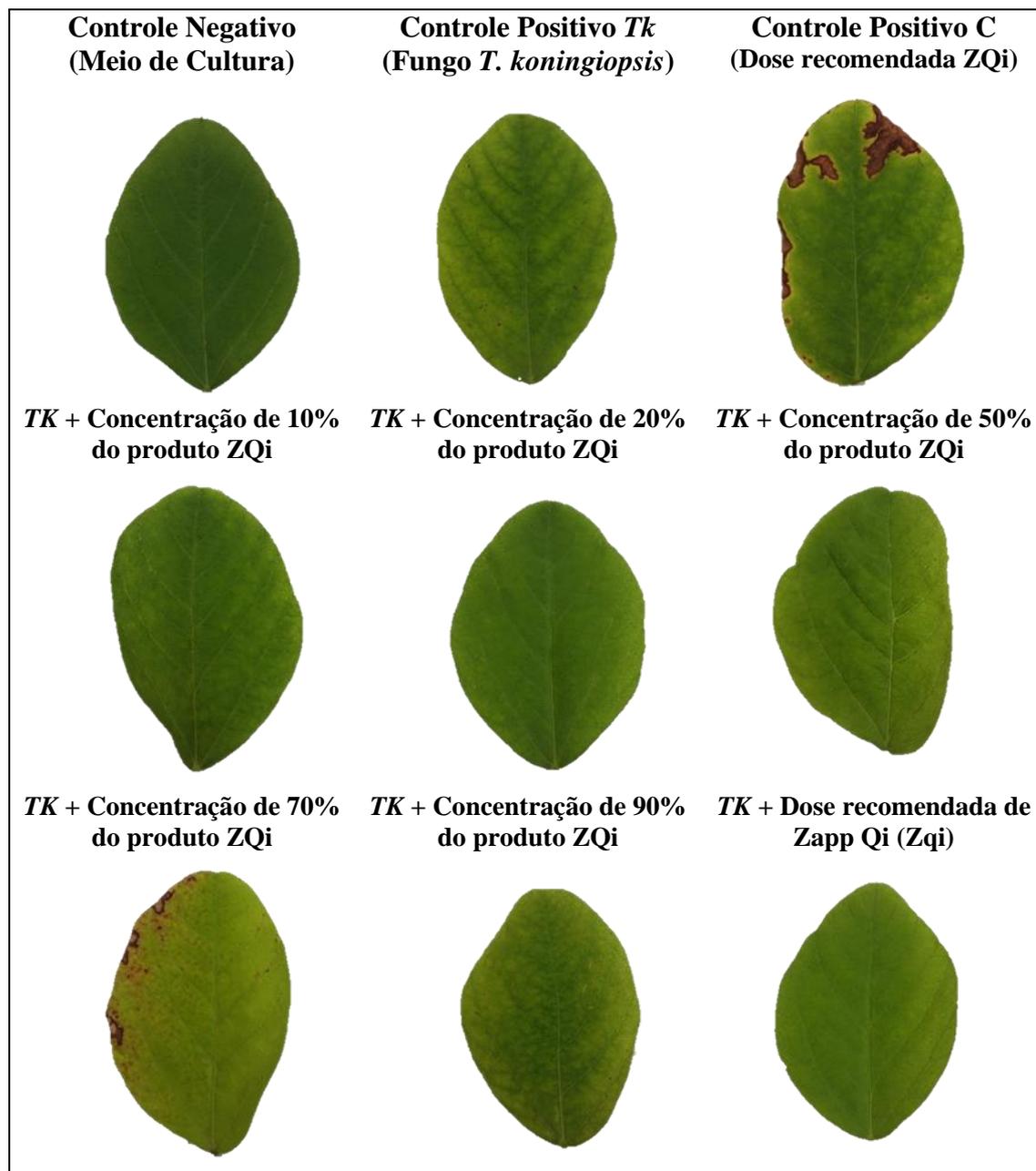


Figura 3. Comparação das lesões observadas em folhas de *G. max* (soja), tratadas com meio de cultivo (controle negativo), e pelas respectivas diluições de bio-herbicida com herbicida comercial Zapp Qi® (Sal potássico) sobre a dose de 1,5 L ha⁻¹, realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020.

Na Tabela 3 é observado a representação da área de sintomas em porcentagem, de forma que no controle negativo realizado com o meio de cultura é mensurado um total de 99,2 % de folha sadia com uma leve despigmentação de apenas 0,8 %.

Tabela 3: Sintomas de fitotoxicidade visual foliar pela leve despigmentação (LD), clorose (CL), necrose (NC), amarelamento (AML), despigmentação total da planta (DTP) e sádia (SD), em *G. max* (soja) (meio de cultivo, controle), tratadas com bio-herbicida de *Trichoderma koningiopsis* (TK), combinação do extrato com o herbicidas comerciais Roundup Original (RO), Roundup WG (WG) e Zapp Qi® (ZQi), realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020.

Tratamento	Percentual de sintomas (%)					
	LD	CL	NC	AML	DT	SD
Controle negativo (Meio de cultura)	0,8	0,00	0,00	0,00	0,8	99,2
Controle positivo <i>Tk</i> (<i>T. koningiopsis</i>)	13,4	0,00	0,00	4	17,4	82,6
<i>Tk</i> + RO 10%	35,2	0,1	0,7	13	49	51
<i>Tk</i> + RO 20%	19,8	7	10,9	19,7	57,4	42,6
<i>Tk</i> + RO 50%	27,4	0,6	2,1	21,7	51,8	48,2
<i>Tk</i> + RO 70%	24,7	0,6	0,6	24,8	50,6	49,4
<i>Tk</i> + RO 90%	16,3	15,6	17,6	14,8	64,3	35,7
<i>Tk</i> + RO 100%	18,7	11,8	15,9	12	58,5	41,5
Controle Positivo A (RO 100%)	29,5	0,00	0,2	22	51,7	48,3
<i>Tk</i> + WG 10%	29	0,00	0,1	25	54,1	45,9
<i>Tk</i> + WG 20%	24,4	0,00	0,2	28	52,6	47,4
<i>Tk</i> + WG 50%	32,6	0,00	0	18,2	50,8	49,2
<i>Tk</i> + WG 70%	17,3	8,6	8,3	29,4	63,6	36,4
<i>Tk</i> + WG 90%	27,5	1	3,5	17,2	49,2	50,8
<i>Tk</i> + WG 100%	24	0,00	0,00	8,7	32,8	67,2
Controle Positivo B (WG 100%)	20	11,5	0,8	13,3	45,6	54,4
<i>Tk</i> + ZQi 10%	17,2	0,00	0,3	2,5	20	80
<i>Tk</i> + ZQi 20%	25,8	0,00	0,00	7	32,8	67,2
<i>Tk</i> + ZQi 50%	39,6	0,00	0,00	15,6	55,3	44,7
<i>Tk</i> + ZQi 70%	13,7	1,1	1,7	24,2	40,6	59,4
<i>Tk</i> + ZQi 90%	22,2	0,1	0,7	12,2	35,2	64,8
<i>Tk</i> + ZQi 100%	52,2	0,00	0,1	10,5	62,7	37,3
Controle Positivo C (ZQi 100%)	23,9	1,7	5,3	13,9	44,9	55,1

O controle positivo realizado com somente o bio-herbicida resultou em uma LD de 13,4 % somada a 4% de amarelecimento AML e totalizando 17,4% de despigmentação total, mas por outro lado, ainda 82% da folha demonstrou-se sádia.

Os controles positivos realizados com a aplicação isolada dos herbicidas comerciais, constataram despigmentação total de 45,6% para Roundup WG (WG), 51,7% para o Roundup Original (RO) e 55,1% ao Zapp Qi® (ZQi), o que demonstra que são sintomas que

ocorrem normalmente após a aplicação, mas que evidentemente a planta passara por recuperação ao longo do seu perío vegetativo (Reis et al., 2010).

Já no teste com o herbicida Roundup WG, a maior porcentagem de DT está na concentração de *Tk*+WG70% que é de 63,6%, porém os danos fitotóxicos pelos sintomas de CL e NC são pouco presentes quando associado com o bio-herbicida. Também é observado deformidades nas folhas sobre a concentração total da dose do produto (*Tk*+WG100%), representando que a associação da dose recomendada pela bula com o bio-herbicida deve ser realizada com cautela.

As concentrações abaixo de *Tk*+RO70% apresentaram efeitos semelhantes aos tratamentos controle quanto aos sintomas fitotóxicos observados, o que demonstra o potencial de uso em combinação com o produto comercial, com vistas a redução das concentrações de uso dele, desde que essas sejam eficientes no controle de plantas daninhas.

Observa-se nos ensaios de associação do bio-herbicida, com o produto comercial Zapp Qi®, é perceptível que danos por NC são quase inexistentes (Figura 3), em que o dano mais severo é atribuído ao tratamento *Tk*+ZQi70% com 1,7% e AML com 24,2%, mas com um total de folha sadia de 24,2%. Estes resultados das avaliações visuais, são corroborados pelas análises morfológicas apresentadas nas Tabela 4, 5 e 6 para os respectivos herbicidas comerciais Roundup Original, Roundup WG e Zapp Qi®.

Os resultados demonstraram que nas avaliações, o tratamento de *Tk* + Roundup Original e Zapp Qi® acima das concentrações de 70% apresentaram um menor número de folhas quando comparado a sua testemunha e ao tratamento com Roundup WG, porém o seu índice de matéria seca da parte aérea foram maior que o tratamento com Zapp Qi® e não diferiram entre si nas 8 dosagens estudadas. Assim, dosagens do Glifosato referentes a recomendada pelos fabricantes dos respectivos herbicidas (100%), independente da formulação utilizada promovem efeitos fitotóxicos em soja RR, associados ou não com o bio-herbicida, os quais são mais acentuados nas formulações Roundup (Sal isopropilamina e Sal de amônio).

Segundo a análise de variância, não houve diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade para as variáveis notas de mortalidade de plantas (MP), tanto na formulação, dosagens e na interação destas com o bio-herbicida, além da variável de controle (testemunhas).

Além da menor fitoxidade observada pelo aspecto visual, os resultados demonstraram que o Roundup WG, ao contrário do Roundup Original e Zapp Qi®,

apresentou uma efeitos severos nas variáveis morfológicas quando comparado os tratamentos e as testemunhas. Entre tanto, os dados observados para todos os tratamentos não apresentam tendência de comprometimento ao desenvolvimento vegetativo da cultura da soja.

As plantas do experimento estavam entrando em estágio de florescimento (R1), antes da coleta, e de acordo com o estudo de Potafós (1997), as plantas em R2 já têm 43 a 56 cm de altura e estão nos estádios V8 a V12. Nesta fase experimental, a planta acumula cerca de um quarto de sua matéria seca final, chegando a obter metade de sua altura final e desenvolve-se cerca da metade do número total de nós.

Apartir deste estágio vegetativo (R1) é observado o início de um período de rápido e constante acúmulo diário das taxas de matéria seca e nutrientes, que continuará até logo após o estágio R6, onde ocorre o máximo de acúmulo de matéria seca, no momento da frutificação e pleno enchimento dos grãos. Aparentemente, pela aceleração metabólica das atividades energéticas da planta, toda fitotoxicidade causada pelo bio-herbicida pode ser recuperada pelo vegetal, com tudo as dosagens de até 90% para todos as formulações testadas causaram menor fitotoxicidade que as doses recomendadas pelo fabricante. Este fato pode permitir a utilização combinada do controle biológico e químico, reduzindo as doses de aplicação o que contribui para questões de contaminação ambiental e uso excessivo dos herbicidas além de poder realizar o controle de plantas daninhas eficientemente.

Apenas na formulação de sal potássico, que a partir de $Tk + ZQ_i70\%$ os teores de MST (matéria seca total) foram inferiores que a testemunha, de 0,828 g para 1,017 g, respectivamente. Indo de encontro ao estudo de Reis et al. (2010) que observam existir diferenças de R1 para R2 no teor de matéria seca quando testadas dosagens de 1,5 e 2,0 Kg ha⁻¹ e.a. Já, Mendes et al. (2007) e Santos et al. (2007) observam de que a matéria seca de plantas de soja RR tratadas com o herbicida glifosato quando elas se encontravam no mesmo estágio R1, não encontraram diferença significativa ao longo do estágio vegetativo pela aplicação de diferentes doses.

Avaliando o comportamento da altura da parte aérea da planta, percebe-se que estes não apresentaram diferenças entre os tratamentos com as testemunhas, bem como com as análises dos dados referentes ao sistema radicular para o comprimento diâmetro e peso da matéria seca das raízes.

De acordo com Reis et al. (2010), o efeito do Glifosato só é evidente em plantas não tolerantes a esta substância. Assim, até na maior concentração testada para as três

formulações mesmo associadas com o bio-herbicida, os efeitos fitotóxicos em soja RR não são acentuados, não diferindo da testemunha, pois haverá uma continuidade do desenvolvimento vegetativo pelo crescimento da haste principal que lançará novos ramos laterais nas plantas injuriadas.

Por tanto, pode se inferir que o bio-herbicida associado aos produtos comerciais testados, independente da formulação utilizada, não são tóxicos a cultura da soja, pois não ocorreu injurias que comprometessem seu desenvolvimento vegetativo. Assim, o controle biológico com o bio-herbicida a base de *T. koningiopsis* demonstra-se como uma ferramenta eficiente.

Tabela 4. Altura de planta (AP, cm), diâmetro do caule (DC, mm), massa seca do caule (MSC, g), número de folhas (NF), área foliar (AF, mm²), perímetro foliar (PF, cm), área foliar específica (AFE), massa seca das folhas (MSF, g), diâmetro médio de raiz (DMR, mm), comprimento da maior raiz (CR cm), massa seca da raiz (MSR, g), número de nós (NN), massa seca da parte aérea (MSPA, g), razão entre a MSR e MSPA (MSR/MSPA), massa seca total (MST, g) e mortalidade de plantas (MP) de *G. max* (soja) (meio de cultivo, controle), tratadas com bio-herbicida de *Trichoderma koningiopsis* (TK), combinação do extrato com o herbicida comercial Roundup Original - sal isopropilamina (RO), e o RO isoladamente na dose recomendada, realizadas aos 16 DAT. Estação/RS, UFFS, 2020.

