

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA**

**METABÓLITOS SECUNDÁRIOS OBTIDOS DE  
*Diaporthe* sp. APLICADOS PARA O CONTROLE DE  
PLANTAS DANINHAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Maiquel Pizzuti Pes**

**Santa Maria/RS, Brasil,  
2015**

**METABÓLITOS SECUNDÁRIOS OBTIDOS DE *Diaporthe* sp.  
APLICADOS PARA O CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS**

**por**

**Maiquel Pizzuti Pes**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola, área de concentração Engenharia Ambiental, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Agrícola**.

**Orientador: Prof. Jerson Vanderlei Carús Guedes**

**Santa Maria/RS, Brasil**

**2015**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Pizzuti Pes, Maiquel  
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS OBTIDOS DE DIAPORTHE SP.  
APLICADOS PARA O CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS / Maiquel  
Pizzuti Pes.-2015.  
58 p.; 30cm

Orientador: Jerson Vanderlei Carús Guedes  
Coorientador: Márcio Antonio Mazutti  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-  
Graduação em Engenharia Agrícola, RS, 2015

1. Metabólitos Secundários 2. Diaporthe sp. I. Carús  
Guedes, Jerson Vanderlei II. Mazutti, Márcio Antonio  
III. Título.

---

© 2015

Todos os direitos autorais reservados a Maiquel Pizzuti Pes. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização do autor.  
Endereço eletrônico: [maiuelpizzuti@gmail.com](mailto:maiuelpizzuti@gmail.com)

---

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de  
Mestrado**

**Metabólitos secundários obtidos de *Diaporthe* sp. aplicados para o controle  
de plantas daninhas**


elaborada por  
**Maiquel Pizzuti Pes**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Engenharia Agrícola**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

  
\_\_\_\_\_  
**Jerson Vanderlei Carús Guedes, Dr.**  
(Presidente/Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
**Marcio Antonio Mazutti, Dr. (UFSM)**

  
\_\_\_\_\_  
**Marcus Antônio Gonçalves Costa, Dr. (Syngenta)**

Santa Maria/RS, 21 de maio de 2015.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus, pela saúde e força que me concede para que eu pudesse concluir mais uma etapa da minha vida.

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Agrícola pela oportunidade de realização desse projeto.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por viabilizar financeiramente esse trabalho, por meio da bolsa e recursos concedidos.

Ao Prof. Jerson Guedes pela paciência, conselhos, ensinamentos e orientação para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Márcio Mazutti pelos ensinamentos, orientação e confiança para realização deste trabalho.

Ao meu pai José Pes e minha mãe Darca Pes pelo carinho, incentivo e os sacrifícios feitos para que eu pudesse estudar e chegar à conclusão de mais uma etapa.

Ao meu irmão Marcelo Pes pelos conselhos, ajuda, amizade e companheirismo ao longo da minha vida.

A minha namorada Thais Sangoi, pela compreensão, parceria, ajuda e carinho nestes últimos meses.

A minha cunhada Ro Wang Ting pelo carinho e pela sua amizade.

Aos estagiários e colegas de Pós-Graduação do Laboratório de Manejo Integrado de Pragas, Alberto Rohrig, Bruno Ruviano Tomazi, Cristiano de Carli, Cleiton Wartha, Daniele Aguiar, Darlei München Bamberg, Eduardo Bortoluzi, Ericmar Avila dos Santos, Frederico Hickmann, Gabriel Guedes, Greissi Giraldo, Gustavo Engel, Ivair Valmorbida, Iuri Stragliotto, Leonardo Moreira Burtet, Luis Eduardo Curioletti, Maicon Machado, Natalie Feltrin, Regina Stacke, Thaiza Basso. Affonso Hermeto Jung, Fábio Lucas Izaguirre Martins, Glauber Renato Sturmer, Janine Palma, Julio Cesar Lengler Barbosa, Deivid Araujo Magano, Regis Felipe Stacke, Clérison Regis Perini e Jonas André Arnemann, pela convivência, amizade e conhecimentos compartilhados.

Aos funcionários do Departamento de Defesa Fitossanitária, Angelita Martins, Fioravante Amaral, Fernando Gnocatto, Gustavo Ugalde, Jorge França, Marizete Pozzobon.

Ao pessoal da Clínica de Defesa Fitossanitária aos quais tive o prazer da convivência durante a graduação Bruno Sari, Cesar Coradini, Felipe Tonetto, Joelton Rodrigues, Giuvan Lenz, Guilherme Augusti, Maurício Stefanello, Guilherme Augusti, Renato Guerra e Prof. Ivan Costa.

Aos ex-colegas da Dow AgroSciences Angela Da Cas, André Cervi, Rogério Rubin e Alisson Selmer, pelos conhecimentos e pela convivência.

Aos Colegas Thiago Castro e Angélica Souza pela ajuda e auxílio do desenvolvimento do trabalho.

Ao amigo que fiz nessa caminha Adriano Arrué, pela amizade, parceria, conhecimento, auxílio em diversos momentos da minha vida, meu obrigado especial.

E por fim um muito obrigado a todas as pessoas que fizeram parte nesta etapa ou em tantas outras que passei até chegar aqui.

## **EPÍGRAFE**

“A mente que se abre a uma nova ideia  
jamais volta ao seu tamanho original”

**Albert Einsten**

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola  
Universidade Federal de Santa Maria

### METABÓLITOS SECUNDÁRIOS OBTIDOS DE *Diaporthe* sp. APLICADOS PARA O CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS

AUTOR: MAIQUEL PIZZUTI PES  
ORIENTADOR: JERSON VANDERLEI CARÚS GUEDES  
Local e Data: Santa Maria/RS, 21 de maio de 2015.

As plantas daninhas são atualmente um dos principais fatores que limitam a produtividade das culturas agrícolas no mundo. Os bioherbicidas são considerados como uma importante alternativa para auxiliar no manejo de plantas daninhas, em função de propiciarem eficiente controle e do baixo impacto ambiental. Desta maneira o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito herbicida dos metabólitos secundários do fungo *Diaporthe* sp. isolado da planta *Solanum americanum* no controle de distintas espécies de plantas daninhas e de culturas agrícolas. Para isto foram realizados bioensaios em pré-emergência (avaliação primária) e pós-emergência (avaliação secundária) de plantas em laboratório e em casa de vegetação. Os metabólitos secundários foram obtidos, por meio de um processo de fermentação submersa do microrganismo em um biorreator de bancada. A avaliação primária foi realizada em laboratório, por meio de testes germinativos de sementes para as espécies *glycine max*, *Cucumis sativus*, *Sorghum halepense*, *Oryza sativa*, *Triticum aestivum* e *Lolium multiflorum*. Para isto foram utilizadas caixas de polietileno do tipo gerbox, as quais continham papel germitest como substrato, previamente embebidos em 10 mL dos metabólitos secundários. Em cada caixa foram alocadas 25 sementes de forma equidistante, sendo as mesmas, logo em seguida tampadas e seladas com Parafilm e então levadas para uma câmara de germinação pelo período de sete dias. Já para na avaliação secundária foram realizados dois experimentos em casa de vegetação. O experimento 1 foi composto pela aplicação de diferentes doses dos metabólitos secundários (0, 1/4D, 1/2D, D, 2D, 4D e 8D) via parte aérea de plantas para as espécies *glycine max*, *Conyza* sp., *Oryza sativa*, *Echinochloa* sp., *Triticum aestivum* e *Lolium multiflorum*. Para o experimento 2 foram utilizadas estas mesmas espécies de plantas. Todavia, os tratamentos foram compostos pela mistura entre herbicidas comerciais e metabólitos secundários para avaliar um possível sinergismo ocasionado pela mistura entre os compostos. Além disto, realizou-se a adição de um adjuvante junto aos metabólitos secundários para verificar uma melhora na ação herbicida dos mesmos. Para os dois experimentos foram realizadas avaliações para, o peso da massa seca da parte aérea das plantas, bem como também, fitotoxicidade e controle de plantas. Os resultados obtidos para avaliação primária demonstraram que os metabólitos secundários aplicados de forma pré-emergente inibiram a germinação para as espécies utilizadas no estudo na ordem de 100%. Na avaliação secundária para o experimento 1, as maiores doses resultaram em uma redução do peso da massa seca da parte aérea das plantas para as espécies *Glycine max* e *Conyza* sp. Já para o experimento 2 não verificou-se sinergismo para a mistura dos herbicidas comerciais e metabólitos secundários para nenhuma das espécies de plantas. A adição de um adjuvante aos metabólitos secundários resultou em melhor ação dos mesmos para as espécies de *Glycine max*, *Echinochloa* sp. e *Lolium multiflorum*.

**Palavras-chave:** Adjuvantes; avaliação primária; avaliação secundária; ação herbicida



## ABSTRACT

Master Dissertation  
Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola  
Universidade Federal de Santa Maria

### SECONDARY METABOLITES OBTAINED *Diaporthe* sp. APPLIED FOR WEED CONTROL

AUTHOR: MAIQUEL PIZZUTI PES  
ADVISOR: JERSON VANDERLEI CARÚS GUEDES  
Local and Date: Santa Maria/RS, May 21<sup>th</sup>, 2015.

Weed plants are currently one of the main factors to restrain crop yield worldwide. The mycoherbicides are considered an important alternative to weed plants management, because of its efficiency of control and low environmental impact. The aim of the present study was to evaluate the herbicidal effect of secondary metabolites of the fungus *Diaporthe* sp. isolated from *Solanum americanum* plant to the control of different species of weeds and crops. In this sense, bioassays were carried with pre-emergence application (primary assessment) and post-emergence application (secondary assessment) plants in laboratory and greenhouse. Secondary metabolites were obtained through a process of submerged fermentation in a benchtop bioreactor. Assessment was carried out in the laboratory by means of germination tests on seeds for the species *Glycine max*, *Cucumis sativus*, *Sorghum halepense*, *Oryza sativa*, *Triticum aestivum* and *Lolium multiflorum*. To this, polyethylene boxes were used, which contained germitest role as substrate, previously soaked in 10 mL of secondary metabolites. In each box were equidistantly allocated 25 seeds, and right after capped and sealed with parafilm and taken to a germination chamber for a period of seven days. As for the secondary assessment two experiments were carried in a greenhouse. Experiment 1 was composed by applying different doses of secondary metabolites (0, 1 / 4D 1 / 2D, D, 2D, 4D and 8D) on the aerial part of the plants species *Glycine max*, *Conyza* sp., *Oryza sativa*, *Echinochloa* sp., *Triticum aestivum* and *Lolium multiflorum*. To the experiment 2 these same plant species were used. However, the treatments consisted of mix between commercial herbicides and secondary metabolites to assess a possible synergism caused by the mixture of the compounds. In addition, an adjuvant was added together with the secondary metabolites to verify any improvement on the herbicide effect. For both experiments were evaluated the dry mass weight of the aerial part, phytotoxicity and control efficiency. The results obtained in the primary evaluation demonstrated that the secondary metabolites applied at pre emergency inhibited germination for the species used in the study at a rate of 100%. On the secondary assessment for the experiment 1, the highest dose resulted in a weight reduction of plants aerial dry mass for the species *Glycine max* and *Conyza* sp. At Experiment 2 no synergism was found for the mixture of secondary metabolites and commercial herbicides to any of the plant species. The addition of an adjuvant to secondary metabolites resulted in better action against the species *Glycine max*, *Echinochloa* sp. and *Lolium multiflorum*.