Tratamento	AP	DC	MSC	NF	AF	PF	AFE	MSF
Controle	24 ±6,9 a	4,12 ±1,6 a	0,738 ± 0,4 ab	15,4 ±1,9 b	21,2 ±1,8 ns	244,71 ±34,8 ns	105 ±56,9 a	0,05 ± 0,07c
Tk	32,06 ±1,4 a	4,55 ±0,6 a	0,876 ± 0,2 a	13,6 ±0,9 ab	34,5 ±3,4 ns	255,58 ±25,3 ns	124,9 ±65,2 a	0,286 ± 0,05 b
Tk +RO 10%	29,26 ±5,1 a	4,17 ±0,8 a	0,514 ± 0,3 b	14,8 ±2,6 ab	24,1 ±8,2 ns	183,74 ±71,5 ns	79,83 ±161,4 ab	0,303 ± 0,04 a
Tk +RO 20%	32,78 ±3,2 a	3,82 ±0,9 a	0,537 ± 0 b	13,8 ±0,4 ab	38,6 ±5,5 ns	240,78 ±58,7 ns	108 ±94,2 a	0,358 ± 0 a
Tk +RO 50%	28,12 ±6 a	3,31 ±0,4 a	0,427 ± 0 bc	14,2 ±1,5 ab	28,5 ±4,9 ns	296,88 ±38,3 ns	100,4 ±54,0 a	0,284 ± 0,02 b
Tk +RO 70%	24,14 ±4,4 a	3,46 ±0,8 a	0,406 ± 0,1 bc	12,4 ±2,5 b	27,1 ±7,3 ns	226,16 ±76,7 ns	100,6 ±77,1 a	0,27 ± 0,02 c
Tk +RO 90%	23,22 ±6 a	3,38 ±0,4 a	0,371 ± 0,1 c	14,2 ±3,1 ab	21,8 ±3,1 ns	212,41 ±111 ns	88,34 ±50,2 ab	0,247 ± 0,03 b
Tk +RO 100%	28,44 ±2,2 a	3,99 ±0,2 a	0,464 ± 0,2 bc	17,4 ±1,1 a	19,7 ±7,2 ns	169,92 ±89 ns,3	63,71 ±165,8 b	0,31 ± 0,01 a
RO 100%	24,5 ±4,2 a	3,89 ±0,4 a	0,393 ± 0,2 c	13,6 ±1,1 ab	22,0 ±5,0 ns	231,06 ±103 ns	83,97 ±194,7 ab	0,262 ± 0,02 b
-	DMR	CR	MSR	NN	MSPA	MSR/MSPA	MST	MP
Controle	2,27 ±0,1 ab	18,26 ±8,2 ns	0,278 ± 0,11 ab	4,8 ±0,4 ns	0,739 ±0,2 a	0,37 ±0,09 a	1,017 ±0,26 ab	0 % a
Tk	2,34 ±0,4 a	17,74 ±4,1 ns	0,419 ± 0,06 a	5,4 ±0,5 ns	1,077 ±0,2 ab	0,39 ±0,07 a	1,496 ±0,18 a	0 % a
Tk +RO 10%	2,56 ±0,4 a	20,22 ±8,5 ns	0,319 ± 0,11 ab	5,2 ±1,1 ns	0,817 ±0,1 ab	0,39 ±0,1 a	1,136 ±0,23 ab	0 % a
Tk +RO 20%	2,49 ±0,8 a	19,88 ±4,9 ns	0,366 ± 0,14 ab	5 ±0,7 ns	0,895 ±0,3 ab	0,41 ±0,05 a	1,262 ±0,45 ab	0 % a
Tk +RO 50%	2,07 ±0,5 ab	19,92 ±3,3 ns	0,3 ± 0,08 ab	5,4 ±0,5 ns	0,711 ±0,1 ab	0,42 ±0,06 a	1,011 ±0,2 ab	0 % a
Tk +RO 70%	1,82 ±0,8 b	16,7 ±1 ns	0,303 ± 0,09 ab	5,4 ±1,3 ns	0,676 ±0,2 b	0,47 ±0,12 a	0,979 ±0,29 ab	0 % a
Tk +RO 90%	2,39 ±0,3 a	15,78 ±4,2 ns	0,216 ± 0,05 b	5,4 ±0,5 ns	0,618 ±0,2 b	0,36 ±0,06 a	0,834 ±0,23 b	0 % a
Tk +RO 100%	2,46 ±0,4 a	20,24 ±5,2 ns	0,263 ± 0,03 ab	5,8 ±0,8 ns	0,774 ±0,2 ab	0,35 ±0,08 a	1,036 ±0,17 ab	0 % a
RO 100%	1,9 ±0,3 b	16,16 ±1,6 ns	0,254 ± 0,04 ab	5,8 ±0,4 ns	0,655 ±0,1 b	0,39 ±0,06 a	0,909 ±0,14 b	0 % a

Dados representam média ± DP (n = 5). ¹ médias seguidas de letras iguais, dentro de cada coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey. ^{ns} não significativo a p≤0,05.

Tabela 5. Altura de planta (AP, cm), diâmetro do caule (DC, mm), massa seca do caule (MSC, g), número de folhas (NF), área foliar (AF, mm²), perímetro foliar (PF, cm), área foliar específica (AFE), massa seca das folhas (MSF, g), diâmetro médio de raiz (DMR, mm), comprimento da maior raiz (CR cm), massa seca da raiz (MSR, g), número de nós (NN), massa seca da parte aérea (MSPA, g), razão entre a MSR e MSPA (MSR/MSPA), massa seca total (MST, g) e mortalidade de plantas (MP) de *G. max* (soja) (meio de cultivo, controle), tratadas com bio-herbicida de *Trichoderma koningiopsis* (TK), combinação do extrato com o herbicida comercial Roundup WG - sal de amônio (WG), e o WG isoladamente na dose recomendada, realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020.

Tratamento	AP	DC	MSC	NF	AF	PF	AFE	MSF
Controle	24 ±6,9 ns	4,12 ±1,6 ns	0,738 ± 0,4 ns	15,4 ±1,9 ns	21,2 ±1,8 ns	244,71 ±34,8 ns	105 ±56,9 a	0,05 ± 0,07 ns
<i>Tk</i>	32,06 ±1,4 ns	4,55 ±0,6 ns	0,876 ± 0,2 ns	13,6 ±0,9 ns	34,5 ±3,4 ns	255,58 ±25,3 ns	124,9 ±65,2 a	0,286 ± 0,05 ns
<i>Tk</i> +WG 10%	27,36 ±6,3 ns	3,87 ±0,2 ns	0,528 ± 0,2 ns	16,2 ±0,8 ns	20,2 ±1,8 ns	284,42 ±38,3 ns	64,95 ±100,1 c	0,311 ± 0,01 ns
<i>Tk</i> +WG 20%	30,34 ±4,7 ns	4,53 ±0,7 ns	0,606 ± 0,2 ns	17 ±1,9 ns	35,5 ±3,4 ns	232,39 ±48,9 ns	88,07 ±121 ab	0,404 ± 0,02 ns
<i>Tk</i> +WG 50%	25,4 ±5,8 ns	3,86 ±0,2 ns	0,512 ± 0,1 ns	15,4 ±3,6 ns	31,4 ±6,2 ns	188,93 ±68,3 ns	91,96 ±175,4 a	0,342 ± 0,03 ns
<i>Tk</i> +WG 70%	27,72 ±4,8 ns	4,04 ±0,8 ns	0,559 ± 0 ns	15,8 ±2,7 ns	27,5 ±5,0 ns	185,20 ±56,7 ns	73,81 ±44,6 b	0,373 ± 0 ns
<i>Tk</i> +WG 90%	29,42 ±3 ns	3,41 ±1,3 ns	0,486 ± 0,01 ns	13,4 ±0,9 ns	20,5 ±8,9 ns	161,81 ±67,8 ns	63,27 ±40,4 c	0,324 ± 0,01 ns
<i>Tk</i> +WG 100%	28,82 ±2,4 ns	3,86 ±1,3 ns	0,48 ± 0,1 ns	14,8 ±2,2 ns	27,8 ±2,8 ns	147,53 ±56,0 ns	87 ±17,0 ab	0,32 ± 0 ns
WG 100%	27,02 ±4,1 ns	3,28 ±0,8 ns	0,426 ± 0,3 ns	14,2 ±3,4 ns	17,6 ±3,3 ns	221,21 ±76,1 ns	62,29 ±18,1 c	0,284 ± 0 ns
-	DMR	CR	MSR	NN	MSPA	MSR/MSPA	MST	MP
Controle	2,27 ±0,1 ns	18,26 ±8,2 ns	0,278 ± 0,11 ns	4,8 ±0,4 b	0,739 ±0,2 ns	0,37 ±0,09 ns	1,017 ±0,26 ns	0 % a
<i>Tk</i>	2,34 ±0,4 ns	17,74 ±4,1 ns	0,419 ± 0,06 ns	5,4 ±0,5 ab	1,077 ±0,2 ns	0,39 ±0,07 ns	1,496 ±0,18 ns	0 % a
<i>Tk</i> +WG 10%	2,63 ±0,2 ns	19,72 ±3 ns	0,446 ± 0,2 ns	5,6 ±0,5 ab	0,839 ±0,1 ns	0,54 ±0,27 ns	1,285 ±0,21 ns	0 % a
<i>Tk</i> +WG 20%	2,76 ±0,4 ns	20,58 ±2,3 ns	0,408 ± 0,13 ns	5,8 ±0,4 ab	1,01 ±0,3 ns	0,4 ±0,07 ns	1,418 ±0,42 ns	0 % a
<i>Tk</i> +WG 50%	2,43 ±0,5 ns	19,02 ±3,3 ns	0,377 ± 0,09 ns	6,6 ±0,9 a	0,854 ±0,3 ns	0,46 ±0,07 ns	1,232 ±0,4 ns	0 % a
<i>Tk</i> +WG 70%	3,18 ±0,4 ns	16,6 ±3,8 ns	0,338 ± 0,11 ns	5,6 ±0,5 ab	0,932 ±0,3 ns	0,37 ±0,05 ns	1,271 ±0,44 ns	0 % a
<i>Tk</i> +WG 90%	3,28 ±0,5 ns	17,38 ±2 ns	0,335 ± 0,1 ns	5 ±0,7 b	0,81 ±0,2 ns	0,42 ±0,06 ns	1,145 ±0,3 ns	0 % a
<i>Tk</i> +WG 100%	2,53 ±0,5 ns	18,9 ±3,1 ns	0,359 ± 0,1 ns	5 ±0 b	0,8 ±0,2 ns	0,46 ±0,03 ns	1,159 ±0,37 ns	0 % a
WG 100%	2,56 ±0,3 ns	19,76 ±4,9 ns	0,317 ± 0,13 ns	4,8 ±0,8 b	0,71 ±0,3 ns	0,5 ±0,21 ns	1,027 ±0,47 ns	0 % a

Dados representam média ± DP (n = 5). ¹ médias seguidas de letras iguais, dentro de cada coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey. ^{ns} não significativo a p≤0,05.

Tabela 6. Altura de planta (AP, cm), diâmetro do caule (DC, mm), massa seca do caule (MSC, g), número de folhas (NF), área folhar (AF, mm²), perímetro foliar (PF, cm), área foliar específica (AFE), massa seca das folhas (MSF, g), diâmetro médio de raiz (DMR, mm), comprimento da maior raiz (CR cm), massa seca da raiz (MSR, g), número de nós (NN), massa seca da parte aérea (MSPA, g), razão entre a MSR e MSPA (MSR/MSPA), massa seca total (MST, g) e mortalidade de plantas (MP) de *G. max* (soja) (meio de cultivo, controle), tratadas com bio-herbicida de *Trichoderma koningiopsis* (TK), combinação do extrato com o herbicida comercial Zapp Qi® - Sal potássico (ZQi), e o ZQi isoladamente na dose recomendada, realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020.

Tratamento	AP	DC	MSC	NF	AF	PF	AFE	MSF
Controle	24 ±6,9 a	4,12 ±1,6 ns	0,738 ± 0,4 ns	15,4 ±1,9 ns	21,2 ±1,8 ns	244,71 ±34,8 ns	105 ±56,9 a	0,05 ± 0,07 ns
<i>Tk</i>	32,06 ±1,4 a	4,55 ±0,6 ns	0,876 ± 0,2 ns	13,6 ±0,9 ns	34,5 ±3,4 ns	255,58 ±25,3 ns	124,9 ±65,2 a	0,286 ± 0,05 ns
<i>Tk</i> +ZQi 10%	31,16 ±6,7 a	4,16 ±0,7 ns	0,647 ± 0,03 ns	13,6 ±0,9 ns	26,3 ±9,0 ns	196,63 ±76,6 ns	69,21 ±126,5 bc	0,38 ± 0,04 ns
<i>Tk</i> +ZQi 20%	29,64 ±5 a	4,6 ±1,1 ns	0,539 ± 0,1 ns	12,6 ±2,5 ns	31,6 ±2,3 ns	192,50 ±36,6 ns	88,08 ±62,9 b	0,359 ± 0,02 ns
<i>Tk</i> +ZQi 50%	26,6 ±6,2 a	3,91 ±0,4 ns	0,62 ± 0 ns	13,4 ±0,9 ns	22,7 ±3,6 ns	227,06 ±26,4 ns	55,18 ±33,2 c	0,413 ± 0,04 ns
<i>Tk</i> +ZQi 70%	23,58 ±3,9 a	3,54 ±0,3 ns	0,358 ± 0,01 ns	12,2 ±1,6 ns	21,8 ±2,6 ns	155,82 ±50,7 ns	91,55 ±41,3 ab	0,239 ± 0,01 ns
<i>Tk</i> +ZQi 90%	22,38 ±1,5 a	3,75 ±0,7 ns	0,356 ± 0 ns	11,2 ±1,1 ns	18,5 ±2,2 ns	139,88 ±60,2 ns	78,23 ±33,3 bc	0,237 ± 0,01 ns
<i>Tk</i> +ZQi 100%	24,22 ±3,3 a	3,72 ±0,4 ns	0,386 ± 0,01 ns	12,2 ±1,6 ns	21,5 ±6,8 ns	140,78 ±66,7 ns	83,74 ±83,0 b	0,257 ± 0,03 ns
ZQi 100%	24,98 ±3,8 a	4,1 ±0,6 ns	0,454 ± 0 ns	12,2 ±1,6 ns	23,4 ±3,4 ns	200,53 ±65,5 ns	77,55 ±242,2 bc	0,302 ± 0,01 ns
-	DMR	CR	MSR	NN	MSPA	MSR/MSPA	MST	MP
Controle	2,27 ±0,1 ns	18,26 ±8,2 ns	0,278 ± 0,11 ns	4,8 ±0,4 abcd	0,73 ¹ ±0,2 abc	0,37 ±0,09 ns	1,017 ±0,26 abc	0 % a
<i>Tk</i>	2,34 ±0,4 ns	17,74 ±4,1 ns	0,419 ± 0,06 ns	5,4 ±0,5 ab	1,07 ¹ ±0,2 a	0,39 ±0,07 ns	1,496 ±0,18 ab	0 % a
<i>Tk</i> +ZQi 10%	2,39 ±0,9 ns	21,9 ±1,2 ns	0,382 ± 0,1 ns	5,2 ±0,4 abcd	1,02 ¹ ±0,12 abc	0,37 ±0,07 ns	1,409 ±0,2 abc	0 % a
<i>Tk</i> +ZQi 20%	2,35 ±0,4 ns	18,52 ±4,7 ns	0,35 ± 0,15 ns	5,6 ±0,5 a	0,89 ¹ ±0,34 abc	0,39 ±0,07 ns	1,248 ±0,48 abc	0 % a
<i>Tk</i> +ZQi 50%	2,44 ±0,8 ns	18,76 ±4,5 ns	0,531 ± 0,38 ns	5 ±0 abcd	1,03 ¹ ±0,38 ab	0,57 ±0,38 ns	1,564 ±0,61 a	0 % a
<i>Tk</i> +ZQi 70%	2,44 ±0,5 ns	14,6 ±7,7 ns	0,231 ± 0,05 ns	4,4 ±0,5 bcd	0,59 ¹ ±0,09 bc	0,39 ±0,12 ns	0,828 ±0,1 c	0 % a
<i>Tk</i> +ZQi 90%	2,6 ±0,7 ns	19,18 ±7,1 ns	0,319 ± 0,09 ns	4 ±0 c	0,59 ¹ ±0,06 c	0,53 ±0,12 ns	0,913 ±0,14 bc	0 % a
<i>Tk</i> +ZQi 100%	2,96 ±0,6 ns	16,8 ±3,1 ns	0,304 ± 0,07 ns	4,6 ±0,9 abcd	0,64 ¹ ±0,16 abc	0,48 ±0,09 ns	0,947 ±0,22 abc	0 % a
ZQi 100%	2,45 ±0,3 ns	18,82 ±5,1 ns	0,303 ± 0,02 ns	4,2 ±0,4 cd	0,75 ¹ ±0,18 abc	0,41 ±0,06 ns	1,059 ±0,2 abc	0 % a

Dados representam média ± DP (n = 5). ¹ médias seguidas de letras iguais, dentro de cada coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey. ^{ns} não significativo a p≤0,05.

Efeitos do bio-herbicida associado a herbicidas na planta do leiteiro

Visualmente o efeito causado pelo bio-herbicida se caracterizou principalmente pela necrose das folhas e conseqüentemente a degradação do tecido foliar. Já com o glifosato os sintomas foram, além da paralisação do crescimento e murchamento, o amarelecimento dos tecidos mais novos (clorose), seguido de necrose e frações roxo-avermelhadas (ocorre só em algumas espécies), com resultado da ação herbicida lenta de 7 a 21 DAT.

As análises de fitotoxicidade na planta do *E. heterophylla* (leiteiro) foram feitas avaliando características visuais das folhas 16 DAT (Tabela 7). Logo, foi verificado que os efeitos ocorreram de maneira semelhante aos dados morfológicos, com agravamento dos sintomas à medida que as doses aumentaram, até estabilizar em determinado tratamento.

Dentre os tratamentos aplicados, o WG apresentou maior eficiência em comparação com os demais, com índices de despigmentação total (DT) das folhas foram elevados (acima de 99%) e quase nenhum pigmento característico de planta sadia (SD), somente *Tk*+WG10% com 0,2%, que também apresentou maior índice de leve despigmentação (LD) com 79,6%.

Sintomas de Clorose (CL) foram principalmente atribuídos as concentrações *Tk*+ZQi10% com 32,5% (Figura 6, Tabela 7). Sintomas de necrose (NC) foram mais presentes com RO, onde a concentração total da dose (*Tk*+RO100%) com 21,8% (Figura 4).

O sintoma de amarelecimento (AML) foi frequente nos 3 produtos aplicados bem como em todas as doses. Entretanto ZQi apresentou sua maior porcentagem na menor dosagem aplicada (*Tk*+ZQi10%) com 39,9%, enquanto *Tk*+RO10% e *Tk*+WG10% foram de apenas 8,6% e 8,7% respectivamente. Já para arroxamento (ARX) o produto ZQi apresentou maiores sintomas também, o produto aplicado isoladamente causou os principais danos (20,3%) (Figura 6).

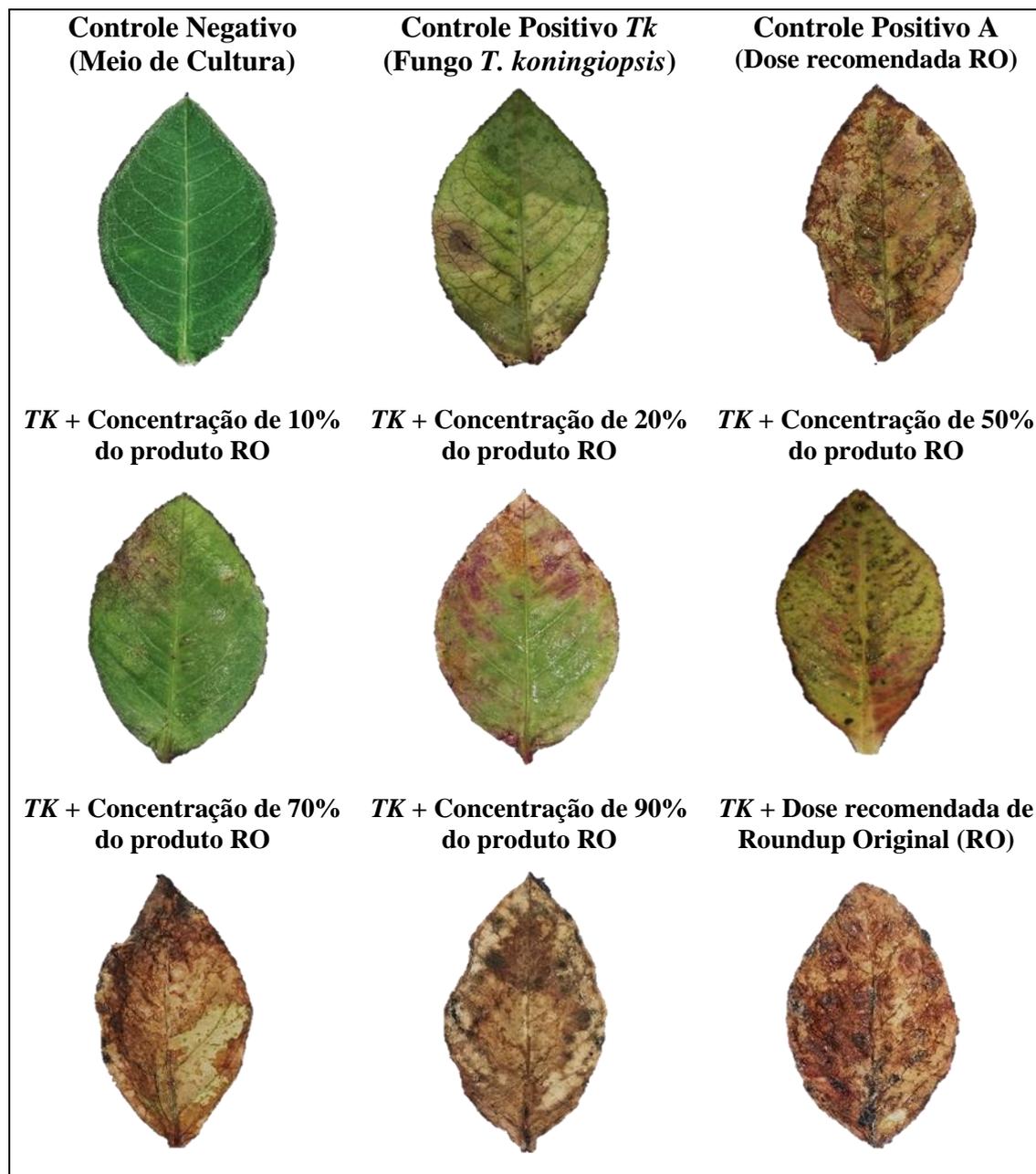


Figura 4. Comparação das lesões observadas em folhas de *E. heterophylla* (leiteiro), tratadas com meio de cultivo (controle negativo), e pelas respectivas diluições de bio-herbicida com herbicida comercial Roundup Original (Sal isopropilamina) sobre a dose de 4 L ha⁻¹, com bio-herbicida, realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020.

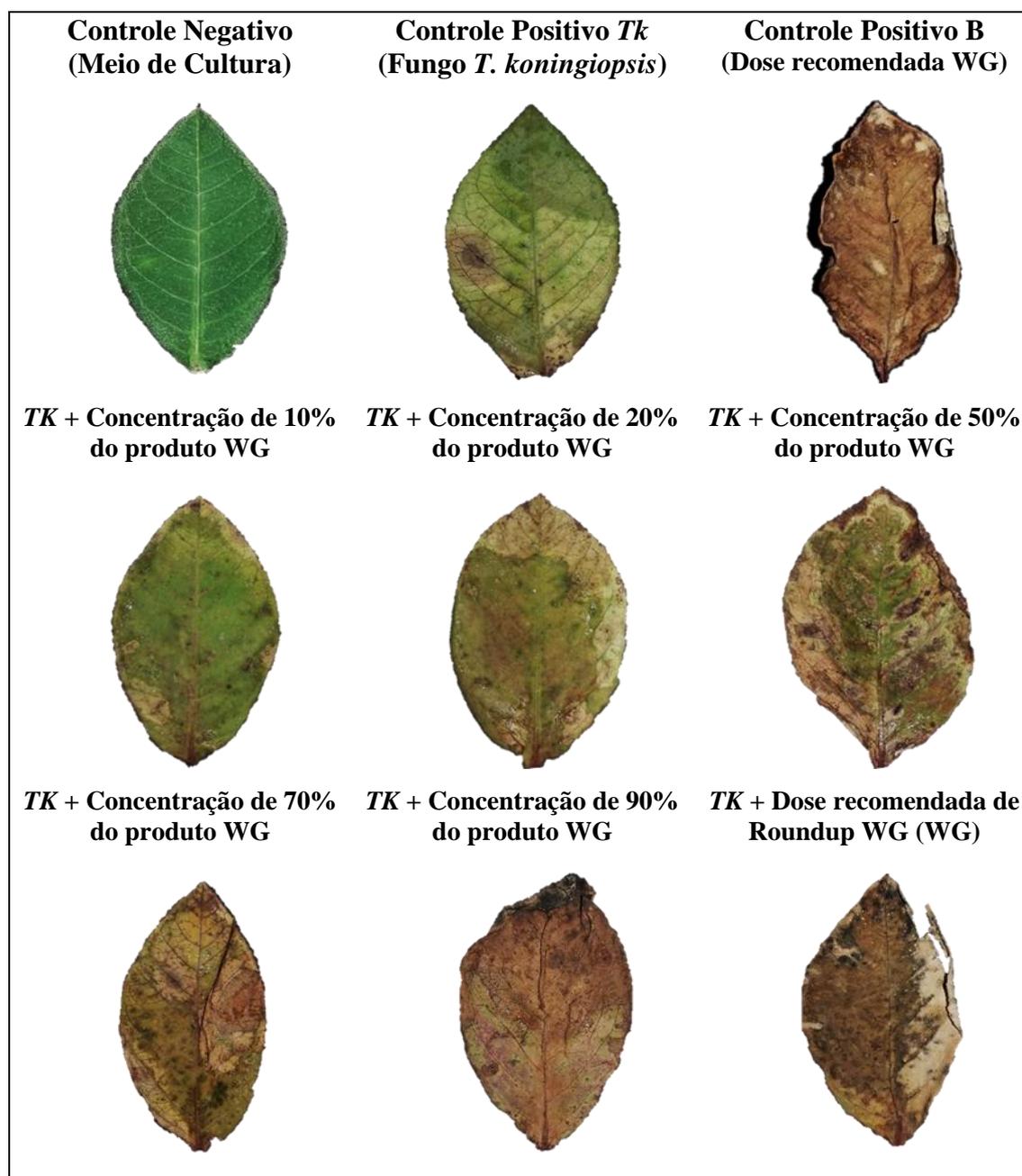


Figura 5. Comparação das lesões observadas em folhas de *E. heterophylla* (leiteiro), tratadas com meio de cultivo (controle negativo), e pelas respectivas diluições de bio-herbicida com herbicida comercial Roundup WG (Sal de amônio) sobre a dose de 1,5 Kg ha⁻¹, realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020.

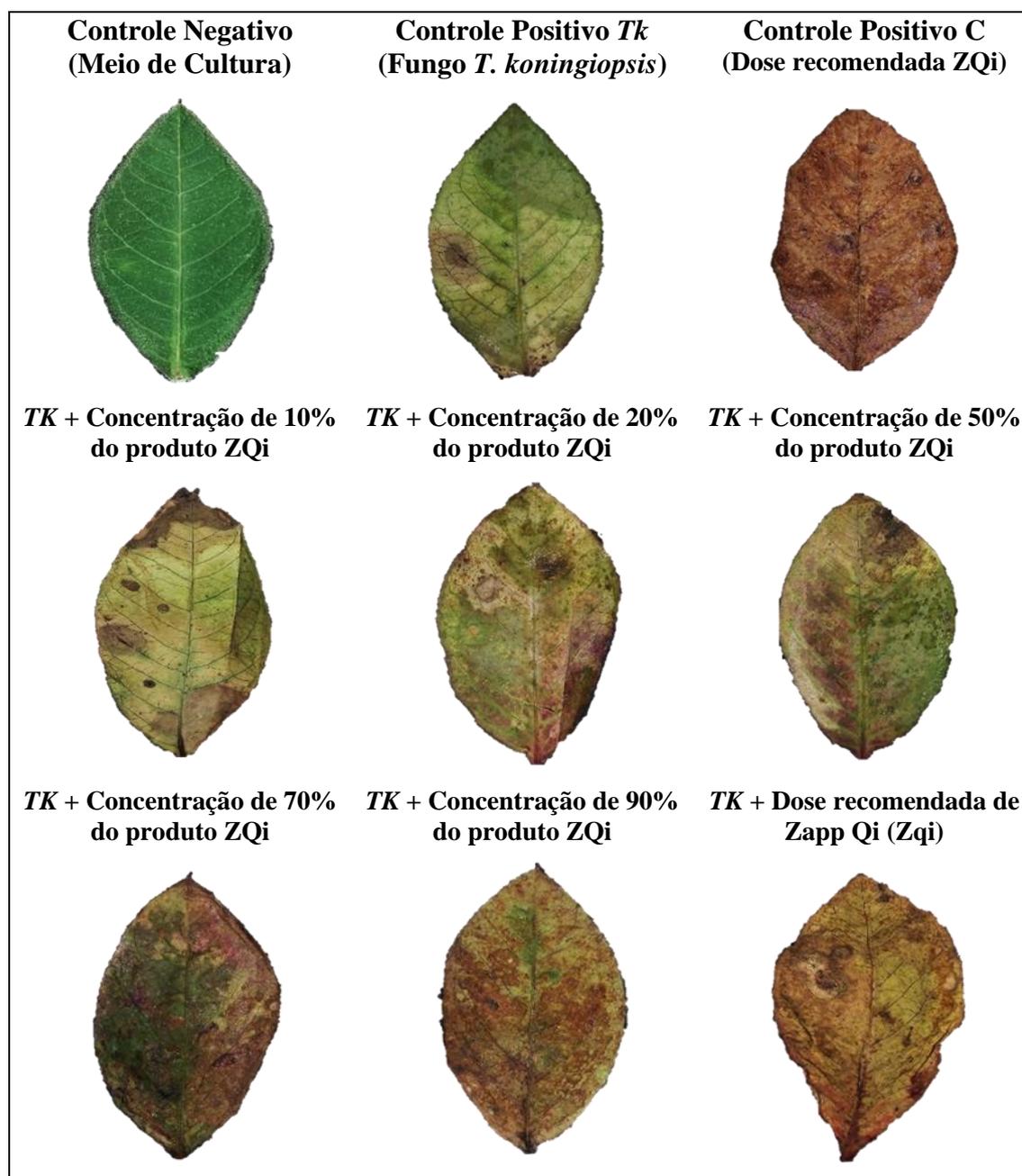


Figura 6. Comparação das lesões observadas em folhas de *E. heterophylla* (leiteiro), tratadas com meio de cultivo (controle negativo), e pelas respectivas diluições de bio-herbicida com herbicida comercial Zapp Qi® (Sal potássico) sobre a dose de 2,8 L ha⁻¹, realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020.

Tabela 7: Sintomas de fitotoxicidade visual foliar pela leve despigmentação (LD), clorose (CL), necrose (NC), amarelamento (AML), arroxeamneto (ARX), despigmentação total (DT) e sadia (SD), em *E. heterophylla* (leiteiro) (meio de cultivo, controle), tratadas com bio-herbicida de *Trichoderma koningiopsis* (TK), combinação do extrato com o herbicidas comerciais Roundup Original (RO), Roundup WG (WG) e Zapp Qi® (ZQi), realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020.