**Key words:** Adjuvant; primary assessment; secondary assessment; herbicide action

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Etapas utilizadas na pesquisa de novas moléculas oriundas de fungos, para o desenvolvimento de bioherbicidas. (Imagem do autor). .....22
- Figura 2 - Sementes de: (a) *Glycine max*; (c) *Triticum aestivum*; (e) *Sorghum halepense* germinadas sob efeito de água destilada a esquerda e sementes de, (b) *Glycine max*; (d) *Triticum aestivum*; (f) *Sorghum halepense* com germinação inibida pela ação de metabólitos de *Diaporthe* sp. a direita. ....44
- Figura 3 - Sementes de: (a) *Cucumis sativus*; (c) *Lolium multiflorum*; (e) *Oryza sativa* germinadas sob efeito de água destilada a esquerda e sementes de, (b) *Cucumis sativus*; (d) *Lolium multiflorum*; (f) *Oryza sativa* com germinação inibida pela ação de metabólitos de *Diaporthe* sp. a direita. ....45
- Figura 4 - Plantas de *Conyza* sp. com controle supressivo em decorrência de diferentes doses dos metabólitos de *Diaporthe* sp.. Santa Maria, RS, 2015.....47
- Figura 5 - Peso da massa seca de parte aérea (MSPA) de plantas, em função da aplicação de diferentes doses dos metabólitos de *Diaporthe* sp. Santa Maria, RS, 2015.....48
- Figura 6 - Na parte superior da figura, plantas de *Glycine max* isentas da aplicação dos metabólitos de *Diaporthe* sp., na parte inferior plantas submetidas a maior dose da solução contendo os metabólitos.....50
- Figura 7 - Peso da massa seca de parte aérea (MSPA) de plantas, em função da aplicação de solução contendo metabólitos de *Diaporthe* sp. isolados e em mistura com herbicidas sintéticos. Santa Maria, RS, 2015.....55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tratamentos, nomes, doses do bioherbicida e herbicidas sintéticos, associados ou isolados, utilizados para as diferentes culturas e suas respectivas plantas daninhas. Santa Maria, RS, 2015.....	40
Tabela 2 - Inibição da germinação (%) pela aplicação dos metabólitos de <i>Diaporthe</i> sp. para as diferentes espécies. Santa Maria, RS, 2015. ....	42
Tabela 3 - Notas de fitotoxicidade para espécies de plantas cultivadas. Santa Maria, RS, 2015. ....	51
Tabela 4 - Notas de fitotoxicidade para as distintas espécies de plantas cultivadas em consequência da aplicação de herbicidas sintéticos e metabólitos de <i>Diaporthe</i> sp.. Santa Maria, RS, 2015.....	53
Tabela 5 - Notas de controle para espécies de plantas daninhas em consequência da aplicação de herbicidas sintéticos e solução contendo metabólitos de <i>Diaporthe</i> sp.. Santa Maria, RS, 2015.....	57

## **LISTA DE ANEXOS**

Anexo 1 – Escala para avaliação de fitotoxicidade adaptada de FRANS; CROWLEY (1986). .....	63
Anexo 2 – Escala para avaliação de controle adaptada de FRANS; CROWLEY (1986). ....	63

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Relevância das plantas daninhas .....	14
2.2 Resistência das plantas daninhas aos herbicidas .....	15
2.3 Fungos e seu metabolismo secundário.....	16
2.4 Microrganismos como fonte de novos bioherbicidas.....	17
2.5 O gênero <i>Diaporthe</i> .....	19
2.6 Seleção de bioherbicidas oriundos de fungos.....	20
3 REFERÊNCIAS.....	23
4 ARTIGO .....	30
Efeito herbicida de metabólitos de <i>Diaporthe</i> sp. no controle pré-emergente e pós-emergente de plantas.....	30
RESUMO .....	30
ABSTRACT.....	31
4.1 INTRODUÇÃO .....	32
4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	34
4.2.1 Local.....	34
4.2.2 Isolado e obtenção de metabólitos .....	34
4.2.3 Avaliação primária .....	36
4.2.4 Avaliação secundária.....	37
4.2.4.1 Experimento 1 .....	37
4.2.4.2 Experimento 2 .....	39
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
4.4 CONCLUSÃO .....	58
4.5 REFERÊNCIAS .....	59

## 1 INTRODUÇÃO

A agricultura é a grande responsável por suprir a demanda mundial por alimentos, tendo em vista o crescimento populacional acentuado que haverá nos próximos anos, passando dos atuais 6,2 bilhões para 9,5 bilhões de pessoas até o ano de 2050, sendo necessário desta maneira, que a produção mundial de alimentos aumente em 70% a partir dos patamares atuais, sem, todavia haver grandes expansões de áreas cultivadas (ONU, 2013).

Em contrapartida, somam-se diversos fatores que interferem negativamente sobre a produção agrícola. Dentre eles inserem-se as plantas daninhas, que são responsáveis por ocasionar baixa significativa à produção das culturas, tanto de forma direta como indiretamente. A utilização do controle químico tem sido adotada e considerada indispensável pelos produtores por minimizar os custos de produção e por apresentar alta eficiência no controle das mesmas (SILVA; SILVA, 2012).

Todavia o uso de forma demasiada e inadequada de agrotóxicos sintéticos tem proporcionado à seleção de biótipos de plantas daninhas tolerantes aos herbicidas comercialmente disponíveis no mercado. Como fator agravante, a descoberta de novas moléculas está cada vez mais difícil (MCDOUGALL, 2010).

Uma alternativa segundo Dayan et al. (2009) são as substâncias produzidas pelo metabolismo secundário de fungos, bactérias e plantas, que vêm sendo utilizadas no manejo de pragas de forma natural ou servindo como modelo para a síntese de novas moléculas. Nas últimas décadas, alguns estudos como os realizados por Javaid et al. (2011) e Javaid; Ali (2011) têm demonstrado que toxinas produzidas por fitopatógenos expressam atividade herbicida. Todavia, apesar do conhecimento do potencial biológico dos fungos, em sintetizar compostos úteis para o emprego em diversas áreas, a grande maioria das pesquisas se resume a área da saúde, existindo assim poucos estudos direcionados para a agricultura.

Os bioherbicidas oriundos do metabolismo secundário de fungos são altamente eficientes no controle de plantas daninhas, e se acredita que apresentam baixo risco ao ambiente. Muitos especialistas sugerem que essas toxinas produzidas pelos fitopatógenos sejam desenvolvidas como uma nova alternativa para os herbicidas sintéticos no manejo de plantas daninhas ainda venham a servir, como base para a síntese de novas moléculas (TREMACOLDI; FILHO, 2006).

O presente trabalho teve como objetivo, avaliar o efeito herbicida dos metabólitos de *Diaporthe* sp. aplicados: a) pré-emergência de *Lolium multiflorum*, *Glycine max*, *Triticum aestivum*, *Oryza sativa*, *Cucumis sativus* e *Sorghum halepense*. b) pós-emergência de *Lolium multiflorum*, *Echinochloa* sp., *Conyza* sp., *Glycine max*, *Triticum aestivum*, *Oryza sativa*. c) em mistura e isolado, com herbicidas sintéticos e um adjuvante.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Relevância das plantas daninhas

As plantas daninhas atualmente ocupam lugar de destaque no cenário agrícola mundial pelos múltiplos prejuízos que ocasionam, propiciando dificuldade ou onerando os tratos culturais, podendo onerar em 30% dos custos de produção (SILVA; SILVA, 2012). Em decorrência da grande habilidade competitiva por recursos do meio, tais como, nutrientes, luz, água e espaço físico, as plantas daninhas interferem significativamente na produtividade das culturas nas quais estão inseridas. Além disto, são responsáveis pela depreciação da produção em virtude da contaminação com sementes e restos estruturais das plantas (LORENZI, 2014).

As perdas variam de acordo com as espécies presentes e com a sua densidade populacional (RIZZARDI et al., 2003). Na cultura do arroz irrigado, as perdas na produtividade, em virtude das plantas daninhas, podem atingir a ordem de 90%, caso não seja empregado o controle das mesmas (ANDRES; MACHADO, 2004). Estima-se que apenas uma planta de capim arroz (*Echinochloa* spp.) por metro quadrado, possa ocasionar perdas na produtividade de até 30%, na cultura do arroz (GALON et al., 2007).

Na cultura da soja, as plantas daninhas também podem acarretar perdas significativas na produtividade, podendo chegar a 93% (SILVA et al., 2009). Adegas et al. (2011) relata que *Conyza* spp., conhecida popularmente como buva, pode ocasionar perdas entre 10 a 40 % na produtividade da cultura.

A cultura do trigo, assim como as culturas da soja e do arroz, também é afetada pelas plantas daninhas, principalmente pelo azevém (*Lolium multiflorum*). Ferreira et al. (2008) estudando a competição de biótipos resistente e suscetíveis de *Lolium multiflorum* com a cultura do trigo, verificaram significativa redução da biomassa para a cultura. Holman et al. (2004) relatam que a convivência de *Lolium multiflorum* com a cultura do trigo durante todo ciclo da cultura pode ocasionar perdas de 83% na produtividade. Além dos danos diretos sobre a redução da produção, as plantas daninhas podem comprometer indiretamente a cultura, em decorrência de serem hospedeiras alternativas de determinados insetos-praga, nematoides e doenças (LORENZI, 2014).



## 2.2 Resistência das plantas daninhas aos herbicidas

O manejo de plantas daninhas teve significativa mudança, a partir da década de quarenta com a descoberta dos herbicidas sintéticos. No entanto, apenas após uma década do uso do controle químico, o surgimento de biótipos resistentes aos herbicidas mais utilizados, tornou o controle de plantas daninhas mais complexo (GREEN, 2014). Com a introdução de culturas resistentes ao glifosato, tais como, a cultura da soja em 1996 nos USA Dill et al. (2008), o manejo de plantas daninhas tornou-se mais eficiente e fácil. No entanto o uso intensivo e a redução do emprego de outros herbicidas com modos de ação distintos propiciou a seleção de espécies de plantas daninhas resistente ao glifosato (GREEN, 2014).

Atualmente o controle químico é o principal método utilizado no manejo das plantas daninhas no cenário agrícola mundial (CHRISTOFFOLETI et al., 2008). Sua utilização tende a aumentar, em decorrência dos agricultores de pequena escala estarem adotando esta tecnologia cada vez mais, fato este que pouco ocorria anteriormente (SILVA; SILVA, 2012).

O largo uso de herbicidas sintéticos utilizados está relacionado principalmente ao fato da sua alta eficiência, facilidade de uso e do custo relativamente reduzido (SILVA; SILVA, 2012). A utilização desse método como a única ferramenta no manejo de plantas daninhas e a aplicação consecutiva de herbicidas com o mesmo mecanismo de ação, na mesma área, tem propiciado a seleção e o surgimento de biótipos resistentes de plantas daninhas (SANTOS et al., 2014).

A resistência de plantas daninhas a herbicidas é definida por Oliveira et al. (2011) como capacidade natural que alguns biótipos de uma determinada população de plantas possuem, em sobreviver mesmo após serem submetidos à aplicação de um determinado herbicida, letal para os demais biótipos desta mesma população.

O primeiro relato de um caso de resistência de planta daninha no mundo ocorreu na década de cinquenta, quando se identificou nos Estados Unidos e no Canadá biótipos resistentes de *Commelina difusa* e *Daucus carota* (WEED SCIENCE, 2015). Segundo HEAP (2015), existem atualmente no mundo, 449 casos de plantas daninhas resistentes. Apenas no Brasil, é relatada a existência de 19 casos de espécies de plantas daninhas resistentes a diferentes mecanismos de ação (HRAC-BR, 2015). Apenas para o

herbicida glifosato sabe-se que existam 32 casos de espécies de planta daninhas que apresentam resistência a este ingrediente ativo (HEAP, 2015).

Considerando os números atuais, a resistência de plantas daninhas aos herbicidas causa preocupação. Segundo Silva; Silva (2012) este fato é especialmente ainda mais inquietante quando as alternativas de herbicidas disponíveis para o manejo de biótipos resistência são limitadas.

A introdução no mercado de culturas resistentes ao glifosato e a eficácia inicial deste herbicida no controle de plantas daninhas, gerou uma redução em termos de investimentos e pesquisas pelas indústrias por novos herbicidas (GREEN; OWEN, 2011). De acordo com Duke (2012) um herbicida com novo modo de ação não tem sido introduzido no mercado a mais de vinte anos.

### **2.3 Fungos e seu metabolismo secundário**

Estima-se que existam cerca de 1,5 milhão de espécies de fungos habitando o planeta, todavia apenas 5% deste número são espécies descritas (PEARCE, 1997; HAWKSWORTH, 2001). Tal fato ilustra a necessidade de mais estudos e do provável potencial bioquímico ainda inexplorado em relação a esses microrganismos.

Tanto as plantas como os fungos possuem como característica a capacidade de biossintetizar uma diversidade de compostos naturais conhecidos como metabólitos secundários (SIDDIQUE, 2012). De acordo com Fox; Howlett (2008) a vasta gama de substâncias bioativas oriundas do metabolismo secundário dos fungos, incluem a classe dos policetídeos, terpenóides e peptídeos. Segundo Schümann; Hertweck (2006) a classe dos policetídeos de origem fúngica é precursora de uma gama de metabólitos secundários, ao passo que também constitui uma das maiores diversidades estruturais no que se refere a produtos de origem natural. Em virtude desta característica os policetídeos oriundos dos microrganismos cada vez mais são considerados pelos pesquisadores como uma promissora fonte de substâncias bioativas.

Os metabólitos secundários são compostos por moléculas de tamanho reduzido, de baixa massa molecular e ficando muitas vezes restritos apenas a um estágio de desenvolvimento do microrganismo (SIDDIQUE, 2012). De acordo com Henkel et al. (1999) os produtos naturais oriundos do metabolismo secundário, geralmente oferecem

uma diversidade estrutural maior do que quando comparados aos compostos sintéticos, esta relação ocorre devido aos compostos naturais possuírem mais centros quirais, anéis aromáticos, cadeias carbônicas mais ramificadas e carbonos hibridizados. Além disso, os produtos naturais possuem poucos halogênios, tais como, Cloro, Flúor e Boro, todavia apresentam muitos oxigênios e nitrogênios ao passo que podem conter também sulfato e fosfato.

De acordo com Keller et al. (2005) mais de 30000 compostos produzidos pelo metabolismo secundário dos fungos sejam conhecidos. Atualmente os compostos oriundos do metabolismo secundário dos fungos são considerados pelos pesquisadores como fontes excepcionais de novos fármacos e agroquímicos (VINING, 1990; TREMACOLDI; FILHO, 2006).

#### **2.4 Microrganismos como fonte de novos bioherbicidas**

A indústria e a comunidade científica atualmente, tem voltado seus estudos para a prospecção da atividade biológica dos metabólitos dos fungos para a descoberta de novos agroquímicos, dentre eles os herbicidas. Este fato ocorre em virtude das características peculiares apresentadas pelos metabólitos produzidos pelos microrganismos, que possuem atividade deletéria sobre as plantas daninhas, baixa toxicidade e são ambientalmente seguros (CHARUDATTAN, 2000; SMITH et al., 2008).

O emprego de fungos para o controle de plantas daninhas na agricultura, já é conhecido há décadas (HOAGLAND, 1990). Os bioherbicidas como são denominados, é definido por Glare et al. (2012) como o emprego de microrganismos (bactérias, fungos, vírus, nematoides e protozoários) vivos ou então os compostos bioativos produzidos pelos mesmos, como os metabólitos secundários, os quais ocasionam a supressão ou a morte da população de plantas daninhas.

Diversos bioherbicidas oriundos de fungos foram descobertos, desenvolvidos e comercializados nas ultimas décadas, ao passo que também, importantes herbicidas sintéticos derivados de metabólitos provindos de microrganismos são utilizados atualmente. O primeiro herbicida comercial sintetizado a partir do metabólito de um microrganismo, que se tem relato foi o NK-043 (3,3 – dimethyl-4-methoxy

benzophenone). O produto mostrou-se excelente herbicida para controle de plantas invasoras na cultura do arroz. NK-043 teve como molécula base a fitotóxina Anisomicina, produzida pela *Streptomyces* microrganismo habitante do solo (MUNAKATA et al., 1973; DUKE; LYDON, 1987).

Outro produto desenvolvido a partir de um microrganismo foi Bialophos que segundo Duke; Lydon (1987) foi o primeiro herbicida obtido a partir de fermentação de um microrganismo a ser comercializado de forma direta, na qual sua molécula (metabólito secundário) não sofreu nenhuma modificação. Bialophos é composto pela toxina phosphinothricin, produzida pelos microrganismos *Streptomyces viridochromogenes* e *S. hygroscopicus*. Bialophos é considerado um proherbicida, pois necessita ser metabolizado pelas plantas, de modo a desempenhar um papel tóxico para as mesmas. Bialophos apresenta amplo espectro de ação sobre as plantas folhas larga e folhas estreitas, não sendo seletivo. Atualmente é comercializado no Japão em pequena escala com o nome de Herbiace<sup>®</sup> (LYDON; DUKE, 1999).

O maior exemplo de sucesso da produção de um herbicida sintético utilizando um composto natural como modelo é o Glufosinato que é comercializado atualmente em todo mundo. A toxina phosphinothricin que compõe Bialophos é a precursora para a síntese desse herbicida. Glufosinato é um potente inibidor da enzima glutamina sintetase (GS). A utilização deste herbicida tem sido empregada de forma mais ampla nos últimos anos em decorrência das culturas transgênicas, que apresentam resistência ao mesmo. Dentre as culturas estão presentes a soja, o algodão, o milho, a canola e o arroz (DUKE et al., 2010).

Os metabólitos secundários (bioherbicidas) podem ser utilizados no manejo de plantas daninhas, em mistura com herbicidas sintéticos. Segundo Hoagland (1990) o efeito sinérgico entre um bioherbicida e um herbicida sintético, poderia reduzir a dose empregada no controle de plantas daninhas para ambos. Segundo Hoagland (1996) casos de sucesso são relatados na literatura em relação a mistura entre herbicidas sintéticos e bioherbicidas, todavia os bioherbicidas empregados em tais estudos são oriundos da aplicação inundativa dos esporos dos fitopatógenos. Entretanto, não existem trabalhos publicados que utilizem metabólitos secundários aplicados em associação com herbicidas sintéticos descritos até o presente momento.

## 2.5 O gênero *Diaporthe*

O gênero *Diaporthe* Nitschke pertence ao filo Ascomycota caracterizando-se por ser um fungo pleomórfico que possui a fase telemórfica (reprodução sexuada) e a fase anamórfica (reprodução assexuada) que recebe a denominação de *Phomopsis* (Sacc.) (DIOGO et al., 2010; UDAYANGA et al., 2011).

Espécies do gênero *Diaporthe* estão presentes em diversas partes do mundo, sendo relatadas como fitopatogênicas (SANTOS et al., 2011), saprofíticas (PROMPUTTHA et al., 2010), endofíticas (CHAPLA et al., 2012) e também como precursoras de doenças em seres humanos (GARCIA-REYNE et al., 2011). Segundo Uecker (1988) este gênero possui uma grande diversidade de hospedeiros, dentre os quais algumas culturas de importância agrícola, ocasionando diversos tipos de danos e sintomas tais como: podridão de raízes, podridão de frutos, necroses, murcha, etc.

As espécies deste gênero têm sido identificadas e denominadas ao longo dos anos em função de suas plantas hospedeiras, o que tem gerado uma grande diversidade de nomes. Todavia com a evolução das técnicas de identificação, atualmente estudos tem revelado que um mesmo microrganismo pode estar associado a diferentes espécies de plantas (UEKER, 1988; DIOGO et al., 2010). A utilização da combinação de diferentes formas de identificação como morfologia, cultura e dados de DNA tem sido empregadas, porém mesmo assim os resultados não tem sido satisfatórios para a delimitação das espécies do gênero *Diaporthe* (UDAYANGA et al., 2012). De acordo com Gomes et al. (2013) existem atualmente mais de 1000 nomes para o gênero *Phomopsis* e mais de 860 para *Diaporthe*.

Os fungos do gênero *Phomopsis* são considerados uma rica e importante fonte de compostos orgânicos com atividade biológica oriundos do seu metabolismo secundário (KOBAYASHI et al., 2003). Nos últimos 40 anos, mais de quarenta compostos até então desconhecidos isolados de microrganismos deste gênero, foram identificados, entre os quais xantonas, lactonas e mycoepoxydienos (YANG et al., 2010). Smith et al. (2008) considera que o gênero *Diaporthe*, possui um grande potencial para a produção de compostos de interesse humano, como para prospecção de novos produtos para indústria, medicina e agricultura. Udayanga et al. (2011) relata 18 metabólitos e enzimas produzidas por esse gênero como a Phomopxanthone, Taxol, enzimas Laccas, Phomopsin, Phomopsichalasin, Dicerandrol (A, B e C), dentre outras

que são empregadas em diferentes funções e áreas tais como, no combate a malária, tuberculose e câncer, como antioxidante, fungicida e inseticida. Dai et al. (2005) estudando um microrganismo do gênero *Phomopsis* sp. isolado da espécie *Adenocarpus foliolosus*, identificaram seis novos metabólitos dentre os quais fungicidas e bactericidas, além de sete composto já conhecidos.

Vários estudos têm sido conduzidos nas ultimas décadas, utilizando fungos do gênero *Diaporthe* para o controle de plantas daninhas ao redor do mundo. Roskopf et al. (2000) obtiveram controle na ordem de 100% para diversas espécies de *Amaranthus* sp. após aplicarem *Phomopsis amaranthicola* isolados de lesões de folhas e hastes de plantas desta mesma espécie. Além desta, outras espécies do gênero *Diaporthe* tem apresentado ação micoherbicida no controle de plantas daninhas, como é o caso de *Phomopsis cirsii* no controle de *Cirsium arvense* (LETH et al., 2008).

## 2.6 Seleção de bioherbicidas oriundos de fungos

A descoberta e o desenvolvimento de bioherbicidas a partir de fitotoxinas para controle de plantas daninhas é considerado um processo complexo. Os programas de *screening* utilizados são compostos por várias etapas que envolvem tempo e demandam investimentos, sobretudo à medida que as pesquisas evoluem. Frequentemente fitopatógenos são encontrados em campo, infectando e causando danos (murcha, necrose, clorose e supressão do crescimento) em diversas espécies de plantas daninhas.

O primeiro passo para descoberta de um bioherbicida consiste no isolamento e identificação desses fitopatógenos (HOAGLAND, 1990; KOHL et al., 2011). O isolamento do fungo pode ocorrer de forma direta, por meio de estruturas vegetativas, como esporos e hifas; ou indiretamente, pela retirada de partes dos tecidos infectados da planta. Essas estruturas são inicialmente transferidas para placas de Petri, contendo meio de cultura, que possibilita o crescimento e desenvolvimento da biomassa de esporos e micélios do microrganismo (SMITH, 2001; CHEN; SWART, 2002).

Na etapa seguinte a biomassa é utilizada como inóculo para obtenção dos metabólitos, por meio de processos fermentativos. De acordo com Ash (2010) existem dois tipos principais de fermentação que são utilizadas para produção de agroquímicos com microrganismos. A fermentação em estado sólido e a fermentação submersa ou em

estado líquido. O tipo de fermentação, bem como as condições do meio fermentativo (tempo de fermentação, temperatura e agitação), influenciam diretamente na produção de metabólitos secundários (VAREJÃO et al., 2013).

Os filtrados oriundos do processo fermentativo são submetidos a bioensaios para averiguar-se a bioatividade dos compostos. Se confirmada a atividade fitotóxica, realiza-se à análise cromatográfica para identificação e isolamento da fitotoxina. Na etapa seguinte, busca-se elucidar a estrutura molecular desta, que pode ser realizada por meio de métodos físicos como difração por raio-X, espectrômetro de massas, espectroscopia de infravermelho, dentre outros (ABBAS et al., 1995; PAVIA et al., 2009). Posteriormente confirmada à identificação de um novo composto realiza-se bioensaios construindo-se curvas dose-resposta para quantificar sua eficácia (VAREJÃO et al., 2013).