Tratamento	Percentual de sintomas (%)						
	LD	CL	NC	AML	ARX	DT	SD
Controle negativo (Meio de cultura)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	100
Controle positivo <i>Tk</i> (<i>T. koningiopsis</i>)	39,9	16,4	6,1	24,7	4,1	91,3	8,6
<i>Tk</i> + RO 10%	44,5	9,9	2,7	8,6	1,7	67,6	32,3
<i>Tk</i> + RO 20%	23,7	21,1	3,6	37,4	14,0	99,9	0,1
<i>Tk</i> + RO 50%	34,4	8,1	11,7	29,3	16,1	99,8	0,1
<i>Tk</i> + RO 70%	29,7	15,1	15,3	22,3	17,4	100	0,00
<i>Tk</i> + RO 90%	21,2	22,8	19,4	27,2	9,1	100	0,00
<i>Tk</i> + RO 100%	29,3	11,2	21,9	27,1	10,4	100	0,00
Controle Positivo A (RO 100%)	49,5	7,9	9,4	25,9	7,0	100	0,00
<i>Tk</i> + WG 10%	79,6	2,6	4,2	8,7	4,4	99,7	0,2
<i>Tk</i> + WG 20%	58,2	15,3	2,4	11,6	12,2	100	0,00
<i>Tk</i> + WG 50%	48,8	13,8	8,8	18,9	9,5	100	0,00
<i>Tk</i> + WG 70%	60,3	6,5	8,7	17,6	6,7	100	0,00
<i>Tk</i> + WG 90%	38,5	14,1	15,6	25,8	5,9	100	0,00
<i>Tk</i> + WG 100%	52,3	8,8	17,1	18,1	3,5	100	0,00
Controle Positivo B (WG 10%)	44,2	15,2	9,3	30,0	1,2	100	0,00
<i>Tk</i> + ZQi 10%	22,3	32,5	4,9	39,9	0,00	99,8	0,1
<i>Tk</i> + ZQi 20%	33,3	22,8	6,1	29,4	8,1	99,9	0,07
<i>Tk</i> + ZQi 50%	37,0	13,3	6,1	27,6	14,4	98,6	1,3
<i>Tk</i> + ZQi 70%	42,7	9,9	15,7	13,5	17,9	99,9	0,06
<i>Tk</i> + ZQi 90%	56,5	8	6,9	23,3	5,0	99,9	0,05
<i>Tk</i> + ZQi 100%	47,8	9,7	10,3	28,8	3,1	100	0,00
Controle Positivo C (ZQi 100%)	48,4	2,7	7,1	21,3	20,3	100	0,00

Diante dos resultados observados é percebido que embora o produto formulado com sal potássico (ZQi) tenha apresentado menor DT, foi o que mais apresentou sintomas de LD, CL, NC, AML e ARX, sendo que o comprometimento a longo prazo do estande é garantido, bem como quando avaliada a mortalidade plantas (Tabela 7).

O bio-herbicida pode ser considerado eficiente quando associado a todos os produtos testados, entretanto o RO e o ZQi são os que permitem maiores reduções das dosagens com total eficiência para 50% da dose recomendada, enquanto WG somente a partir de 70% da

dose. Todas as frações abaixo de 50% da dose apresentaram alguma percentagem de área saudável na folha.

O uso de 10% da dose apresentou efeitos menores, com áreas saudáveis maiores (Figuras 4, 5 e 6; e Tabela 7). Os resultados da fitotoxicidade confirmam que há comprometimento das folhas pela potencialização do efeito herbicida quanto a diluições das doses dos produtos comerciais em até 50% e que há melhor eficiência dos produtos sintéticos quando associado ao biológico.

Algumas pesquisas têm relatado que a aplicação de bio-herbicida a base de *T. koningiopsis* em *E. heterophylla* ocasionaram injúrias (Bordin et al., 2018, Reichert Júnior et al., 2019). No estudo de Camargo et al. (2020) os testes de atividade de bio-herbicida + glifosato também mostraram efeitos fitotóxicos de 100 a 80% em plantas daninhas (*E. heterophylla*, *Bidens pilosa* e *Conyza bonariensis*), o que condiz com os resultados encontrados no presente estudo.

Já no estudo de Stefanski et al. (2020), utilizando microalgas na forma crua e liofilizada como substrato para o crescimento do mesmo fungo, *Trichoderma koningiopsis*, foram observados danos fitotóxicos de até 100% após 15 dias aplicado em pós germinação de *Conyza bonariensis*.

Alguns herbicidas apresentam as maiores fitotoxicidades aos 7 dias após a aplicação (DAT), com repercussão dos sintomas de injúrias com o passar do tempo, como é o caso do glifosato até os 20 DAT. O mesmo aconteceu com o bio-herbicida, evidentemente na aplicação isolada (tratamento *TK*), em que maiores sintomas foram observados a partir dos 11 DAT.

Quando avaliado os dados morfológicos (Tabela 8), foi percebida uniformidade nos efeitos causados pelas respectivas dosagens, o produto formulado com sal isopropilamina (RO) causou maior efeito em AP pelo tratamento de *Tk+RO90%* com 22,07 cm enquanto com o controle foi de 40,12 cm. Os produtos formulados com sal de amônio (WG) (Tabela 9) sal potássico (ZQi) (Tabela 10) apresentaram maior redução da AP em *Tk+WG90%* com 29,08 cm e *Tk+ZQi100%* com 25,18 cm respectivamente. Já para comprimento de raiz foi verificado maior redução em *Tk+WG 100%* com 5,91 mm.

Na avaliação de massa seca, em MSF novamente o tratamento apresentou *Tk+RO90%* maiores danos com 0,026 g. Por outro lado, é interessante que o tratamento de *Tk + RO* que resultou em maiores perdas de peso em MSF, foi a concentração de 20% da dose recomendada em que apresenta média de 0,028 g. Em MSC e MSR não houve diferença

significativa, entretanto MST foi menor para o tratamento *Tk*+WG50% com 0,03 g embora que sua eficiência nas lavouras brasileiras atualmente mostra se comprometida tanto pelos casos de resistência de plantas daninhas como pela inviabilidade da aplicação com umidade relativa do ar alta em até 6 horas ante precipitação (Werlang et al., 2005).

No estudo de Santos, et al. (2007), quando avaliado o efeito de formulações na absorção e translocação do glifosato em soja transgênica, também foi percebido diferenças nos teores de matéria seca em função do sal presente nas formulações, principalmente o sal potássico (ZQi) que passou a representar maior quantidade relativa na massa seca total das plantas deste estudo.

Enfim, foi observada a ocorrência da morte de plantas (MP) em função dos tratamentos aplicados, no tratamento com *TK*+RO10%, 80% das plantas de *E. heterophylla* morreram. Dosagens superiores conseqüentemente ocasionaram maior comprometimento do estande de plantas, uma vez que o *TK* e RO 100%, quando isolados causam a morte de somente 70% das plantas, verificando que a associação dos dois produtos (bio-herbicida + herbicida) causa maiores efeitos a planta alvo.

Ainda cabe destacar que o tratamento de *TK*+RO50% foi o suficiente para ocasionar o controle de 100% das plantas de *E. heterophylla*. Segundo Stoppacher et al. (2010), López-Bucio, Pelagio-Flores e Herrera-Estrella (2015), espécies de *Trichoderma* spp. podem produzir diversos metabólitos secundários, dentre eles álcoois, cetonas, alcanos, furanos, ácidos entre outros, que de fato potencializaram os efeitos com o glifosato.

A teoria é que uma planta se torna resistente ao glifosato, quando o mesmo já não se move para o sítio de ação no cloroplasto, por sua vez não conseguindo inibir a produção dos aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina e fenilalanina) da enzima EPSPs (5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato-sintase) na via do shikimate (Weed Science, 2003). Em plantas daninhas resistentes ao glifosato, a associação deste herbicida com o *T. koningiopsis* pode vir a contribuir no controle através da adição do mecanismo de ação de deterioração do tecido vegetal, justificando os dados observados na presente pesquisa.

Os tratamentos com RO e ZQi apresentaram as mesmas características na mortalidade de plantas, com controle total a partir da concentração de 50%. O produto RO realizou controle total das plantas partir do tratamento *Tk*+WG70%.

Tabela 8. Altura de planta (AP, cm), diâmetro do caule (DC, mm), massa seca do caule (MSC, g), número de folhas (NF), área foliar (AF, mm²), perímetro foliar (PF, cm), área foliar específica (AFE), massa seca das folhas (MSF, g), diâmetro médio de raiz (DMR, mm), comprimento da maior raiz (CR cm), massa seca da raiz (MSR, g), número de nós (NN), massa seca da parte aérea (MSPA, g), razão entre a MSR e MSPA (MSR/MSPA), massa seca total (MST, g) e mortalidade de plantas (MP) de *E. heterophylla* (leiteiro) (meio de cultivo, controle), tratadas com bio-herbicida de *Trichoderma koningiopsis* (TK), combinação do extrato com o herbicida comercial Roundup Original - sal isopropilamina (RO), e o RO isoladamente na dose recomendada, realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020.

Tratamento	AP	DC	MSC	NF	AF	PF	AFE	MSF
Controle	40,12 ±13 ab	2,22 ±0,4 ns	0,041 ± 0,01 b	3,6 ±0,9 ns	24,3 ±2abc	173,53 ±19,5 ns	269,33 ±81,4 bc	0,10 ± 0,02 a
Tk	33,26 ±5,7abc	1,93 ±0,4 ns	0,035 ± 0,02 ab	3,0 ±0,7 ns	16,8 ±9 bcd	126,19 ±68,7 ns	245,85 ±201,8 b	0,087 ± 0,03 ab
Tk +RO 10%	31,14 ±6,9abc	2,06 ±0,1 ns	0,016 ± 0 ac	3,4 ±0,5 ns	26,4 ±5,3 ab	161,94 ±44,2 ns	555,23 ±117 ac	0,048 ± 0 cde
Tk +RO 20%	30,66 ±4,1 abc	2,12 ±0,6 ns	0,006 ± 0 b	3,6 ±0,9 ns	19,3 ±2 bcd	201,72 ±18,1 ns	559,42 ±67,7 ac	0,035 ± 0 de
Tk +RO 50%	30,08 ±6,2abc	1,53 ±0,7 ns	0,009 ± 0 b	3,4 ±0,9 ns	18,2 ±6 bcd	148,75 ±58,7 ns	267,90 ±96,5 bc	0,07 ± 0,01 ac
Tk +RO 70%	34,52 ±5,2abc	1,96 ±0,8 ns	0,007 ± 0 b	3,8 ±0,8 ns	14,8 ±2,6 bc	137,91 ±90,1 ns	271,94 ±62,8 bc	0,055 ± 0 abcd
Tk +RO 90%	22,07 ±2,9 c	1,64 ±0,4 ns	0,008 ± 0 b	3,0 ±0,7 ns	13,0 ±5,5 d	113,04 ±72,4 ns	282,87 ±207 bc	0,059 ± 0,1cde
Tk +RO 100%	41,87 ±5 a	2,39 ±0,6 ns	0,003 ± 0 b	3,8 ±0,8 ns	15,2 ±5,5 bc	151,16 ±81,1 ns	615,68 ±243 a	0,026 ± 0,01 e
RO 100%	27,27 ±2,9 bc	2,39 ±0,4 ns	0,042 ± 0,01 b	2,6 ±0,5 ns	31,0 ±3,2 a	165,85 ±21,9 ns	338,95 ±51 abc	0,092 ± 0,01 a
-	DMR	CR	MSR	NN	MSPA	MSR/MSPA	MST	MP
Controle	2,00 ±0,1 b	21,20 ±4,0 ab	0,011 ± 0 ns	4 ±1,4 ns	0,136 ±0,03 a	0,09 ±0,02 ns	0,148 ±0,03 a	0 % c
Tk	2,14 ±0,3 ab	23,86 ±0,9 ab	0,009 ± 0,01 ns	4,2 ±1,3 ns	0,122 ±0,04 a	0,07 ±0,03 ns	0,131 ±0,05 ab	70 % b
Tk +RO 10%	1,98 ±0,3 b	17,03 ±4,7 bc	0,006 ± 0 ns	3,4 ±0,5 ns	0,064 ±0 bc	0,09 ±0,02 ns	0,070 ±0 c	80 % ab
Tk +RO 20%	1,93 ±0,2 b	10,56 ±3,8 cd	0,004 ± 0 ns	3,8 ±0,8 ns	0,041 ±0 bc	0,09 ±0,03 ns	0,045 ±0 c	90 % ab
Tk +RO 50%	1,91 ±0,1 b	11,47 ±2 cd	0,002 ± 0 ns	3,6 ±0,9 ns	0,078 ±0,01 b	0,03 ±0,03 ns	0,081 ±0,01 bc	100 % a ¹
Tk +RO 70%	1,81 ±0,1 b	8,04 ±2,2 d	0,019 ± 0,04 ns	4,2 ±1 ns	0,063 ±0 bc	0,31 ±0,63 ns	0,081 ±0,04 bc	100 % a
Tk +RO 90%	1,87 ±0,1 b	8,07 ±2,7 d	0,002 ± 0 ns	4,2 ±1,6 ns	0,067 ±0,02 bc	0,04 ±0,04 ns	0,069 ±0,02 c	100 % a
Tk +RO 100%	1,83 ±0,1 b	6,82 ±1,8 d	0,007 ± 0,01 ns	3,6 ±0,9 ns	0,029 ±0,01 c	0,28 ±0,56 ns	0,036 ±0,01 c	100 % a
RO 100%	2,43 ±0,1 a	27,69 ±9,1 a	0,012 ± 0 ns	3,6 ±0,5 ns	0,135 ±0,02 a	0,09 ±0,02 ns	0,147 ±0,02 a	70 % b

Dados representam média ± DP (n = 5). ¹ médias seguidas de letras iguais, dentro de cada coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey. ^{ns} não significativo a p≤0,05.

Tabela 9. Altura de planta (AP, cm), diâmetro do caule (DC, mm), massa seca do caule (MSC, g), número de folhas (NF), área foliar (AF, mm²), perímetro foliar (PF, cm), área foliar específica (AFE), massa seca das folhas (MSF, g), diâmetro médio de raiz (DMR, mm), comprimento da maior raiz (CR cm), massa seca da raiz (MSR, g), número de nós (NN), massa seca da parte aérea (MSPA, g), razão entre a MSR e MSPA (MSR/MSPA), massa seca total (MST, g) e mortalidade de plantas (MP) de *E. heterophylla* (leiteiro) (meio de cultivo, controle), tratadas com bio-herbicida de *Trichoderma koningiopsis* (TK), combinação do extrato com o herbicida comercial Roundup WG - sal de amônio (WG), e o WG isoladamente na dose recomendada, realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020.