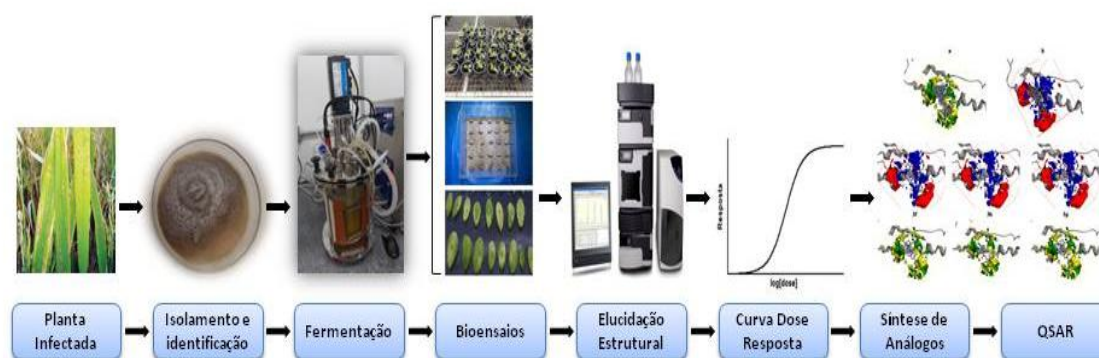
De acordo com Hoagland; Williams (2003) os bioensaios utilizados para avaliação da bioatividade das fitotoxinas devem ser baratos, simples, rápidos e de fácil reprodução. A concentração de fitotoxinas produzidas e liberadas para o meio de cultura pelo microrganismo é bastante reduzida (VAREJÃO et al., 2013). Desta maneira o bioensaio empregado deverá ser capaz de detectar o seu efeito em baixas concentrações. Recomenda-se a utilização de distintos testes biológicos tais como o uso de plântulas, folhas e sementes de diferentes espécies (YUZIKHIN et al., 2007).

Os ensaios de germinação de sementes e crescimento radicular são amplamente utilizados em pesquisas envolvendo controle de plantas por metabólitos secundários. As sementes são depositadas em placas de Petri contendo papel filtro umedecido com a solução teste do processo fermentativo. As placas de Petri são mantidas em câmaras de germinação em condições de temperatura e luz controladas por um determinado período de tempo (JAVOID; ALI, 2011). As avaliações para a germinação de sementes consistem na correlação entre a porcentagem de sementes germinadas no tratamento padrão (testemunha) em relação aos demais tratamentos. Já, os testes para a inibição do crescimento radicular são realizados por meio da correlação entre o comprimento médio das raízes das plântulas tratadas com os metabólitos, em relação à média das raízes sem tratamento (testemunha), em diferentes intervalos de tempo (PHATTANAWASIN et al., 2006).

Nos bioensaios com plântulas, várias sementes da espécie alvo são semeadas em cada vaso, os quais contem substrato comercial ou solo. Após a germinação realiza-se o raleio, para obter-se o número desejável de plantas por vaso. À medida que as plantas

atingem o estágio fisiológico requerido para aplicação, a solução teste é pulverizada sobre a parte aérea das plantas. As avaliações são realizadas em períodos de tempo distintos, considerando as variáveis como, controle de plantas, comprimento de parte aérea, comprimento de raiz e massa seca de parte aérea (JAVAID; ALI, 2011; JAVAID et al., 2011).

Bioensaios utilizando folhas também são amplamente utilizados para testes iniciais em estudos de atividade herbicida de fitotoxinas. Os ensaios podem ser conduzidos tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Alguns destes ensaios utilizam discos retirados das folhas da planta alvo, colocados sobre papel filtro umedecido em caixas plásticas (gerbox ou placas de Petri) e posteriormente perfurado por uma agulha em seu centro. Um determinado volume de solução é aplicado sobre o disco que logo em seguida é encubado com condições de temperatura e luminosidade controladas. As avaliações consistem em avaliar o diâmetro das lesões (PUNZO, 1998).



**Figura 1** - Etapas utilizadas na pesquisa de novas moléculas oriundas de fungos, para o desenvolvimento de bioherbicidas. (Imagem do autor).



### 3 REFERÊNCIAS

ABBAS, H.K. et al. Susceptibility of Various Crop and Weed Species to AAL-Toxin, a Natural Herbicide. **Weed Technology**, v. 9, p. 125-130, 1995.

ADEGAS, F. S.; GAZZIERO, D. L. P.; VOLL, E. Manejo de buva resistente ao glifosato. **Revista DBO Agrotecnologia**, n.3, 2011.

ANDRES, A.; MACHADO, S. L. O. Plantas daninhas em arroz irrigado. In: GOMES, A. S.; MAGALHÃES Jr., A. M. (Eds.). **Arroz irrigado no sul do Brasil**, Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. p. 457-546. 2004.

ASH, G. J. The science, art and business of successful bioherbicides. **Biological Control**, v. 52, p.230-240, 2010.

CHAPLA, V. M. et al. Substâncias acetilênicas produzidas por *Saccharicola* sp., um fungo endofítico de *Eugenia jambolana*. In: 35 REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2012, São Paulo, Águas de Lindóia. **Anais da 35 Reunião Anual Da Sociedade Brasileira de Química** Responsabilidade, Ética e Progresso Social, 2012.

CHARUDATTAN, R. Current status of biological control of weeds. In: KENNEDY, G.G.; SUTTON, T. B. (eds) **Emerging technologies for integrated pest management: concepts, research, and implementation**. APS, St. Paul, 2000, p. 269–288.

CHEN, W. Q.; SWART, W.J. The in vitro phytotoxicity of culture filtrates of *Fusarium oxysporum* to five genotypes of *Amaranthus hybridus*. **Euphytica**, v. 127, p.61-67, 2002.

CHRISTOFFOLETI, P. J. et al. **Aspectos de Resistência de Plantas Daninhas a Herbicidas**. 3 ed. Piracicaba: Associação Brasileira de Ação a Resistência de Plantas aos Herbicidas- HARAC-BR, 2008. 2 p.

DAI, J. et al. Novel highly substituted biraryl ethers, phomosines D-G, isolated from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Adenocarpus foliolosus*. **European Journal of Organic Chemistry**, v.23, p.5100 – 5105, 2005.

DAYAN, F. E.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O. Natural products in crop protection. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v.17, p. 4022 – 4034, 2009.

DIOGO, E. L. F.; SANTOS, J. M.; PHILLIPS, A. J. L. Phylogeny, morphology and pathogenicity of *Diaporthe* and *Phomopsis* species on almond in Portugal. **Fungal Diversity**, v. 44, p.107–115, 2010.

DUKE, S.O.; LYDON, J. Herbicides from natural compounds. **Weed Technology**, v. 1, p. 122–128, 1987.

DUKE, S. O. et al. Natural toxins for use in pest management. **Toxins**, v. 2, p. 1943-1962, 2010.

DUKE, S. O. Why have no new herbicide modes of action appeared in recent years? **Pest Management Science**, v.68, p.502-512, 2012.

FERREIRA, E. A. et al. Potencial competitivo de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*). **Planta Daninha**, Viçosa, v. 26, n.2, p. 261-269, 2008.

FOX, E. M.; HOWLETT, B. J. Secondary metabolism: Regulation and role in fungal biology. **Current Opinion Microbiology**, v. 11, p. 481–487, 2008.

GALON, L. et al. Estimativa das perdas de produtividade de grãos em cultivares de arroz (*Oryza sativa*) pela interferência do capim-arroz (*Echinochloa* spp.). **Planta Daninha**, v. 25, n. 3, p. 697-707, 2007.

GARCIA-REYNE, A. et al. Cutaneous infection by *Phomopsis longicolla* in a renal transplant recipient from Guinea: first report of human infection by this fungus. **Transplant Infectious Disease**, v. 13, p. 204–207, 2011.

GLARE, T. et al. Have biopesticides come of age? **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 250–258, 2012.

GOMES, R. R. et al. Crous. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. **Persoonia**. v. 31, p.1- 41, 2013.

GREEN, J. M.; OWEN, M. D. K. Herbicide-resistant crops: utilities and limitations for herbicide-resistant weed management. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.59, p.5819–5829, 2011.

GREEN, J. M. Current state of herbicides in herbicide-resistant crops. **Pest Management Science**, v. 70, p.1351-1357, 2014.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, p. 1422–1432, 2001.

HENKEL, T. et al. Statistical investigation into the structural complementarity of natural products and synthetic compounds. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 38, p.643–647, 1999.

HEAP, I. International survey of resistances weeds. **Status of Herbicide Resistance in Canada**. 2015. Disponível em: <http://weedscience.org/sequence/sequence.aspx>. Acessado em: 20 mar. de 2015

HEAP, I. International Survey of Herbicide Resistant Weeds. **Weed Science Society of America** 2015. Disponível em: <http://www.weedscience.org>. Acessado em: 26 mai. De 2015.

HOAGLAND, R. E. **Microbes and microbial products as herbicides** — an overview. ACS Symposium, Series 439, 1990, p. 2–52.

HOAGLAND, R. E. Chemical interactions with bioherbicides to improve efficacy. **Weed Technology**, v. 10, 651– 674, 1996.

HOAGLAND, R.E., WILLIAMS, R.D., 2003. Bioassays e useful tools for the study of allelopathy. In: MACÍAS, F.A., GALINDO, J.C.G., MOLINILLO, J.M.G., Culter, H.G. (Eds.), **Allelopathy e Chemistry and Mode of Action of Allelochemicals**. CRC Press, Boca Raton, p. 315-351.

HOLMAN, J. D. et al. Spring wheat, canola, and sunflower response to Persian darnel (*Lolium persicam*) interference. **Weed Technology**, v. 18, n. 3, p. 509-520, 2004.

HRAC-BR. Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas Daninhas aos Herbicidas. **Assuntos Técnicos**. São Paulo, 2015. Disponível em: <http://www.hrac-br.com.br/wordpress/?p=527>. Acesso em: 20 de mar. 2015.

JAVAID, A.; ALI, S. Alternative management of a problematic weed of wheat *Avena fatua* L. by metabolites of *Trichoderma*. **Chilean journal of agricultural research**, v.71, n.2, p.205-211, 2011.

JAVAID, A.; ALI, S.; AKBAR, M. Herbicidal potential of *Drechslera* spp. culture filtrates against *Parthenium hysterophorus* L. **Chilean journal of agricultural research**, Chillán, Chile, v. 71, n. 4, 2011. Nota científica.

KELLER, N.P.; TURNER, G.; BENNETT, J.W. Fungal secondary metabolism from biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**. p. 937-947, 2005.

KOBAYASHI, H. et al. Absolute structure, biosynthesis, and anti-microtubule activity of *Phomopsidin*, isolated from a marine-derived fungus *Phomopsis* sp. **Tetrahedron**, v. 59, p. 455–459, 2003.

KOHL, J. et al. Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria. **Biological Control**, v. 57, p.1–12, 2011.

LETH, V.; NETLAND, J.; ANDREASEN, C. *Phomopsis cirsi*: a potential biocontrol agent of *Cirsium arvense*. **Weed Research (Oxford)**, v. 48, p. 533–541, 2008.

LYNDON, J.; DUKE, S. O. Herbicides from natural compounds. **Weed Technology**, v. 1, p. 122-128, 1987.

LYDON, J.; DUKE, S. O. Inhibitors of glutamine biosynthesis. In: **Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology** (ed. BK Singh), Marcel Dekker, New York, USA, 1999, p. 445-464.

LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional**. 7. ed. Plantarum, Nova Odessa, Brasil, 15p. 2014.

MCDougall, P. **The global agrochemical market in 2010** – preliminary 275 review. 2014. Disponível em: <<http://www.phillipsmcdougall.com>>. Acesso em: 28 set. 2014.

MUNAKATA, K. et al. NK-049: From natural products to new herbicides. Proceedings Asian-Pacific. **Weed Science Society Conference**, v. 4, p. 215-219, 1973.

OLIVEIRA JR. R. S.; CONSTANTIN, J.; INQUE, M. H. Resistência de plantas daninhas. In: **Biologia e Manejo de Plantas Daninhas**. Curitiba- PR, Eds. 2011, cap.8, p. 362.

ONU. ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. **Recursos Mundiais:** criando um futuro sustentável alimentar, 2013. Disponível em: <http://nacoesunidas.org/mundo-precisara-produzir-70-mais-alimentos-ate-2050-calcula-onu/>. Acesso em: 28 fev. 2015.

ORTIZ-RIBBING, L.; WILLIAMS, M. M. Conidial germination and germ tube elongation of *Phomopsis amaranthicola* and *Microsphaeropsis amaranthi* on leaf surfaces of seven *Amaranthus* species: implications for biological control. **Biological Control**, v. 38, p. 356–362, 2006.

PAVIA, D. L. et al. Introduction to Spectroscopy. 4 ed. Brooks/Cole Cengage Learning, Belmont, 2009.

PEARCE, C. Biologically active fungal metabolites. **Advances in Applied Microbiology**, v. 44, p. 1-68, 1997.

PHATTANAWASIN, P. et al. Screening of Fungal Extracts for Weed Germination and Growth Inhibitory Activity. **Silpakorn University International Journal**, v. 6, n. 1/2, p. 136-144, 2006.

PROMPUTTHA, I. et al. Can leaf degrading enzymes provide evidence that endophytic fungi becoming saprobes? **Fungal Diversity**, v.41, p.89–99, 2010.

PUNZO, B. V. **Phytotoxins produced by *Alternaria sonchi*, a potencial mycoherbicide for biocontrol of *Sonchus arvensis*. 2009. P.118.** Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell’Ambiente e delle Produzioni Animali Dottorato di Ricerca in AGROBIOLOGIA E AGROCHIMICA.

RIZZARDI, M. A. et al. Perdas de rendimento de grãos de soja causadas por interferência de picão-preto e guanxuma. **Ciência Rural**, v. 33, p. 621-627, 2003.

ROSSKOPF E.N. et al. *Phomopsis amaranthicola*, a new species from *Amaranthus* sp. **Mycologia**, v. 92, p. 114–122, 2000.

SANTOS, J. M. et al. Resolving the *Diaporthe* species occurring on soybean in Croatia. **Persoonia**, v. 27, p. 9–19, 2011.

SANTOS, F. M. et al. Differential susceptibility of biotypes of *Conyza sumatrensis* to Chlorimuron-ethyl herbicide. **Planta Daninha**, v. 32, n. 2, 2014.

SCHUMANN, J.; HERTWECK, C. Advances in cloning, functional analysis and heterologous expression of fungal polyketide synthase genes. **Journal of Biotechnology**, v.124, p. 690-703, 2006.

SIDDIQUE, M. H. Study of the biosynthesis pathway of the geosmin in *Penicillium expansum*. Institut National Polytechnique de Toulouse, Laboratoire de Engenharia Química, França, 2012. Disponível em: <http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00001986/>. Acesso em: 13 de fev. de 2015.

SILVA, A. F. et al. Período anterior à interferência na cultura da soja-RR em condições de baixa, média e alta infestação. **Planta Daninha**, v.27, p.57-66, 2009.

SILVA, A. A.; SILVA, J. F. (Eds. 3). **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2012. p.7.

SMITH, D. Culturing, preservation and maintenance of fungi. In: WALLER, J.M., LENNÉ, J.M., WALLER, S.J. (Eds.), **Plant Pathologists Pocketbook**. CABI Bioscience, Egham, 2001, p. 384-409.

SMITH, S. A. et al. Bioactive endophytes warrants intensified exploration and conservation. **PLoS ONE**, v. 3, p. 30–52, 2008.

TREMACOLDI, C. R.; FILHO, A. P. S. S. Toxinas produzidas por fungos Fitopatógenos: **Possibilidades de Uso no Controle de Plantas Daninhas**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2006. 24 p. (Documentos, 274).

UDAYANGA, D. et al. The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common pathogens. **Fungal Diversity**, v. 50, p. 189–225, 2011.

UDAYANGA, D. et al. A multi-locus phylogenetic evaluation of *Diaporthe* (*Phomopsis*). **Fungal Diversity**, v. 56, p. 157–171, 2012.

UECKER, F. A. A world list of *Phomopsis* names with notes on nomenclature, morphology and biology. **Mycologia Memoir**, v. 13, p. 1–231, 1988.

VAREJÃO, E. V. V. et al. The search for new natural herbicides – Strategic approaches for discovering fungal phytotoxins. **Crop Protection**, v. 48. p.41-50, 2013.

VINING, L.C. Functions of secondary metabolites. **Annual Review of Microbiology**, v.44, p. 395-427, 1990.

WEED SCIENCE - **INTERNATIONAL SURVEY OF HERBICIDE RESISTANT WEEDS**. Disponível em: <http://weedsociety.org/summary/species.aspx>. Acesso em: 20 mar. 2015.

YANG, J. et al. Metabolites from the mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. (#zsu- H76). **European Journal of Organic Chemistry**, v.19, p.3692–3695, 2010.

YUZHAKHIN, O.; MITINA, G.; BERESTETSKIY, A. Herbicidal potential of stagonolide, a new phytotoxic nonenolide from *Stagonospora cirsi*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 7707–7711, 2007.

## 4 ARTIGO

### Efeito herbicida de metabólitos de *Diaporthe* sp. no controle pré-emergente e pós-emergente de plantas

#### Herbicidal effect of metabolites *Diaporthe* sp. pre-emergent and post-emergent control plants

#### RESUMO

O estudo teve por objetivo avaliar a atividade herbicida de metabólitos secundários de *Diaporthe* sp. obtidos por meio de processo fermentativo submerso. Os efeitos dos metabólitos foram avaliados por meio de uma avaliação primária e uma avaliação secundária em bioensaios em laboratório e em casa de vegetação, no controle pré e pós-emergência de plantas. A avaliação primária foi realizada em laboratório com caixas de polietileno do tipo gerbox, utilizando como substrato papel germitest embebido com 10 mL com metabólitos secundários de *Diaporthe* sp. a onde foram alocadas sementes de *Glycine max*, *Cucumis sativus*, *Triticum aestivum*, *Oryza sativa*, *Lolium multiflorum*, *Sorghum halepense*. Já para na avaliação secundária foram realizados dois experimentos em casa de vegetação. O experimento 1 foi composto pela aplicação de diferentes doses dos metabólitos secundários (0, 1/4D, 1/2D, D, 2D, 4D e 8D) via parte aérea de plantas para as espécies *Glycine max*, *Conyza* sp., *Oryza sativa*, *Echinochloa* sp., *Triticum aestivum* e *Lolium multiflorum*. Para o experimento 2 foram utilizadas estas mesmas espécies de plantas. Porém, os tratamentos foram compostos pela mistura entre herbicidas comerciais e metabólitos secundários para verificar um possível sinergismo ocasionado pela mistura entre os compostos. Além disto, realizou-se o efeito da adição de um adjuvante junto aos metabólitos secundários. Para ambos os experimentos foram avaliados o peso da MSPA, fitotoxicidade e controle de plantas. Os resultados para avaliação primária demonstraram que os metabólitos inibiram significativamente a germinação das espécies na ordem de 100%, quando comparado ao tratamento testemunha. Para a avaliação secundária, no experimento 1, as maiores doses resultaram em redução do peso da MSPA para as espécies *Glycine max* e *Conyza* sp.. No experimento 2 não houve sinergismo ou antagonismo para a mistura entre herbicidas sintéticos e metabólitos secundários. Já a adição do adjuvante resultou em melhor ação dos metabólitos secundários.

**Palavras-chave:** doses, mistura, adjuvante, avaliação primária, avaliação secundária.



## ABSTRACT

The study aimed to evaluate the herbicide activity of secondary metabolites of *Diaporthe* sp. obtained by submerged fermentation. The effects of metabolites were evaluated by a primary assessment and secondary assessment in bioassays in the laboratory and in the greenhouse, in the pre and post-emergence control plants. The primary assessment was carried out in the laboratory with polyethylene boxes gerbox using paper as substrate germitest soaked with 10 mL with secondary metabolites of *Diaporthe* sp. the where were allocated seeds of *Glycine max*, *Cucumis sativus*, *Triticum aestivum*, *Oryza sativa*, *Lolium multiflorum*, *Sorghum halepense*. As for the secondary assessment two experiments were conducted in a greenhouse. Experiment 1 was composed by applying different doses of secondary metabolites (0, 1 / 4D 1 / 2D, D, 2D, 4D and 8D) via aerial parts of plants for the species *Glycine max*, *Conyza* sp., *Oryza sativa*, *Echinochloa* sp., *Triticum aestivum* and *Lolium multiflorum*. For the experiment 2 these same plant species were used. However, the treatments consisted of mix between commercial herbicides and secondary metabolites to check a possible synergism or antagonist caused by the mixture of the compounds. In addition, there was the effect of adding an adjuvant together with the secondary metabolites. For both experiments evaluated the weight of the MSPA, phytotoxicity and control plants. The results for the primary evaluation demonstrated that the metabolites significantly inhibited the germination of species in the order of 100% when compared to the control treatment. For the secondary assessment in experiment 1, the highest dose resulted in reducing the burden of MSPA for the species *Glycine max* and *Conyza* sp.. In experiment 2 there was no synergism to the mix of synthetic herbicides and secondary metabolites. Since the addition of the adjuvant resulted in better action of secondary metabolites.

**Key-words:** doses, mixing, adjuvant, primary assessment, secondary assessment.

#### 4.1 INTRODUÇÃO

Na agricultura contemporânea, existe a constante necessidade por índices de produtividade mais elevados, devido à demanda crescente por alimentos. Em contrapartida, diversos fatores restringem a produção, dentre os quais, as plantas daninhas. O controle destas pode ser realizado utilizando diferentes métodos de controle como mecânico, físico, biológico e químico (SILVA; SILVA, 2012). O emprego de vários métodos de controle de forma conjunta que desfavoreçam o desenvolvimento das plantas daninhas e reduzam seus efeitos sobre a cultura, compõe o manejo integrado de plantas daninhas (MIPD) (NUNES et al., 2010). No entanto o controle de plantas daninhas nas últimas décadas é realizado principalmente por meio do controle químico (OLIVEIRA JR. et al., 2011), que em decorrência do uso de forma inadequada, tem propiciado a seleção de biótipos resistentes (CHRISTOFFOLETI, 1997).

No Brasil casos de populações de biótipos de plantas daninhas resistentes a herbicidas sintéticos são um constante problema enfrentado pelos agricultores nos cultivos agrícolas e são cada vez mais frequentes. Como na cultura do trigo, no qual *Lolium multiflorum* apresenta resistência aos herbicidas sintéticos do grupo dos herbicidas inibidores da ALS, EPSPs e ACCase. Na cultura da soja com as plantas de *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis* resistentes ao herbicida inibidor da EPSPs e *Conyza sumatrensis* resistentes aos herbicidas inibidores da ALS e EPSPs. Na cultura do arroz irrigado onde *Echinochloa crus-galli* var. *crus-galli* expressa resistência aos herbicidas inibidores da ALS e mimetizadores de auxina (HRAC-BR, 2015).