Tratamento	AP	DC	MSC	NF	AF	PF	AFE	MSF
Controle	40,12 ±13,3 a	2,22 ±0,4 ns	0,041 ± 0,01 bc	3,6 ±0,9 ns	24,3 ± 2,6 c	173,53 ±19,5 ns	269,33 ±81 bc	0,10 ± 0,02 b
Tk	33,26 ±5,7 a	1,93 ±0,4 ns	0,035 ± 0,02 bc	3,0 ±0,7 ns	16,8 ± 9abc	126,19 ±68,7 ns	245,85 ±202 bc	0,087 ± 0,03 b
Tk +WG 10%	38,94 ±12,3 a	2,70 ±0,6 ns	0,014 ± 0 c	3,4 ±1,1 ns	19,0 ± 6abc	158,06 ±46,1 ns	505,25 ±189 c	0,038 ± 0 b
Tk +WG 20%	29,78 ±3,3 a	2,26 ±0,3 ns	0,005 ± 0 c	3,6 ±0,5 ns	21,1 ± 4,2 ac	193,31 ±26,4 ns	779,27 ±214 a	0,028 ± 0 b
Tk +WG 50%	34,70 ±8,2 a	2,40 ±0,4 ns	0,008 ± 0 c	3,2 ±0,8 ns	18,9 ± 1 abc	128,64 ±63 ns	348,69 ±69,8 c	0,056 ± 0,01 b
Tk +WG 70%	39,86 ±10,7 a	2,11 ±1 ns	0,006 ± 0 c	3,4 ±0,5 ns	11,9 ± 2,1 ab	110,97 ±72,1 ns	270,37 ±63 bc	0,045 ± 0 b
Tk +WG 90%	29,08 ±10,4 a	2,19 ±0,8 ns	0,201 ± 0,06 a	3,4 ±1,1 ns	16,0 ± 5abc	100,27 ±57,9 ns	47,83 ±26,5 b	0,389 ± 0,14 a
Tk +WG 100%	32,46 ±7,9 a	1,78 ±1,6 ns	0,079 ± 0,04 b	3,0 ±0,7 ns	10,4 ± 4,4 b	151,80 ±81,2 ns	34,12 ±28,4 b	0,435 ± 0,2 a
WG 100%	42,32 ±10 a	2,28 ±0,4 ns	0,037 ± 0,01 bc	3,8 ±1,3 ns	24,8 ± 2,6 c	140,95 ±31,3 ns	338,50 ±51 c	0,074 ± 0,01 b
-	DMR	CR	MSR	NN	MSPA	MSR/MSPA	MST	MP
Controle	2,00 ±0,1 ab	21,2 ±4,0 ab	0,011 ± 0	4 ±1,4 ns	0,136 ±0,03 b	0,09 ±0,02 ns	0,148 ±0,03 b	0 % c
Tk	2,14 ±0,3 a	23,8 ±0,9 b	0,009 ± 0,01	4,2 ±1,3 ns	0,122 ±0,04 b	0,07 ±0,03 ns	0,131 ±0,05 b	70 % b
Tk +WG 10%	1,72 ±0,3 bc	14,7 ±4 ac	0,005 ± 0	3 ±0,7 ns	0,052 ±0 b	0,10 ±0,03 ns	0,057 ±0 b	50 % bc
Tk +WG 20%	1,68 ±0,1 bc	9,15 ±3,3 cd	0,003 ± 0	3 ±0,7 ns	0,033 ±0 b	0,10 ±0,02 ns	0,036 ±0 b	60 % b
Tk +WG 50%	1,65 ±0,1 c	9,94 ±1,7 cd	0,002 ± 0	4,4 ±1,3 ns	0,063 ±0,01 b	0,04 ±0,03 ns	0,065 ±0,01 b	80 % ab
Tk +WG 70%	1,57 ±0,1 c	6,97 ±1,9 d	0,016 ± 0,03	4 ±1,4 ns	0,051 ±0 b	0,33 ±0,67 ns	0,067 ±0,03 b	100 % a
Tk +WG 90%	1,62 ±0,1 c	6,99 ±2,3 d	0,195 ± 0,05	3,4 ±1,5 ns	0,590 ±0,18 a	0,34 ±0,07 ns	0,785 ±0,23 a	100 % a
Tk +WG 100%	1,58 ±0,1 c	5,91 ±1,5 d	0,079 ± 0,04	3,8 ±0,8 ns	0,514 ±0,25 a	0,13 ±0,05 ns	0,593 ±0,29 a	100 % a
WG 100%	2,11 ±0,1 a	24,0 ±7,9 b	0,010 ± 0	3,6 ±0,9 ns	0,111 ±0,01 b	0,09 ±0,02 ns	0,121 ±0,01 b	90 % ab

Dados representam média ± DP (n = 5). ¹ médias seguidas de letras iguais, dentro de cada coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey. ^{ns} não significativo a p≤0,05.

Tabela 10. Altura de planta (AP, cm), diâmetro do caule (DC, mm), massa seca do caule (MSC, g), número de folhas (NF), área folhar (AF, mm²), perímetro foliar (PF, cm), área foliar específica (AFE), massa seca das folhas (MSF, g), diâmetro médio de raiz (DMR, mm), comprimento da maior raiz (CR cm), massa seca da raiz (MSR, g), número de nós (NN), massa seca da parte aérea (MSPA, g), razão entre a MSR e MSPA (MSR/MSPA), massa seca total (MST, g) e mortalidade de plantas (MP) de *E. heterophylla* (leiteiro) (meio de cultivo, controle), tratadas com bio-herbicida de *Trichoderma koningiopsis* (TK), combinação do extrato com o herbicida comercial Zapp Qi® - Sal potássico (ZQi), e o ZQi isoladamente na dose recomendada, realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020.

Tratamento	AP	DC	MSC	NF	AF	PF	AFE	MSF
Controle	40,12 ±3,3 ns	2,22 ±0,4 ns	0,041 ± 0,01 ab	3,6 ±0,9 ns	24,3 ±2,6 ab	173,53 ±19,5 ns	269,33 ±81,4 ab	0,10 ± 0,02 b
<i>Tk</i>	33,26 ±5,7 ns	1,93 ±0,4 ns	0,035 ± 0,02 ab	3,0 ±0,7 ns	16,8 ±9,2 bc	126,19 ±68,7 ns	245,85 ±109 ab	0,087 ± 0,03 b
<i>Tk</i> +ZQi 10%	25,50 ±4,7 ns	2,37 ±0,5 ns	0,021 ± 0,01 bc	3,8 ±1,3 ns	21,9 ±4,1 abc	132,30 ±35,8 ns	361,02 ±78,7 ab	0,061 ± 0 b
<i>Tk</i> +ZQi 20%	29,10 ±3,8 ns	1,70 ±0,1 ns	0,009 ± 0 c	3,6 ±1,1 ns	15,4 ±2,3 bc	155,28 ±21,1 ns	348,84 ±41,4 ab	0,044 ± 0,01 b
<i>Tk</i> +ZQi 50%	33,62 ±5,9 ns	2,25 ±0,5 ns	0,012 ± 0 c	3,6 ±1,1 ns	15,2 ±4,2 bc	106,38 ±47,4 ns	173,84 ±51,5 b	0,089 ± 0,01 b
<i>Tk</i> +ZQi 70%	31,96 ±6,7 ns	2,52 ±0,8 ns	0,010 ± 0 c	4,0 ±1 ns	12,7 ±2,2 c	94,12 ±54,3 ns	180,51 ±41,5 b	0,071 ± 0 b
<i>Tk</i> +ZQi 90%	29,94 ±9,8 ns	2,64 ±0,8 ns	0,005 ± 0,01 c	3,6 ±1,1 ns	14,7 ±6,7 bc	94,21 ±60,5 ns	107,38 ±103,7 b	0,253 ± 0,16 a
<i>Tk</i> +ZQi 100%	25,18 ±6,6 ns	2,07 ±0,5 ns	0,003 ± 0 c	3,0 ±1 ns	16,3 ±4,8 bc	136,14 ±59,1 ns	520,16 ±102,5 a	0,038 ± 0,02 b
ZQi 100%	26,72 ±2,8 ns	2,17 ±0,8 ns	0,056 ± 0,01 a	3,6 ±0,9 ns	30,7 ±3,8 a	126,91 ±42,7 ns	259,97 ±32,1 ab	0,118 ± 0,01 b
-	DMR	CR	MSR	NN	MSPA	MSR/MSPA	MST	MP
Controle	2,00 ±0,1 c	21,20 ±4 bc	0,011 ± 0 ns	4 ±1,4 ns	0,13 ±0,03 abc	0,09 ±0,02 ns	0,148 ±0,03 abc	0 % c
<i>Tk</i>	2,14 ±0,3 bc	23,86 ±0,9 b	0,009 ± 0,01 ns	4,2 ±1,3 ns	0,12 ±0,04 bc	0,07 ±0,03 ns	0,131 ±0,05 abc	70 % b
<i>Tk</i> +ZQi 10%	2,65 ±0,4 ab	22,70 ±6,2 b	0,008 ± 0 ns	3,6 ±0,9 ns	0,08 ±0 bc	0,09 ±0,02 ns	0,090 ±0,01 bc	90 % ab
<i>Tk</i> +ZQi 20%	2,58 ±0,2 bc	14,09 ±5 bcd	0,005 ± 0 ns	4 ±1,4 ns	0,05 ±0,01 bc	0,10 ±0,02 ns	0,058 ±0,01 c	90 % ab
<i>Tk</i> +ZQi 50%	2,54 ±0,2 bc	15,29 ±3 bcd	0,003 ± 0 ns	3,4 ±1,5 ns	0,10 ±0,02 bc	0,03 ±0,03 ns	0,104 ±0,02 bc	100 % a
<i>Tk</i> +ZQi 70%	2,36 ±0,1 bc	9,30 ±2,2 d	0,026 ± 0,05 ns	3,6 ±0,9 ns	0,08 ±0,01 bc	0,33 ±0,64 ns	0,106 ±0,05 bc	100 % a
<i>Tk</i> +ZQi 90%	2,47 ±0,2 bc	11,34 ±4 bd	0,002 ± 0 ns	3,6 ±0,5 ns	0,25 ±0,16 a	0,004 ±0 ns	0,259 ±0,17 a	100 % a
<i>Tk</i> +ZQi 100%	2,75 ±0,7 ab	8,61 ±3,1 d	0,009 ± 0,02 ns	3,8 ±1,3 ns	0,04 ±0,02 c	0,16 ±0,31 ns	0,050 ±0,03 c	100 % a
ZQi 100%	2,24 ±0,2 a	36,92 ±12 a	0,016 ± 0 ns	3,4 ±1,1 ns	0,17 ±0,02 ab	0,09 ±0,02 ns	0,191 ±0,02 ab	100 % a

Dados representam média ± DP (n = 5). ¹ médias seguidas de letras iguais, dentro de cada coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey. ^{ns} não significativo a p≤0,05.

Efeitos do bio-herbicida associado a herbicidas na planta do papuã

Os resultados observados visualmente nas folhas da planta de *B. plantaginea* (papuã) quando exposta a misturas de diferentes dosagens de RO (Figura 4), WG (Figura 5) e ZQi (Figura 6) com bio-herbicida a base de *T. koningiopsis* (TK), demonstram alterações nas respectivas colorações que estão mensuradas na Tabela 11, através das proporções de sintomas descritos em porcentagem (%).

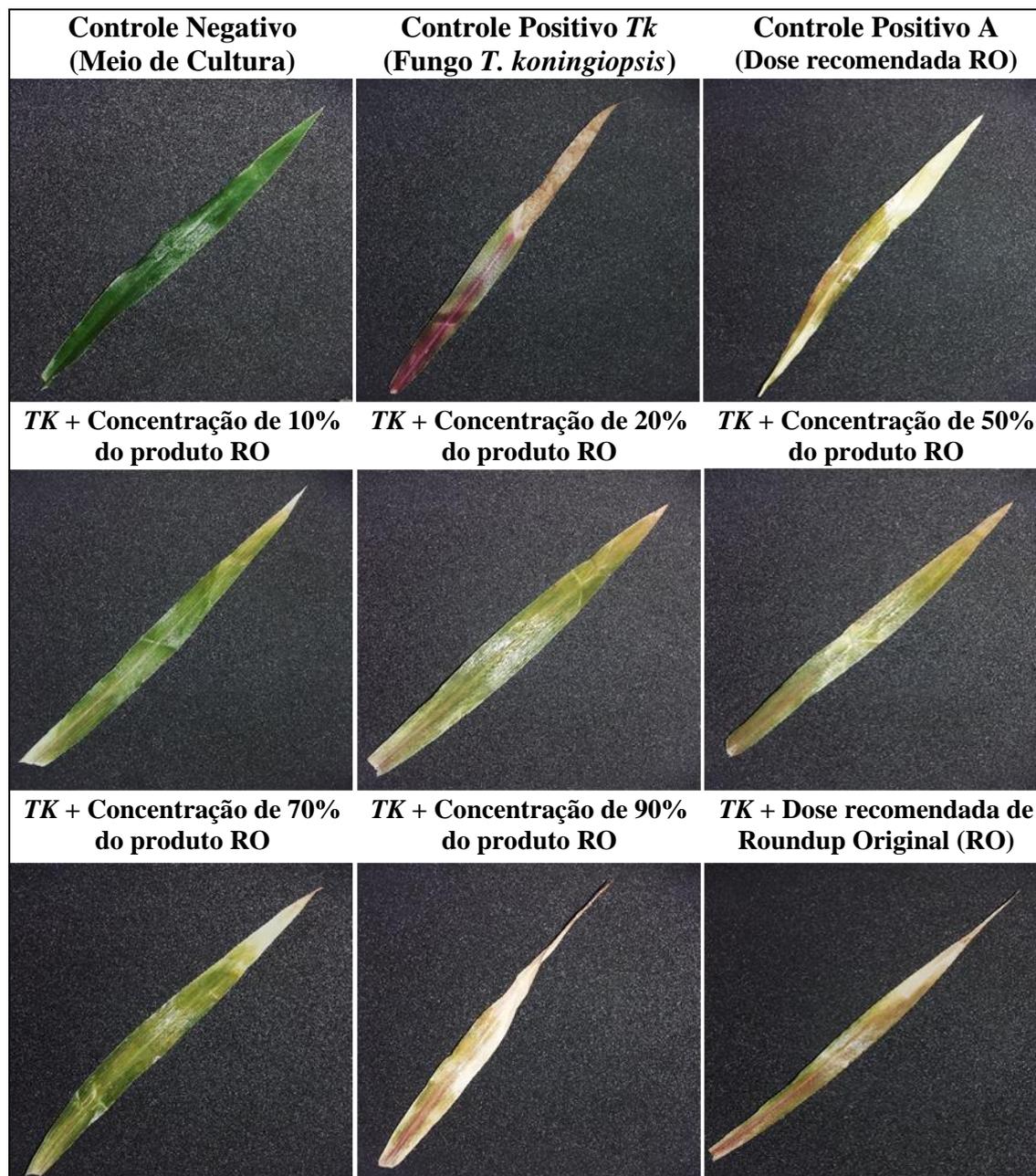


Figura 7. Comparação das lesões observadas em folhas de *B. plantaginea* (papuã), tratadas com meio de cultivo (controle negativo), e pelas respectivas diluições de bio-herbicida com herbicida comercial Roundup Original (Sal isopropilamina) sobre a dose de 1 L ha⁻¹, realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020.

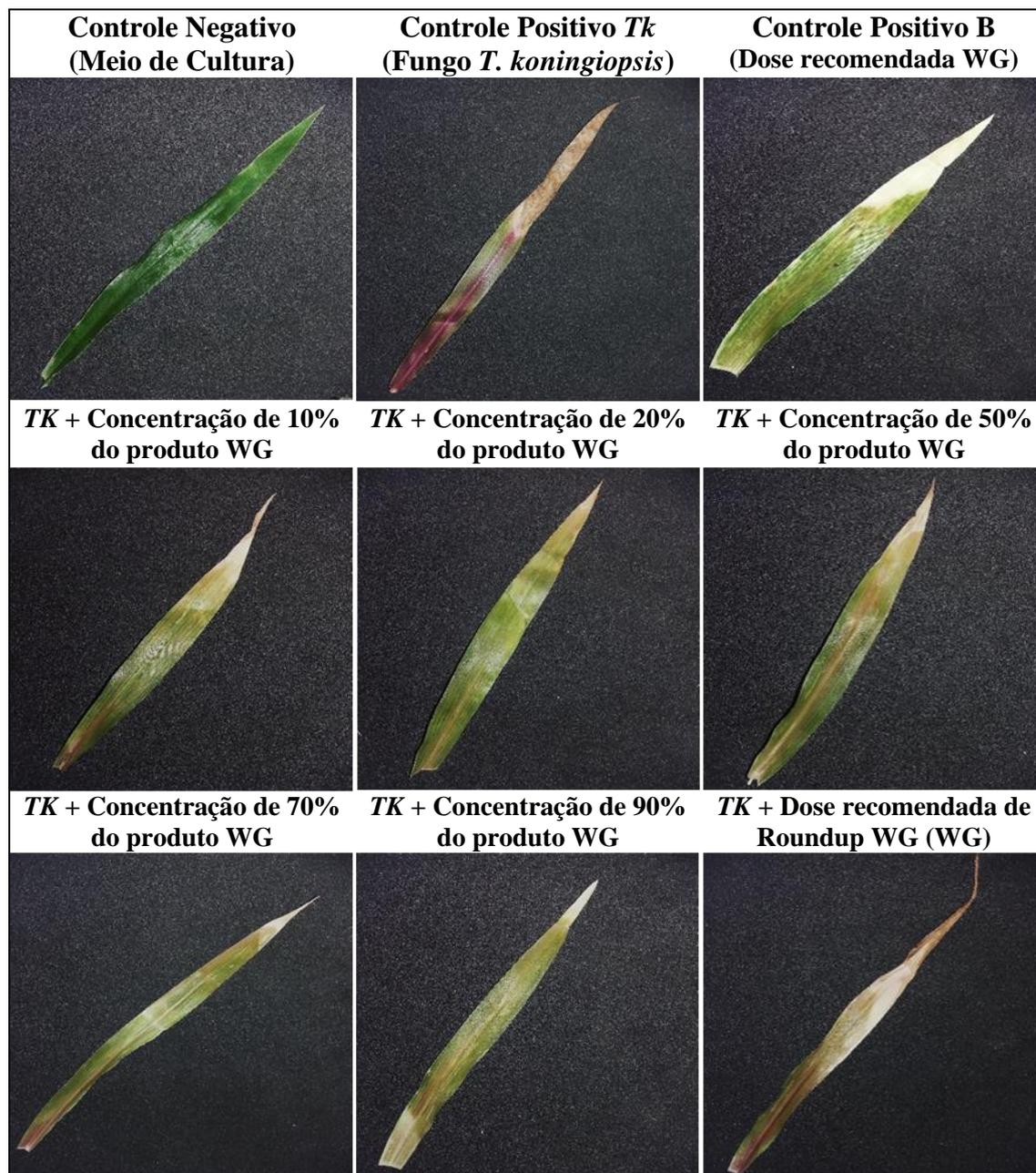


Figura 8. Comparação das lesões observadas em folhas de *B. plantaginea* (papuã), tratadas com meio de cultivo (controle negativo), e pelas respectivas diluições de bio-herbicida com herbicida comercial Roundup WG (Sal de amônio) sobre a dose de 0,5 Kg ha⁻¹, realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020.

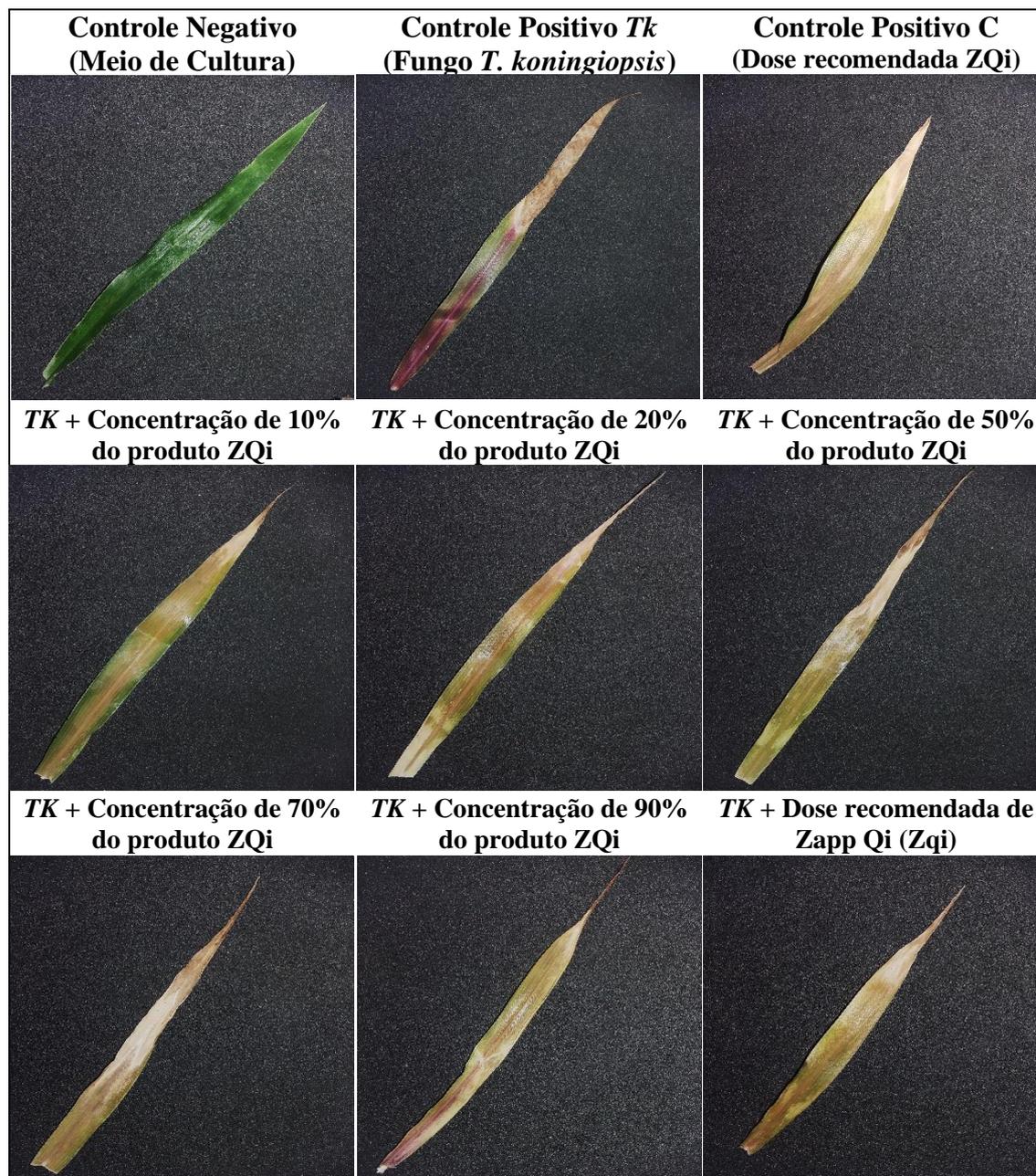


Figura 9. Comparação das lesões observadas em folhas de *B. plantaginea* (papuã), tratadas com meio de cultivo (controle negativo), e pelas respectivas diluições de bio-herbicida com herbicida comercial Zapp Qi® (Sal potássico) sobre a dose de 1,5 L ha⁻¹, realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020.

Tabela 11: Sintomas de fitotoxicidade visual foliar pela leve despigmentação (LD), clorose (CL), necrose (NC), amarelamento (AML), arroxeamneto (ARX), despigmentação total da planta (DT) e sadia (SD), em *B. plantaginea* (papuã) (meio de cultivo, controle), tratadas com bio-herbicida de *Trichoderma koningiopsis* (TK), combinação do extrato com o herbicidas comerciais Roundup Original (RO), Roundup WG (WG) e Zapp Qi® (ZQi), realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020.

Tratamento	Percentual de sintomas (%)						
	LD	CL	NC	AML	ARX	DT	SD
Controle negativo (Meio de cultura)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	100
Controle positivo <i>Tk</i> (<i>T. koningiopsis</i>)	39,6	17,8	1,8	14,9	18,9	93,1	6,8
<i>Tk</i> + RO 10%	54,8	18,0	0,00	17,3	0,00	90,2	9,7
<i>Tk</i> + RO 20%	52,0	8,0	1,2	30,1	0,4	91,9	8,0
<i>Tk</i> + RO 50%	48,4	14,6	1,3	30,1	0,5	95,1	4,8
<i>Tk</i> + RO 70%	53,0	9,1	0,00	31,8	0,00	94,0	5,9
<i>Tk</i> + RO 90%	44,4	25,5	2,0	23,6	4,3	100	0,00
<i>Tk</i> + RO 100%	55,9	18,0	1,8	20,0	3,1	98,9	1,0
Controle Positivo A (RO 100%)	38,7	36,5	0,00	24,7	0,00	100	0,00
<i>Tk</i> + WG 10%	42,1	19,7	2,0	28,4	0,00	92,8	7,1
<i>Tk</i> + WG 20%	60,6	14,0	1,4	14,2	0,00	90,3	9,6
<i>Tk</i> + WG 50%	47,0	10,2	3,5	25,9	0,4	87,3	12,6
<i>Tk</i> + WG 70%	54,0	17,3	0,1	19,9	0,7	92,2	7,7
<i>Tk</i> + WG 90%	57,0	17,9	0,00	22,7	0,2	98	2,0
<i>Tk</i> + WG 100%	31,4	15,3	0,00	35,5	14,5	96,9	3,0
Controle Positivo B (WG 100%)	43,6	25,7	0,00	17,3	0,00	86,7	13,2
<i>Tk</i> + ZQi 10%	59,3	7,8	0,00	23,9	0,3	91,5	8,4
<i>Tk</i> + ZQi 20%	47,1	26,7	0,00	20,2	5,6	99,8	0,1
<i>Tk</i> + ZQi 50%	52,3	22,6	0,1	23,5	0,00	98,6	1,3
<i>Tk</i> + ZQi 70%	55,6	18,2	0,00	20,4	5,4	99,8	0,1
<i>Tk</i> + ZQi 90%	44,7	26,2	1,0	13,9	13,6	99,6	0,3
<i>Tk</i> + ZQi 100%	45,4	22,7	0,00	30,0	1,1	99,4	0,5
Controle Positivo C (ZQi 100%)	36,1	29,3	0,00	33,6	0,9	100	0,00

A fitotoxicidade das folhas mostra relação entre MSF e danos visuais causados, principalmente em *Tk*+WG50% que teve o menor valor de MSF (0,034 g) como também o maior percentual de 3,5% em necrose das folhas (NC). A despigmentação total (DTP) foi de 87,3%.

Sintomas de LD foram maiores em *Tk*+WG20% (60,6%), CL em RO100% (36,51%) (Figura 7), AML no *Tk*+WG100% (35,5%) e ARX no próprio *TK* isolado com 18,9%.

Demais doses de ZQi não diferiram entre si, entretanto é o herbicida que apresentou menores índices de planta saudável (SD) (Figura 9).

Nas aplicações associadas do bio-herbicida com os produtos comerciais, é percebido que todos os tratamentos, principalmente para o herbicida Zapp Qi®, apresentam elevados índices de CL desde o tratamento com 20% da concentração (CL, 26,7%), uma vez que estes sintomas são incapaz de recuperação pelo vegetal prejudicando a área total da folha para produção de fotossíntese (Gazziero e Neumaier, 1985).

Pode ser observado que sintomas leves (LD, AML) foram principalmente presentes em baixas dosagens, o que pode coincidir com o surgimento de plantas resistentes caso estas sobrevivam para se reproduzir, pois igualmente DP total e o MP foram inferiores.

Quando utilizado o glifosato, sabe-se que sintomas de ARX pode ocorrer em apenas algumas espécies, entretanto TK quando isolado apresentou esta pigmentação na planta testada, enquanto nas doses dos herbicidas isolados não demonstraram grandes porcentagens dela, sugerindo que ARX é sintoma de *T. koningiopsis* em *B. plantaginea*.

Há muitos relatos na literatura científica sobre a aplicabilidade de diversos produtos biológicos associados ao glifosato perante a sua ampla eficiência de controle de plantas daninhas, mas sua capacidade de aplicação em campos agrícolas ainda é pouco estudada quando se trata da interação com produtos biológicos (Camargo et al., 2020; Bordin et al., 2018; Reichert Júnior et al., 2019).

Trabalhos como de Basso et al. (2018) trazem a eficiência no manejo de plantas daninhas em milho RR® com herbicidas aplicados isoladamente ou associados ao glifosato, constataram que dependendo da associação de herbicidas, ocorre efeito sinérgico tanto para o controle das plantas daninhas como para a fitotoxicidade da cultura.

Os dados morfológicos analisados para a planta de *B. plantaginea* quando exposta a misturas de diferentes dosagens de RO (Tabela 12), WG (Tabela 13) e ZQi (Tabela 14) com bio-herbicida a base de *T. koningiopsis* (TK), demonstram interferências no desenvolvimento fisiológico, a paralização de crescimento foi constante com maiores interferências para dosagem de Tk+RO90% com AP 23,38 cm, as testemunhas apresentaram média de 26,64 cm. Tk+ZQi100% apresentou 21,66 cm de AP, cabe ressaltar que na dose de Tk+ZQi50% os valores foram inferiores, com 17,54 cm.

Para DMR maiores interferências foram avaliadas para TK isolado com 1,19 mm, enquanto ZQi menor valor em Tk+ZQi90% com 1,65 cm. Maiores danos foram atribuídos ao Tk+WG90% de 1,09 mm. Igualmente CR foi menor em Tk+WG100% com 6,87 mm.

menor valor de MSR, 0,002 g para *Tk*+WG70%. Diante desses dados discutidos é possível constatar que o produto WG (Roundup WG, sal de amônio), apresenta danos principalmente quando avaliado o sistema radicular da planta de forma que esses efeitos podem ser atribuídos aos sais presentes em sua formulação, potencializando a ação sistêmica e translocação que pode ocorrer pelo xilema, floema ou por ambos (Weed Science, 2003).

Em MSPA, RO100% apresentou o maior dano de 0,034 g, e 0,037 para *Tk*+WG50%. MST foi menor para 0,041 g no tratamento com *Tk*+WG50%.

As diferentes formulações de glifosato associadas ao fungo resultaram no controle de pelo menos 60% das plantas de *B. plantaginea*. Quando observado a mortalidade total (MP de 100%) das doses testadas, danos foram atribuídos em apartir até ZQi50% + o bio-herbicida.

Testes com associações de produtos ao glifosato são de fundamental relevância considerando também prejuízos as culturas, Forte et al. (2019) verificaram os feitos do glifosato e fertilizantes foliares na soja resistente ao glifosato (GR), e concluíram que a dose de glifosato para soja deve ser primordialmente respeitada e os fertilizantes foliares devem ser cuidadosamente estudados antes da recomendação, pois podem causar perca de seletividade a cultura quando não manejados adequadamente.