Esses crescentes e contínuos aumentos do número de casos de plantas daninhas resistentes aos herbicidas gera a necessidade da descoberta de novos modos de ação e classes de herbicidas. Entretanto, há vinte anos um herbicida com novo modo de ação

não é introduzido no mercado (DUKE; DAYAN, 2014). Neste contexto, as moléculas de origem biológica são consideradas importantes fontes para a prospecção e desenvolvimento de produtos para o manejo de plantas daninhas (DUKE et al., 2002).

Os fungos são frequentemente encontrados na natureza, colonizando e muitas vezes causando danos severos em algumas espécies de plantas daninhas (BARRETO; EVANS, 1998). Este fato tem fomentado pesquisas em relação ao emprego destes microrganismos e seus metabólitos como agentes no controle de plantas, bem como, na descoberta de novos sítios de ação e moléculas bioativas (DUKE; DAYAN, 2014). Segundo Duke et al. (2000) existem muitas toxinas de origem natural, ainda inexploradas e que apresentam ação herbicida em sítios distintos dos conhecidos atualmente.

Diversas pesquisas têm demonstrado e comprovam a atividade fitotóxica dos metabólitos produzidos pelos microrganismos sobre plantas daninhas. Varejão et al. (2013) identificaram compostos produzidos pelo patógeno *Alternaria euphorbiicola*, que expressaram ação herbicida sobre *Euphorbia heterophylla*. Khattak et al. (2014) também verificaram a ação de metabólitos produzidos por *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., interferindo no crescimento de plantas de *Lemna minor* e na germinação de sementes de *Silybum marianum*.

O gênero *Diaporthe*, segundo Gomes (2012), também é considerado uma promissora fonte para o desenvolvimento biotecnológico, em decorrência da produção de metabólitos estruturalmente significativos e biologicamente ativos.

Desta maneira os metabólitos secundários produzidos pelo gênero *Diaporthe* podem ser uma alternativa no manejo de plantas daninhas de difícil controle bem como, mais uma ferramenta a ser utilizada no MIPD. Tendo em vista a presença constante de *L. multiflorum*, *Conyza* spp. e *Echinochloa* spp. no território agrícola nacional,

sobretudo nas áreas cultivadas no estado do Rio Grande do Sul, bem como as dificuldades enfrentadas para o controle dessas invasoras, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito herbicida de metabólitos secundários produzidos por *Diaporthe* sp.. Para isso foi realizada uma avaliação primária e uma secundária dos fermentados deste microrganismo no controle pré e pós-emergente de plantas daninhas e cultivadas.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados três bioensaios para avaliação do efeito herbicida de produto obtido da fermentação submersa de *Diaporthe* sp. no controle de sementes (pré-emergente) para as espécies soja (*Glycine max*), pepino (*Cucumis sativus*), trigo (*Triticum aestivum*), arroz (*Oryza sativa*), azevém (*Lolium multiflorum*) e sorgo (*Sorghum halepense*) e no controle de plantas (pós-emergente) para *Glycine max*, *Triticum aestivum*, *Oryza sativa*, *Lolium multiflorum*, buva (*Conyza* sp.) e capim arroz (*Echinochloa* sp.).

### 4.2.1 Local

A avaliação primária foi realizada utilizando uma câmara de germinação de sementes no Laboratório de Bioprocessos localizado no Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) - RS. Já a segunda avaliação foi conduzida em casa de vegetação, localizada nas coordenadas 29° 43'39.79''S e 53°33'40.06''O.

### 4.2.2 Isolado e obtenção de metabólitos

O fungo *Diaporthe* sp. foi isolado de lesões nas folhas de *Solanum americanum* Mill., coletadas no Bioma Pampa e levadas para o Laboratório de Bioprocessos do Departamento de Engenharia Química da UFSM. O microrganismo foi cultivado no meio Batata Dextrose Ágar (BDA) pelo período de 7 dias a 28°C. O inóculo foi preparado a partir da retirada de um disco de 6 mm de diâmetro do micélio do microrganismo, e inoculado em Erlenmeyers com 70 mL do meio líquido BD autoclavado. Logo após, os frascos foram levados para uma estufa bacteriológica onde permaneceram pelo período de 7 dias a uma temperatura de 28 °C.

A fermentação submersa foi realizada em um biorreator em batelada do tipo STR com volume útil de 4,5 L. O meio utilizado apresentava: 33% (v/v) de água de maceração de milho (AMM) 18 g. L<sup>-1</sup> de sacarose, 2 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), 1 g.L<sup>-1</sup> de sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) e 1 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de manganês (MnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) seguindo a metodologia proposta por Souza (2015).

O inóculo foi retirado da estufa bacteriológica após 7 dias, para retirada e maceração dos micélios. Foram inoculados cerca de 7 g de micélio em garrafas de Roux, com 70 mL do meio de cultura, para o crescimento do fungo. Foram utilizadas: aeração de 2,0 L/min., agitação de 50 rpm, temperatura de 28 °C, pH de 5,8 e tempo de fermentação de 72 horas. Para o ajuste do pH, soluções de ácido acético de 2 M e hidróxido de sódio 2 M foram acopladas às bombas peristálticas do processador do aparelho. Já para a redução de espuma foi utilizado o produto Agrotex AG229. Ao final do cultivo, a biomassa foi separada do caldo fermentado por processo de filtração com uma peneira de polietileno.

#### 4.2.3 Avaliação primária

A avaliação primária foi realizada por meio do teste de germinação de sementes de seis espécies de plantas, abrangendo as dicotiledôneas, *G. max* e *C. sativus* e de monocotiledôneas *T. aestivum*, *O. sativa*, *L. multiflorum* e *S. halepense*. As espécies foram escolhidas considerando observações feitas por Macias et al. (2000), que relatam que sementes de espécies comerciais demonstram vantagens para estes testes, frente às plantas daninhas, pois possuem germinação uniforme, homogeneidade genética e ausência de dormência. Para os testes, utilizou-se caixas plásticas tipo gerbox transparentes, com capacidade de 250 mL. Como substrato cada caixa recebeu duas folhas de papel filtro (Germitest<sup>®</sup>) de acordo com as recomendações técnicas das Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009). Posteriormente foram selecionadas 100 sementes de cada espécie, distribuídas de forma equidistante, com o auxílio de uma pinça, em quatro caixas gerbox (25 sementes por caixa).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) com dois tratamentos e quatro repetições para cada espécie. O tratamento T1 foi composto pelos metabólitos de *Diaporthe* sp., ao passo que o tratamento T2 (testemunha) constitui-se por água destilada. Para o tratamento T1, cada caixa gerbox recebeu o volume de 10 mL de solução contendo metabólitos de *Diaporthe* sp. e no tratamento T2, cada caixa recebeu 10 mL de água destilada.

As caixas gerbox foram tampadas e seladas com Parafilm sendo levadas para a câmara de germinação (modelo: KK 350 TOP+) mantidas a temperatura de  $\pm 28$  °C, onde permaneceram por sete dias. Depois as mesmas foram retiradas e então se realizou a contagem do número de sementes germinadas. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram a protrusão da raiz primária com comprimento superior a 2 mm (BRASIL, 2009). A germinação foi calculada por meio da equação:

$$\text{Germinação: } G\% = [\sum ni/A].100$$

Onde, ni:é o número de sementes germinadas em cada repetição; A: total de sementes utilizadas

#### 4.2.4 Avaliação secundária

A avaliação secundária constituiu-se de dois experimentos: Experimento 1, no qual variou-se a dose da solução com metabólitos secundários; Experimento 2, no qual foi aplicado os metabólitos em mistura com herbicidas sintéticos e com adjuvantes.

##### 4.2.4.1 Experimento 1

O experimento foi constituído pela aplicação de sete doses distintas dos metabólitos de *Diaporthe* sp. na parte aérea das plantas de soja, trigo, arroz, azevém, buva e capim arroz. As doses utilizadas foram 0D, 1/4D, 1/2D, 1D, 2D, 4D e 8D, no qual D corresponde à solução com metabólitos de *Diaporthe* sp. de forma pura (concentração de 100%), ou seja, parte líquida da fermentação. Para todos os tratamentos foi utilizado o óleo mineral (Assist<sup>®</sup>) na dose de 0,5% v/v.

O delineamento experimental utilizado foi Inteiramente Casualizado (DIC) com cinco repetições. As unidades experimentais (UEs) foram vasos de polietileno com volume de 500 mL, preenchidos com substrato comercial Macplant<sup>®</sup>, onde semeou-se manualmente quatro sementes por vaso de cada espécie testada. Após a emergência das plantas, foi realizado o raleio, mantendo-se apenas uma planta por vaso.

Para a aplicação dos tratamentos utilizou-se um pulverizador costal pressurizado a CO<sub>2</sub>, dotado de uma barra com quatro pontas do modelo Teejet XR 110.02 com pressão de 40 lbf e espaçamento entre pontas de 0,5 metros. A velocidade de

deslocamento foi de  $1 \text{ m s}^{-1}$  e o volume de calda utilizado foi  $200 \text{ L ha}^{-1}$ . A temperatura e umidade relativa do ar no momento da aplicação eram de  $31,2^\circ \text{ C}$  e 62% respectivamente. Os tratamentos foram aplicados no momento em que as plantas se encontravam no estágio de duas a três folhas.

Foram avaliadas três variáveis: fitotoxicidade, controle e peso da massa seca da parte aérea (MSPA). A fitotoxicidade foi avaliada para as espécies de *G. max*, *T. aestivum* e *O. sativa* aos 7 e 15 Dias Após a Aplicação (DAA). A avaliação de fitotoxicidade foi realizada por meio de uma estimativa visual utilizando a escala desenvolvida por Frans; Crowley (1986) a qual possui intervalo de notas de 0 a 100% onde, 0% equivale à inexistência de fitotoxicidade e 100% representa a destruição completa da cultura. Em relação à avaliação de controle, as espécies avaliadas foram *E. sp.*, *C. sp.* e *L. multiflorum* aos 15 DAA, por meio de estimativa visual utilizando a escala de Frans; Crowley (1986), composta pelo intervalo de 0 a 100%, onde 0% equivale a nenhum controle e 100% corresponde a destruição total.

Após a última avaliação de fitotoxicidade e controle (15 DAA) as plantas foram seccionadas com tesoura a partir do colo, identificadas, acondicionadas em sacos de papel e levadas para uma estufa de secagem, onde permaneceram a uma temperatura de aproximadamente  $70^\circ \text{ C}$ , pelo período de 72 horas, para a obtenção da massa seca da parte aérea (MSPA), obtida em uma balança analítica (modelo: Mark M 214 A).

Os dados de MSPA foram tabulados e transformados pela da raiz quadrada de  $x + 0,5$ . Os resultados submetidos à análise de variância e separação das médias, pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ), com o pacote estatístico Assistat<sup>®</sup> versão 7.7 beta. Para o cálculo do desvio padrão e a confecção dos gráficos foi utilizado o software Excell versão 2007.



#### 4.2.4.2 Experimento 2

O experimento foi composto por sete tratamentos, utilizando solução com metabólitos de *Diaporthe* sp., puro e em associação com herbicidas sintéticos aplicados à parte aérea das plantas de soja, trigo, arroz, azevém, buva e capim arroz. Também foi verificado o efeito do adjuvante Assist no desempenho dos metabólitos de *Diaporthe* sp.. Cada uma das culturas e sua respectiva planta daninha foram tratadas com herbicida sintético específico recomendado para cada cultura. Os tratamentos utilizados estão descritos na (Tabela 1).

Os dados de MSPA foram tabulados e transformados pela da raiz quadrada de  $x + 0,5$ . Os resultados submetidos à análise de variância e separação das médias, pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ), com o pacote estatístico Assistat<sup>®</sup> versão 7.7 beta. Para a confecção dos gráficos foi utilizado o software Excell versão 2007.

**Tabela 1** - Tratamentos, nomes, doses do bioherbicida e herbicidas sintéticos, associados ou isolados, utilizados para as diferentes culturas e suas respectivas plantas daninhas. Santa Maria, RS, 2015.