Também, avaliando a seletividade de diferentes formulações de glifosato a estirpes de *Bradyrhizobium*, Santos et al. (2004) verificaram que a única formulação que continha sal potássico (Zapp® Qi) apresentou menor toxicidade, porem não observou correlação entre o tipo de sal (isopropilamina, amônio ou potássico), presentes na formulação herbicida.

Em outros estudos, ainda com efeitos de diferentes formulações, mas na absorção e translocação do glifosato, Santos et al. (2007) alertam sobre concentrações de glifosado presente na parte aérea da soja transgênica e que o herbicida R. Transorb® (sal de isopropilamina) pode prejudicar a simbiose entre rizóbio e soja, sendo que o microssimbionte também apresenta a EPSPS em seu metabolismo.

Isso nos permite inferir que o bio-herbicida associado aos produtos comerciais testados, independente da formulação utilizada (RO, WG e ZQi), causam injúrias severas na planta daninha do papuã com mortalidade de 60% a 70% das plantas com o biocontrole associado as concentrações de 10% das doses dos produtos comerciais, oque para os agricultores já podem ser resultados promissores no controle de plantas invasoras nas culturas agrícolas.

Tabela 12. Altura de planta (AP, cm), diâmetro do caule (DC, mm), massa seca do caule (MSC, g), número de folhas (NF), área folhar (AF, mm²), perímetro foliar (PF, cm), área foliar específica (AFE), massa seca das folhas (MSF, g), diâmetro médio de raiz (DMR, mm), comprimento da maior raiz (CR cm), massa seca da raiz (MSR, g), número de nós (NN), massa seca da parte aérea (MSPA, g), razão entre a MSR e MSPA (MSR/MSPA), massa seca total (MST, g) e mortalidade de plantas (MP) de *B. plantaginea* (papuã) (meio de cultivo, controle), tratadas com bio-herbicida de *Trichoderma koningiopsis* (TK), combinação do extrato com o herbicida comercial Roundup Original - sal isopropilamina (RO), e o RO isoladamente na dose recomendada, realizadas aos 16 DAT. Estação/RS, UFFS, 2020.

Tratamento	AP	DC	MSC	NF	AF	PF	AFE	MSF
Controle	29,86 ±7,3 a	3,12 ±0,5 ns	0,029 ± 0,01 a	5,4 ±0,9 ns	16,8 ±2,3 ns	203,09 ±42,3 ns	143,09 ±196,1 b	0,05 ± 0,07 bc
<i>Tk</i>	25,88 ±7,4 ab	1,92 ±0,3 ns	0,028 ± 0,01 a	6,0 ±1 ns	29,6 ±4,2 ns	211,32 ±29,1 ns	269,34 ±81,5 bc	0,116 ± 0,03 a
<i>Tk</i> +RO 10%	27,70 ±1,2 a	2,58 ±0,9 ns	0,026 ± 0,02 ab	6,2 ±0,8 ns	20,1 ±10 ns	153,12 ±89,4 ns	245,86 ±202 bc	0,105 ± 0,04 ab
<i>Tk</i> +RO 20%	27,16 ±3 a	1,98 ±0,6 ns	0,012 ± 0,01ab	5,4 ±0,9 ns	32,2 ±6,9 ns	200,65 ±73,4 ns	555,19 ±118 ac	0,058 ± 0,01 b
<i>Tk</i> +RO 50%	23,44 ±3,5 ab	2,25 ±0,5 ns	0,004 ± 0 c	5,8 ±1,5 ns	23,7 ±6,1 ns	247,40 ±47,9 ns	559,36 ±67,5 ac	0,043 ± 0,01 c
<i>Tk</i> +RO 70%	25,44 ±4,5 ab	2,27 ±0,5 ns	0,006 ± 0 bc	5,6 ±1,1 ns	22,6 ±9,1 ns	188,47 ±95,9 ns	267,92 ±96,4 bc	0,084 ± 0,01 b
<i>Tk</i> +RO 90%	23,38 ±5,2 ab	2,02 ±0,5 ns	0,005 ± 0 c	6,2 ±0,8 ns	18,1 ±3,9 ns	177,01 ±139 ns	271,94 ±62,8 bc	0,068 ± 0,01 b
<i>Tk</i> +RO 100%	26,18 ±5,5 ab	2,41 ±0,4 ns	0,006 ± 0 bc	6,2 ±2,2 ns	16,4 ±9 ns	141,60 ±112 ns	282,99 ±207 bc	0,072 ± 0,03 b
RO 100%	24,50 ±4,4 ab	2,57 ±0,7 ns	0,002 ± 0 c	5,6 ±1,1 ns	18,3 ±6,3 ns	192,55 ±129 ns	615,77 ±243,4 a	0,032 ± 0,01 c
-	DMR	CR	MSR	NN	MSPA	MSR/MSPA	MST	MP
Controle	1,68 ±0,6 ns	28,00 ±8,2 a	0,015 ± 0 ns	3,4 ±0,9 ns	0,077 ±0,07 abc	0,46 ±0,47 ns	0,092 ±0,07 abc	0 % c
<i>Tk</i>	1,19 ±0,6 ns	23,86 ±4,5 ab	0,014 ± 0 ns	4 ±1,4 ns	0,144 ±0,04 a	0,10 ±0,02 ns	0,158 ±0,04 a	70 % bc
<i>Tk</i> +RO 10%	1,43 ±0,4 ns	24,41 ±1,8 ab	0,011 ± 0,01 ns	4,2 ±1,3 ns	0,131 ±0,05 ab	0,08 ±0,03 ns	0,142 ±0,06 ab	70 % bc
<i>Tk</i> +RO 20%	1,42 ±0,7 ns	17,36 ±4,8 bc	0,007 ± 0 ns	3,4 ±0,5 ns	0,070 ±0,01 cd	0,10 ±0,02 ns	0,077 ±0,02 bc	80 % b
<i>Tk</i> +RO 50%	1,32 ±0,5 ns	11,46 ±4,4 cd	0,005 ± 0 ns	3,8 ±0,8 ns	0,047 ±0,01 c	0,10 ±0,03 ns	0,052 ±0,01 c	90 % ab
<i>Tk</i> +RO 70%	1,33 ±0,5 ns	14,07 ±5,3 cd	0,003 ± 0 ns	3,6 ±0,9 ns	0,090 ±0,01 abc	0,03 ±0,03 ns	0,093 ±0,01 abc	100 % a
<i>Tk</i> +RO 90%	1,24 ±0,4 ns	8,19 ±2,2 cd	0,020 ± 0,04 ns	4,2 ±1,3 ns	0,072 ±0,01 cd	0,33 ±0,68 ns	0,093 ±0,03 abc	100 % a
<i>Tk</i> +RO 100%	1,29 ±0,5 ns	8,35 ±3,2 cd	0,003 ± 0 ns	4,2 ±1,6 ns	0,078 ±0,03 abc	0,05 ±0,04 ns	0,080 ±0,03 bc	100 % a
RO 100%	1,28 ±0,5 ns	7,08 ±2,3 d	0,007 ± 0,01 ns	3,6 ±0,9 ns	0,034 ±0,01 c	0,30 ±0,61 ns	0,042 ±0,01 c	100 % a

Dados representam média ± DP (n = 5). ¹ médias seguidas de letras iguais, dentro de cada coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey. ^{ns} não significativo a p≤0,05.

Tabela 13. Altura de planta (AP, cm), diâmetro do caule (DC, mm), massa seca do caule (MSC, g), número de folhas (NF), área foliar (AF, mm²), perímetro foliar (PF, cm), área foliar específica (AFE), massa seca das folhas (MSF, g), diâmetro médio de raiz (DMR, mm), comprimento da maior raiz (CR cm), massa seca da raiz (MSR, g), número de nós (NN), massa seca da parte aérea (MSPA, g), razão entre a MSR e MSPA (MSR/MSPA), massa seca total (MST, g) e mortalidade de plantas (MP) de *B. plantaginea* (papuã) (meio de cultivo, controle), tratadas com bio-herbicida de *Trichoderma koningiopsis* (TK), combinação do extrato com o herbicida comercial Roundup WG - sal de amônio (WG), e o WG isoladamente na dose recomendada, realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020.

Tratamento	AP	DC	MSC	NF	AF	PF	AFE	MSF
Controle	29,86 ±7,3 ns	3,12 ±0,5 ns	0,029 ± 0,01 ns	5,4 ±0,9 ns	16,8 ±2,3 a	203,09 ±42,3 ns	143,09 ±196 bc	0,05 ± 0,07 b
Tk	25,88 ±7,4 ns	1,92 ±0,3 ns	0,028 ± 0,01 ns	6,0 ±1 ns	29,6 ±4,2 ab	211,32 ±29,1 ns	269,34 ±81 abc	0,116 ± 0,03 b
Tk +WG 10%	22,96 ±4,5 ns	2,66 ±0,9 ns	0,020 ± 0,01 ns	5,2 ±0,4 ns	26,2 ±7,8 ab	237,02 ±47,9 ns	345,39 ±156 ab	0,084 ± 0,03 b
Tk +WG 20%	19,60 ±3,3 ns	2,37 ±0,2 ns	0,009 ± 0 ns	5,0 ±0,7 ns	22,9 ±6,3ab	193,66 ±61,1 ns	505,33 ±189 a	0,047 ± 0,01 b
Tk +WG 50%	23,36 ±5,6 ns	2,84 ±1,3 ns	0,004 ± 0 ns	5,0 ±1 ns	17,0 ±11ab	157,44 ±85,4 ns	500,38 ±274 a	0,034 ± 0 b
Tk +WG 70%	18,68 ±5,2 ns	2,15 ±0,5 ns	0,005 ± 0 ns	6,4 ±1,3 ns	23,2 ±3,5ab	154,33 ±70,9 ns	348,68 ±69 ab	0,069 ± 0,02 b
Tk +WG 90%	18,48 ±3,8 ns	2,34 ±0,5 ns	0,004 ± 0 ns	6,0 ±2 ns	14,7 ±4,1ab	134,84 ±84,7 ns	270,34 ±63abc	0,054 ± 0 b
Tk +WG 100%	22,88 ±6,1 ns	1,90 ±0,3 ns	0,132 ± 0,05 ns	5,4 ±1,7 ns	20,0 ±8,7ab	122,94 ±70 ns	47,83 ±26 bc	0,466 ± 0,15 a
WG 100%	21,12 ±6 ns	2,63 ±0,7 ns	0,237 ± 0,39 ns	5,8 ±0,4 ns	12,4 ±4,8 b	184,34 ±95,1 ns	34,11 ±28,3 c	0,513 ± 0,23 a
-	DMR	CR	MSR	NN	MSPA	MSR/MSPA	MST	MP
Controle	1,68 ±0,6 ns	28,00 ±8,2 a	0,015 ± 0 b	3,4 ±0,9 ns	0,077 ±0,07 b	0,46 ±0,47 ns	0,092 ±0,07 b	0 % c
Tk	1,19 ±0,6 ns	23,86 ±4,5 ab	0,014 ± 0 b	4 ±1,4 ns	0,144 ±0,04 b	0,10 ±0,02 ns	0,158 ±0,04 b	70 % b
Tk +WG 10%	1,31 ±0,6 ns	23,27 ±0,9 ab	0,009 ± 0,01 b	3,2 ±0,8 ns	0,104 ±0,04 b	0,09 ±0,04 ns	0,114 ±0,04 b	60 % bc
Tk +WG 20%	1,15 ±0,4 ns	16,60 ±4,6 bc	0,006 ± 0 b	3 ±0,7 ns	0,056 ±0,01 b	0,11 ±0,04 ns	0,062 ±0,01 b	80 % ab
Tk +WG 50%	1,14 ±0,4 ns	10,30 ±3,7 cd	0,004 ± 0 b	3 ±0,7 ns	0,037 ±0,01 b	0,10 ±0,02 ns	0,041 ±0,01 b	60 % b
Tk +WG 70%	1,15 ±0,5 ns	11,18 ±1,9 cd	0,002 ± 0 b	4,4 ±1,3 ns	0,074 ±0,02 b	0,04 ±0,03 ns	0,076 ±0,02 b	100 % a
Tk +WG 90%	1,09 ±0,4 ns	7,84 ±2,1 d	0,023 ± 0,05 b	4 ±1,4 ns	0,058 ±0,01 b	0,35 ±0,7 ns	0,081 ±0,05 b	100 % a
Tk +WG 100%	1,12 ±0,5 ns	6,87 ±2,6 d	0,033 ± 0,06 b	3,4 ±1,5 ns	0,598 ±0,18 a	0,40 ±0,09 ns	0,831 ±0,22 a	100 % a
WG 100%	1,10 ±0,4 ns	7,65 ±1,7 d	0,093 ± 0,05 a	3,8 ±0,8 ns	0,750 ±0,18 a	0,14 ±0,07 ns	0,843 ±0,14 a	90 % ab

Dados representam média ± DP (n = 5). ¹ médias seguidas de letras iguais, dentro de cada coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey. ^{ns} não significativo a p<0,05.

Tabela 14. Altura de planta (AP, cm), diâmetro do caule (DC, mm), massa seca do caule (MSC, g), número de folhas (NF), área folhar (AF, mm²), perímetro foliar (PF, cm), área foliar específica (AFE), massa seca das folhas (MSF, g), diâmetro médio de raiz (DMR, mm), comprimento da maior raiz (CR cm), massa seca da raiz (MSR, g), número de nós (NN), massa seca da parte aérea (MSPA, g), razão entre a MSR e MSPA (MSR/MSPA), massa seca total (MST, g) e mortalidade de plantas (MP) de *B. plantaginea* (papuã) (meio de cultivo, controle), tratadas com bio-herbicida de *Trichoderma koningiopsis* (TK), combinação do extrato com o herbicida comercial Zapp Qi® - Sal potássico (ZQi), e o ZQi isoladamente na dose recomendada, realizadas aos 16 DAT. Erechim/RS, UFFS, 2020.

Tratamento	AP	DC	MSC	NF	AF	PF	AFE	MSF
Controle	29,86 ±7,3 a	3,12 ±0,5 a	0,029 ± 0,01 a	5,4 ±0,9 ns	16,8 ±2,3 a	203,09 ±42,3 ns	143,09 ±196,1 b	0,05 ± 0,07 b
Tk	25,88 ±7,4 ab	1,92 ±0,3 b	0,028 ± 0,01 a	6,0 ±1 ns	29,6 ±4,2 ab	211,32 ±29,1 ns	269,34 ±81,5 ab	0,116 ± 0,03 b
Tk +ZQi 10%	23,86 ±1,7 ab	2,18 ±0,4 ab	0,027 ± 0,01 b	5,2 ±1,3 ns	21,9 ±11 ab	163,86 ±95,8 ns	199,52 ±158,1 b	0,135 ± 0,05 b
Tk +ZQi 20%	20,14 ±7,2 ab	1,90 ±0,5 b	0,014 ± 0 ab	5,6 ±1,1 ns	26,3 ±2,9 ab	160,42 ±45,8 ns	360,95 ±78,6 ab	0,075 ± 0,01 b
Tk +ZQi 50%	17,54 ±5,4 b	2,09 ±0,5 ab	0,006 ± 0 b	6,0 ±1,2 ns	18,9 ±4,5 ab	189,22 ±33 ns	348,69 ±41,5 ab	0,054 ± 0,01 b
Tk +ZQi 70%	21,46 ±1,5 ab	2,09 ±0,3 ab	0,008 ± 0 b	5,4 ±1,1 ns	18,2 ±3,3 ab	129,85 ±63,4 ns	173,86 ±51,6 b	0,108 ± 0,02 b
Tk +ZQi 90%	20,58 ±1,5 ab	2,07 ±0,6 b	0,007 ± 0 b	5,6 ±1,5 ns	15,4 ±2,7 b	116,57 ±75,2 ns	180,56 ±41,6 b	0,087 ± 0,01 b
Tk +ZQi 100%	21,66 ±5,2 ab	2,21 ±0,4 ab	0,004 ± 0,01 b	5,6 ±0,9 ns	17,9 ±8,5 ab	117,32 ±83,4 ns	107,38 ±103,7 b	0,324 ± 0,22 a
ZQi 100%	26,64 ±2,1 ab	2,47 ±0,8 ab	0,002 ± 0 b	5,8 ±1,1 ns	19,5 ±4,2 ab	167,11 ±81,9 ns	520,45 ±302,8 a	0,048 ± 0,03 b
-	DMR	CR	MSR	NN	MSPA	MSR/MSPA	MST	MP
Controle	1,68 ±0,6 ns	28,00 ±8,2 ab	0,015 ± 0 ns	3,4 ±0,9 ns	0,07 ±0,07 b	0,46 ±0,47 b	0,092 ±0,07 b	0 % c
Tk	1,19 ±0,6 ns	23,86 ±4,5abc	0,014 ± 0 ns	4 ±1,4 ns	0,14 ±0,04 b	0,10 ±0,02 ab	0,158 ±0,04 ab	70 % b
Tk +ZQi 10%	2,01 ±0,9 ns	33,44 ±1,7 a	0,015 ± 0,01 ns	3,2 ±1,1 ns	0,16 ±0,05 ab	0,09 ±0,03 ab	0,177 ±0,06 a	90 % ab
Tk +ZQi 20%	1,79 ±0,6 ns	23,97 ±6,7abc	0,010 ± 0 ns	3,6 ±0,9 ns	0,08 ±0,02 b	0,11 ±0,02 b	0,099 ±0,02 b	90 % ab
Tk +ZQi 50%	1,81 ±0,8 ns	15,42 ±4,9 cd	0,006 ± 0 ns	4 ±1,4 ns	0,06 ±0,01 b	0,10 ±0,02 b	0,067 ±0,01 b	100 % a
Tk +ZQi 70%	1,73 ±0,6 ns	19,88 ±10 bcd	0,004 ± 0 ns	3,4 ±1,5 ns	0,11 ±0,02 b	0,04 ±0,04 b	0,119 ±0,02 b	100 % a
Tk +ZQi 90%	1,65 ±0,6 ns	9,79 ±2,5 a	0,030 ± 0,06 ns	3,6 ±0,9 ns	0,09 ±0,02 b	0,35 ±0,68 b	0,124 ±0,06 b	100 % a
Tk +ZQi 100%	1,70 ±0,6 ns	12,02 ±4,4 cd	0,002 ± 0 ns	3,6 ±0,5 ns	0,19 ±0,23 a	0,06 ±0 b	0,130 ±0,23 b	100 % a
ZQi 100%	1,85 ±0,6 ns	9,12 ±3,4 a	0,011 ± 0,02 ns	3,8 ±1,3 ns	0,05 ±0,03 b	0,06 ±0,32 b	0,061 ±0,04 b	100 % a

Dados representam média ± DP (n = 5). ¹ médias seguidas de letras iguais, dentro de cada coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey. ^{ns} não significativo a p≤0,05.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação combinada do *Trichoderma koningiopsis* com os herbicidas testados [Roundup Original (Sal isoprolamina), Roundup WG (Sal de amônio), Zapp Qi® (Sal potássico)] na cultura da soja, demonstrou que os sintomas de fitotoxicidade são apenas pontuais, não causando interferência nas variáveis de altura da parte aérea e comprimento de raízes, sendo que a mortalidade de plantas foi igual a 0% para todos os tratamentos realizados.

Para planta daninha do leiteiro, o herbicida Zapp Qi® é o mais eficiente com a menor concentração, de 10% que causa 90% do controle das plantas. Os herbicidas Roundup Original com 80% de controle na concentração de 10% do produto e Roundup WG com 80% do controle na concentração de 50%.

Com a planta daninha do papuã, a associação do bio-herbicida com herbicida Zapp Qi® causa 90% de controle com *Tk*+ZQi10%; e total (100%) com *Tk*+ZQi50%, sendo ótimos resultados de controle com baixas concentrações do produto comercial.

Os resultados demonstram o grande potencial da combinação do fungo *Trichoderma koningiopsis* com os produtos comerciais, e com isto, abrem a perspectiva para redução de doses na aplicação destes herbicidas, com consequente redução dos impactos ambientais. Entretanto, estudos ainda devem ser realizado para que isto seja possível.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro, e a UFFS pelo fornecimento de estrutura, materiais e reagentes.

LITERATURA CITADA

Bajwa A.A., Mahajan G., Chauhan, B.S. Nonconventional weed management strategies for modern agriculture. **Weed Science Society of America**, v.63, p.723-747, 2015.

Bakr E.M. A new software for measuring leaf area, and damaged area by *Tetranychus urticae* Koch. **Journal of Applied Entomology** 129 (3), 173-175. 2005. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2005.00948.x>

Basso F.J.M. et al. Manejo de plantas daninhas em milho RR® com herbicidas aplicados isoladamente ou associados ao glifosato. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 17, p. 148-157, 2018.

Bordin E.R. et al. Non-Toxic Bioherbicides Obtained from *Trichoderma koningiopsis* Can Be Applied to the Control of Weeds in Agriculture Crops. **Industrial Biotechnology**, v.14, n.3, p.157-163, jun. 2018. doi: <http://dx.doi.org/10.1089/ind.2018.0007>.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Secretaria de Defesa Agropecuária**. – Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399 p.

Camargo A.F. et al. A Low-Genotoxicity Bioherbicide Obtained from *Trichoderma koningiopsis* Fermentation in a Stirred-Tank Bioreactor. **Industrial Biotechnology**, 2020. doi: <https://doi.org/10.1089/ind.2019.0024>

Christoffoleti P.J., López-Ovejero R.F. Resistência das plantas daninhas a herbicidas: definições, bases e situação no Brasil e no mundo. In: Christoffoleti, P.J. (Coord.). **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 3º ed. Piracicaba: HRAC-BR, p. 3-30, 2008.

Christoffoleti P.J., Nicolai M. Resistência das plantas daninhas a herbicidas: definições, bases e situação no Brasil e no mundo. In: Christoffoleti, P.J. (Coord.). **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 4º ed. Piracicaba: Esalq, 2016. 262 p.

Dayan F.E., Duke S. O. Natural compounds as next-generation herbicides. **Plant Physiology**, v.166, p.1090-1105, 2014.

Duke S.O., Powles S.B. Glyphosate-resistant crops and weeds: now and in the future. **AgBioForum**, v.12, p.346-357, 2009.

Ferreira E.A. et al. Translocação do glyphosate em biótipos de azevém. **Planta Daninha**, v. 24, p. 365-370, 2006.

Fleck, N.G. Interferência de papuã (*Brachiaria plantaginea*) com soja e ganho de produtividade obtido através do seu controle. **Pesq. Agropec. Gaúcha**, v. 2, n. 1, p. 63-68, 1996.

Forte C.T. et al. Effects of glifosato and foliar fertilizers on the glifosato resistant (GR) soybean. **Australian Journal of Crop Science (Online)**, p. 1251-1257, 2019. doi: <https://doi.org/10.21475/ajcs.19.13.08.p1527>

Frans, R., Crowley H. Experimental design and techniques for measuring and analyzing plant responses to weed control practices. In: **Southern Weed Science Society**. Research methods in weed science, Clemson, 3ª ed., p 29-45, 1986.

Galon L. et al. Interference periods of *Brachiaria plantaginea* in corn crops in Southern Rio Grande do Sul. **Planta Daninha**, v. 26, n. 4, p. 779-788, 2008. doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-83582008000400009>.

Gazziero, D.L.P.; Neumaier, N. Sintomas e diagnose de fitotoxicidade de herbicidas na cultura da soja. **Embrapa Soja-Documentos (INFOTECA-E)**, 1985.

Gealy D.R., Mitten D.H., Rutger J.N. Gene flow between red rice (*Oryza sativa*) and herbicide-resistant rice (*O. sativa*): implications for weed management. **Weed Technology**, v.17, p.627-645, 2003.

Givens W.A. et al. Survey of tillage trends following the adoption of glyphosate resistant crops. **Weed Technology**, v. 23, p. 150-155, 2009.

Gliessman S.A. Interação entre agroecossistemas e ecossistemas naturais. **Agroecologia: processos ecológicos em Agricultura Sustentável**. Editora de UFRGS, p. 541-559, 2000.

Heap, I. International survey of herbicide resistant weeds. Online. Internet. Disponível em: <<http://www.weedscience.com>>, Acesso em: 03 mar. 2021.

- Lopéz-Bucio J., Pelagio-Flores R., Herrera-Estrella A. Trichoderma as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. **Scientia Horticulturae**, v.196, p.109-123, 2015.
- Mendes, C.R. et al. Massa seca de plantas de soja RR submetidas à Glifosato em pós emergência. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 16, 2007, Pelotas - RS. Anais... Pelotas: UFPEL, 2007.
- Merotto Jr.A. et al. Aumento da população de plantas e uso de herbicidas no controle de plantas daninhas em milho. **Planta Daninha**. Londrina, PR. Vol. 15, n. 2 (1997), p. 141-151, 1997.
- Monsanto. Ficha de informações do produto. **Roundup Original**, 2011. Disponível em: <<http://www.roundup.com.br/roundup-original.php>>. Acesso em: 20, maio. 2019.
- Monsanto. Ficha de informações sobre o uso de produto. **Roundup WG**, 2011. Disponível em: <https://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/produto/roundup-wg_2993.html> . Acesso em: 20, maio. 2019.
- Prigol A. et al. Avaliação de biótipos de leiteiro com suspeita de resistência a herbicidas inibidores da ALS e Protox provenientes de Rondônia. **Revista Brasileira de Herbicidas**. 2014; 13: 216-24. doi: <https://doi.org/10.7824/rbh.v13i3.273>
- POTAFOS – Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. Como a planta de soja se desenvolve. Arquivo do Agrônomo – Nº 11. 1997. 21p. Traduzido do original: How a soybean Plant Develops. Special Report nº 53. Iowa, 1997.
- Reis T.C. et al. Efeitos de fitotoxicidade na soja RR tratada com formulações e dosagens de Glifosato. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 10, n. 1, p. 34-43, 2010.
- Reichert Júnior F.W. et al. New perspectives for weeds control using autochthonous fungi with selective bioherbicide potential. **Heliyon**, v. 5, n. 5, p. e01676, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01676>
- Santos J.B. et al. Efeitos de diferentes formulações comerciais de glyphosate sobre estirpes de Bradyrhizobium. **Planta Daninha**, v. 22, n. 2, p. 293-299, 2004. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582004000200017>
- Santos J.B. et al. Efeito de formulações na absorção e translocação do glyphosate em soja transgênica. **Planta Daninha**, v. 25, n. 2, p. 381-388, 2007. doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-83582007000200019>.
- Santos J.B. et al. Efeito de Formulações na absorção e translocação do glyphosate em Soja Transgênica. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 25, n.2, p. 381-388, 2007.
- Souza A.R.C. et al. Selection, isolation, and identification of fungi for bioherbicide production. **Brazilian journal of microbiology**, v. 48, n. 1, p. 101-108, 2017. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.09.004>
- Statsoft. INC. Programa computacional Statistica 8.0. E.A.U. 2010.
- Stefanski F.S. et al. Potential use of biological herbicides in a circular economy context: A sustainable approach. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 4, p. 195, 2020.
- Stoppacher N. et al. Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. **Journal of Microbiological Methods**, v.81, p.187-193, 2010.

Syngenta. Ficha de informações sobre o uso de produto. **ZAPP QI 620**, 2020. Disponível em: <<http://www.roundup.com.br/roundup-original.php>>. Acesso em: 24, maio. 2020

Vargas L. et al. Práticas de manejo e a resistência de *Euphorbia heterophylla* aos inibidores da ALS e tolerância ao glyphosate no Rio Grande do Sul. **Planta Daninha**. 2013; p. 427-32.

Vidal R.A.; Fleck N.G. Análise do risco da ocorrência de biótipos de plantas daninhas resistentes aos herbicidas. **Planta Daninha**, v. 15, n. 2, p. 152-161, 1997

Vidal R.A., Lamego F.P., Trezzi M.M. Diagnóstico da resistência aos herbicidas em plantas daninhas. **Planta Daninha**, v.24, p.597-604, 2006.

Weed Science. International survey of herbicide resistant weeds. Disponível: <<http://www.weedscience.org/Home.aspx>> Acesso em: 01 maio. 2020.

Werlang R.C. et al. Efeito da chuva sobre a eficácia de diferentes formulações de glyphosate no controle de *Bidens pilosa*. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 4, n. 1, p. 25-38, 2005.

Xavier E. et al. Acetolactate synthase activity in *Euphorbia heterophylla* resistant to ALS- and protox-inhibiting herbicides. **Planta Daninha**. 2013; 31: 867-74

Zhou Y. et al. **Proteasomal inhibition induced by manganese ethylene-bis dithiocarbamate: relevance to Parkinson's disease**. *Neuroscience*, v.128, n.2, p.281-91, 2004.

CONCLUSÕES FINAIS

Nesta dissertação pode ser concluído que o microrganismo *T. koningiopsis* apresenta maior sensibilidade em seu crescimento aos herbicidas comerciais Poquer (Cleotodin), Accent, Clorimuron (Classic), Glufosinato de amônio (Finale), Gramoxone (Paraquate), Atrazina + Simazina (Primatop® SC), mas é resistente a todos os herbicidas testados quando exposto as doses de tanque.

No teste com as plantas do modelo de pepino, foi observado que as plantas sofreram ação do bio-herbicida a base de *T. koningiopsis* que foi responsável pela morte de até 80% das plantas, e que causou interferência no desenvolvimento vegetativo.

Em teste de fugacidade com minhocas, foi constatado que o bio-herbicida não causa perigos ecotoxicológicos ao meio ambiente e aos organismos que vivem dele.

Também constatou-se que o bio-herbicida de *T. koningiopsis* quando associado aos produtos comerciais Roundup Original (Sal isoprolamina), Roundup WG (Sal de amônio), Zapp Qi® (Sal potássico) não causa danos na cultura da soja e é eficiente no controle de plantas daninhas de leiteiro e papuã mesmo com concentrações a partir de 50% das doses recomendadas pela bula do produto.

Análises bioquímicas ainda são necessárias para identificar se o efeito herbicida do biocomposto causado em plantas se dará pela produção de enzimas do fungo ou pela produção de compostos metabólitos secundários responsáveis pela fitotoxicidade.

O tema dessa pesquisa aborda um assunto inovador que necessita real investimento no desenvolvimento de abordagens alternativas que compreende auxiliar o agricultor sem agredir o meio ambiente.