<b>Trat.</b>	<b>Nome</b>	<b>Ingrediente Ativo</b>	<b>Dose/ha<sup>-1</sup></b>
<b><i>Oryza sativa e Echinochloa sp.</i></b>			
T1	Testemunha	-	-
T2	Clincher + Veget'oil	Cialofope butílico + Óleo vegetal	1,5 L + 0,5 v/v
T3	Clincher + Veget'oil	Cialofope butílico + Óleo vegetal	0,75 L + 0,5% v/v
T4	Bioherbicida + Assist	Metabólito Secundário + Óleo mineral	4 D + 0,5% v/v
T5	Bioherbicida	Metabólito Secundário	8 D
T6	Bioherbicida + Assist	Metabólito Secundário + Óleo mineral	8 D + 0,5% v/v
T7	Bioherbicida + Assist + Clincher + Veget'oil	Metabólito Secundário + Óleo mineral + Cialofope butílico + Óleo vegetal	4 D + 0,5% v/v + 0,75 L + 0,5% v/v
<b><i>Triticum aestivum e Lolium multiflorum</i></b>			
T1	Testemunha	-	-
T2	Hussar + Hoefix	Iodosulfurom-metílico + Espalhante adesivo	70 g + 0,5% v/v
T3	Hussar + Hoefix	Iodosulfurom-metílico + Espalhante adesivo	35 g + 0,5% v/v
T4	Bioherbicida + Assist	Metabólito Secundário + Óleo mineral	4 D + 0,5% v/v
T5	Bioherbicida	Metabólito Secundário	8 D
T6	Bioherbicida + Assist	Metabólito Secundário + Óleo mineral	8 D + 0,5% v/v
T7	Bioherbicida + Assist + Hussar + Hoefix	Metabólito Secundário + Óleo mineral + Iodosulfurom-metílico + Espalhante adesivo	4 D + 0,5% v/v + 35 g + 0,5% v/v
<b><i>Glycine max e Conyza sp.</i></b>			
T1	Testemunha	-	-
T2	Zapp QI	Glifosato potássico	2 L
T3	Zapp QI	Glifosato potássico	1 L
T4	Bioherbicida + Assist	Metabólito secundário + Óleo mineral	4 D + 0,5% v/v
T5	Bioherbicida	Metabólito secundário	8 D
T6	Bioherbicida + Assist	Metabólito secundário + Óleo mineral	8 D + 0,5% v/v
T7	Bioherbicida + Assist + Zapp QI	Metabólito secundário + Óleo mineral + Glifosato potássico	4 D + 0,5% v/v + 1 L

O delineamento experimental utilizado foi Inteiramente Casualizado (DIC) com quatro repetições. Como UEs foram empregados recipientes de polietileno com volume útil de 500 mL. Os recipientes foram completamente preenchidos com substratos comercial Mecplant<sup>®</sup>. A metodologia de aplicação, bem como as variáveis avaliadas para os biensaíais foram similares as utilizadas para o experimento 1.

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1 Avaliação primária

A avaliação primária demonstrou que existe um efeito herbicida da solução contendo metabólitos de *Diaporthe* sp., para as diferentes espécies de plantas daninhas e cultivadas, em relação à porcentagem de germinação (Tabela 2). As sementes de *G. max*, *C. sativus*, *T. aestivum*, *O. sativa*, *L. multiflorum* e *S. halepense*, quando submetidas ao filtrado oriundo do processo fermentativo, não apresentaram a protusão radicular, ou seja, havendo inibição da germinação na ordem de 100% para todas as espécies testadas (Figura 2 e Figura 3). À medida que o tratamento testemunha (água destilada) não teve influencia na inibição do processo germinativo para nenhuma das espécies (Figura 2 e Figura 3).

**Tabela 2** - Inibição da germinação (%) pela aplicação dos metabólitos de *Diaporthe* sp. para as diferentes espécies. Santa Maria, RS, 2015.

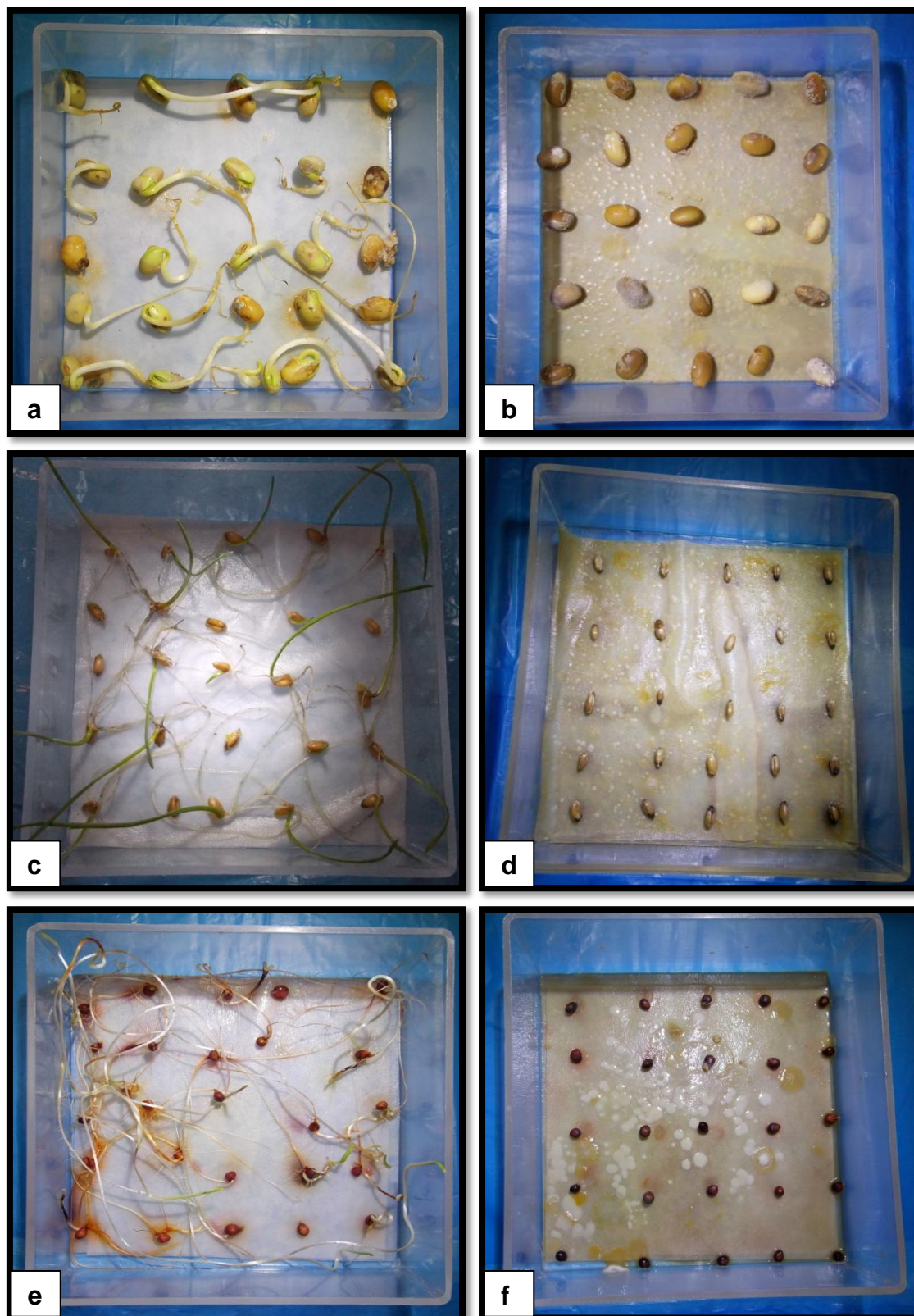
Espécies	Sementes germinadas (%)	
	Metabólitos de <i>Diaporthe</i> sp.	Água destilada
<i>Lolium multiflorum</i>	0	68
<i>Triticum aestivum</i>	0	78
<i>Oryza sativa</i>	0	95
<i>Cucumis sativus</i>	0	96
<i>Glycine max</i>	0	87
<i>Sorghum halepense</i>	0	91

Resultados semelhantes foram encontrados por Phattanawasin et al. (2006) que utilizando metabólitos de *Aspergillus fischeri*, inibiu na ordem de 100% a germinação de *Echinochloa crus-galli* [L.] e *Mimosa pigra* Linn. Estes resultados demonstram que a utilização de metabólitos pode ter efeito sobre a germinação de sementes. O efeito herbicida pré-emergente, ou seja, sobre sementes é uma alternativa importante no manejo de plantas daninhas resistentes, podendo ser usado no controle de espécies pertencentes à mesma família que a planta cultivada, tal como, *L. multiflorum* e *T. aestivum*. Desta maneira, o controle por meio de um herbicida pré-emergente, possibilita uma redução na emergência e na competição, principalmente na fase inicial do estabelecimento da cultura, propiciando ainda ao longo do tempo a redução no banco de sementes.

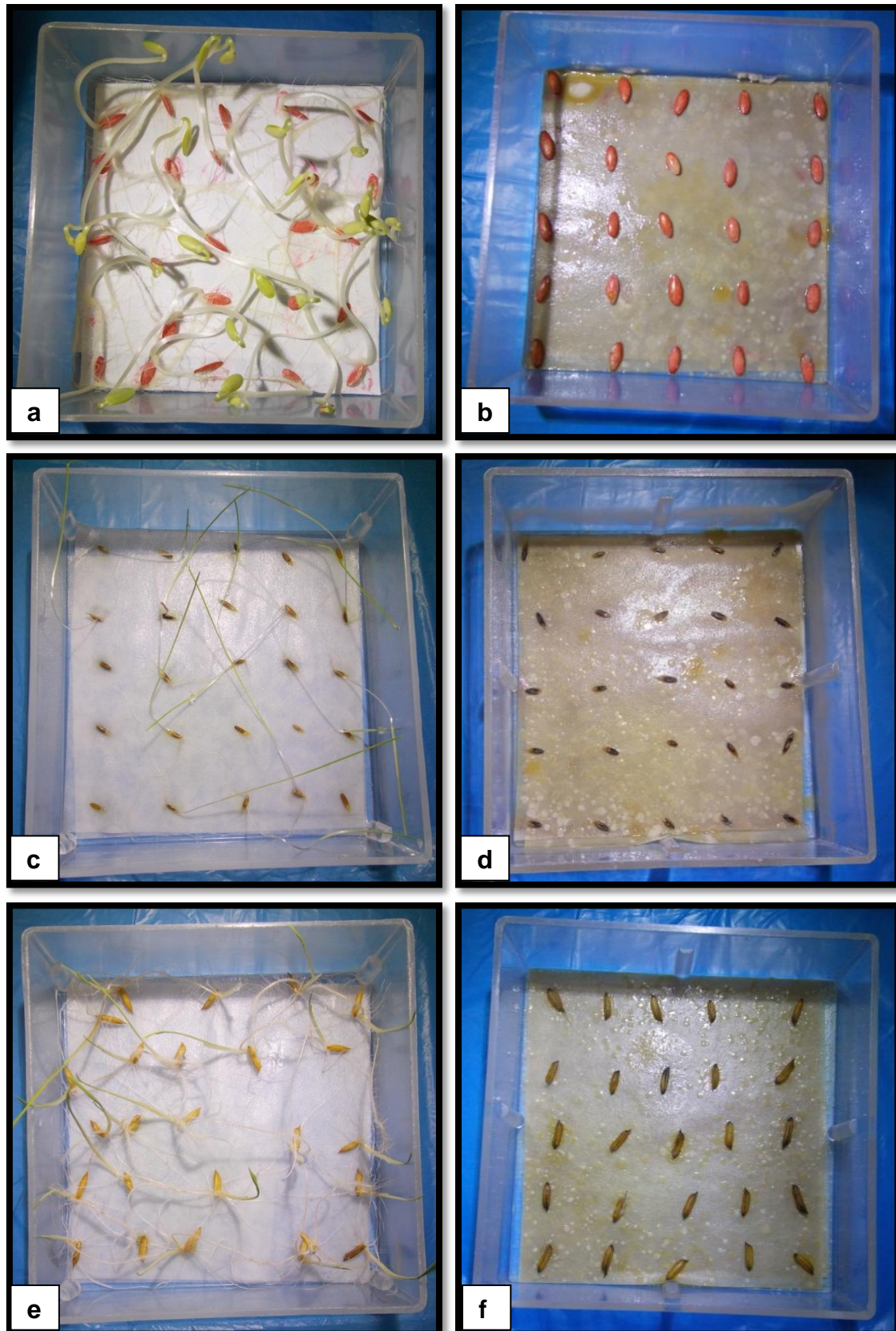
A inibição da germinação pela ação dos metabólitos secundários pode estar relacionada a substâncias do grupo dos terpenóides, as quais são produzidas por uma grande gama de fungos. De acordo com Castro et al. (2001) os terpenóides possuem

funções hormonais, que inibem o crescimento e atuam no transporte de moléculas através da membrana. Além disso, outra possibilidade é de que esta inibição esteja relacionada a atividade da enzima acetolactato sintase, responsável pela biossíntese de aminoácidos essenciais, tais como, a valina, leucina e isoleucina. Entretanto, para confirmação dessas hipóteses são necessários estudos mais aprofundados para elucidar e entender este processo.

Os metabólitos de *Diaporthe* sp. apresentaram um amplo espectro de ação herbicida em pré-emergência, pois controlaram tanto plantas do grupo das dicotiledôneas (*G. max* e *C. sativus*) como monocotiledôneas (*T. aestivum*, *O. sativa*, *L. multiflorum* e *S. halepense*). Resultados semelhantes foram encontrados por Souza (2015), que utilizando metabólitos de *Diaporthe* sp., em ensaios de pré-emergência obteve controle tanto de *Cucumis sativus* como de *Sorghum* sp.. A característica de controle sobre distintas famílias de plantas, bem como diferentes espécies, é considerada benéfica, do ponto de vista agrônomo, pois em campo predominantemente ocorre um complexo de plantas daninhas e não apenas uma espécie isolada.



**Figura 2** - Sementes de: (a) *Glycine max*; (c) *Triticum aestivum*; (e) *Sorghum halepense* germinadas sob efeito de água destilada a esquerda e sementes de, (b) *Glycine max*; (d) *Triticum aestivum*; (f) *Sorghum halepense* com germinação inibida pela ação de metabólitos de *Diaporthe* sp. a direita.



**Figura 3** - Sementes de: (a) *Cucumis sativus*; (c) *Lolium multiflorum*; (e) *Oryza sativa* germinadas sob efeito de água destilada a esquerda e sementes de, (b) *Cucumis sativus*; (d) *Lolium multiflorum*; (f) *Oryza sativa* com germinação inibida pela ação de metabólitos de *Diaporthe* sp. a direita.

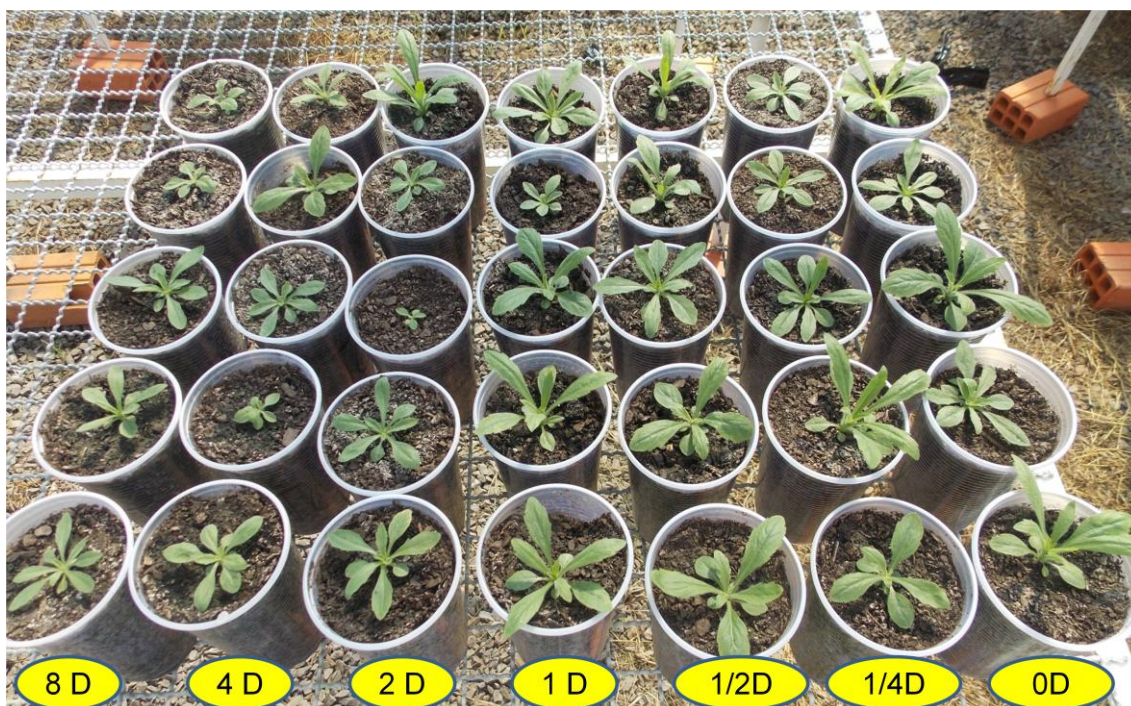
#### 4.3.2 Avaliação secundária (Experimento 1)

O peso da massa seca da parte aérea (MSPA) de *G. max* e *C. sp.*, variou em função da dose de solução contendo metabólitos secundários de *Diaporthe sp.* (Figura 4). Os melhores resultados para *C. sp.*, foram encontrados quando se utilizou as doses 4D e 8D, ocorrendo uma redução de aproximadamente 50% do peso da MSPA, em comparação com o tratamento testemunha. O peso da MSPA das plantas submetidas a doses inferiores a 2D não diferiu do tratamento testemunha para esta variável, demonstrando que os metabólitos precisam de uma dose superior a 4D para apresentarem efeito. A resposta em relação à redução do peso da MSPA das plantas pela aplicação das doses mais elevadas está diretamente relacionada à maior concentração dos metabólitos secundários de *Diaporthe sp.* aplicados sobre as plantas de *C. sp.* e *G. max*.

Em relação ao controle de plantas daninhas, observou-se apenas um controle supressivo não havendo efeito deletério dos metabólitos secundários para nenhuma das espécies utilizadas no estudo. Possivelmente a concentração utilizada dos metabólitos mesmos nas doses superiores a 4D não tenha sido suficientes ao ponto de ocasionar a morte de plantas. Por este motivo os dados não serão apresentados.

A redução no peso da MSPA observado para *C. sp.*, pressupõe que os metabólitos de *Diaporthe sp.* possuem ação supressiva sobre esta espécie (Figura 4).



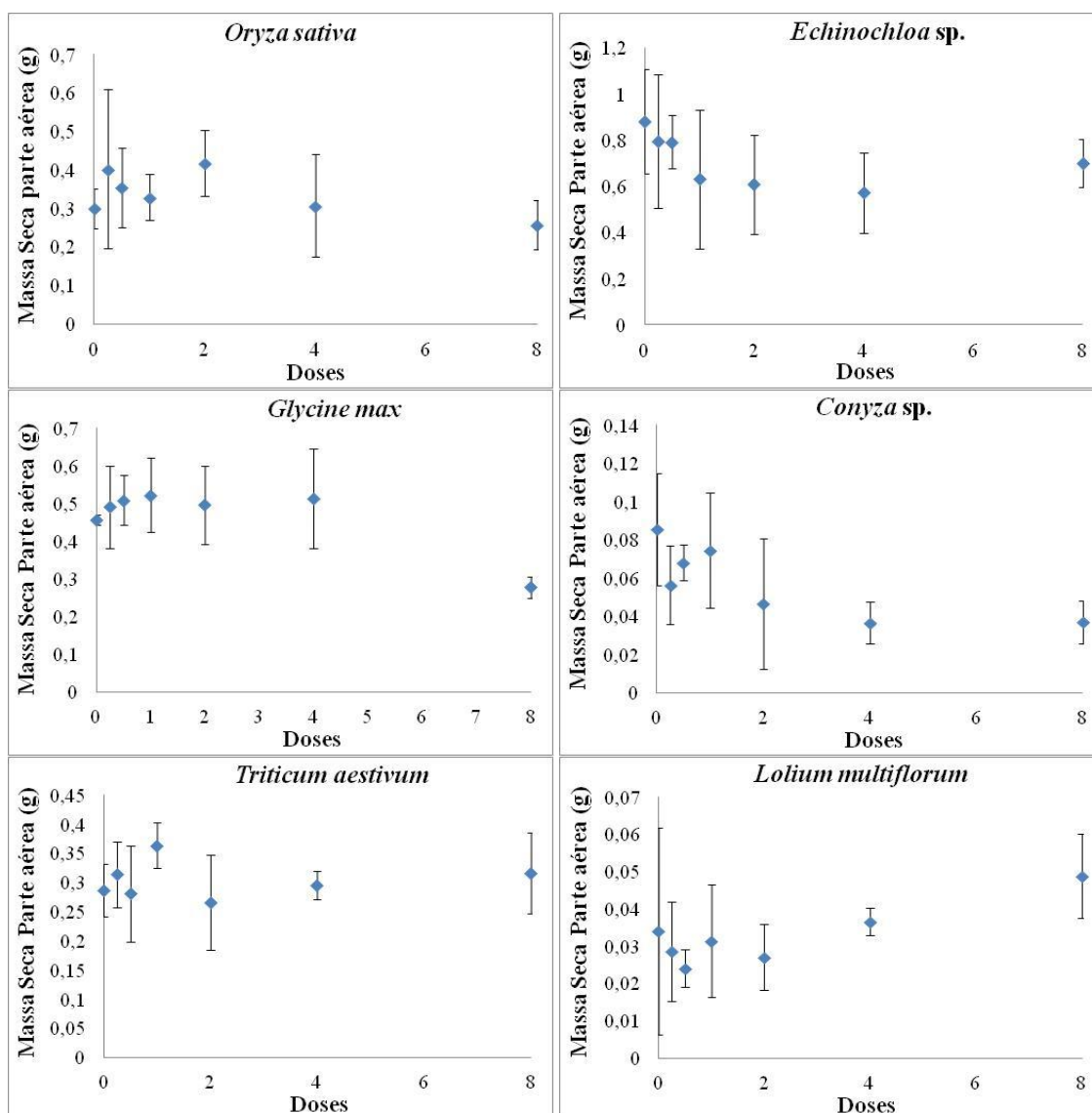


**Figura 4** - Plantas de *Conyza* sp. com controle supressivo em decorrência de diferentes doses dos metabólitos de *Diaporthe* sp.. Santa Maria, RS, 2015.

Esta característica possibilita benefícios para cultura, em virtude da planta daninha ter seu crescimento reduzido, diminuindo desta maneira a competitividade por recursos do meio. O efeito supressivo obtido pela aplicação dos metabólitos via parte aérea de plantas, parece ser uma característica frequentemente verificada para diversas espécies de fungos, bem como, para distintas espécies de plantas. Segundo Graupner et al. (2003) utilizando isolados do fungo *Phoma macrostoma* aplicados na parte aérea de plantas de *Cirsium arvense* L. verificaram clorose e necroses das folhas das mesmas, bem como redução em seu crescimento (efeito supressivo).

Javaid; Ali (2011) em estudo sobre a ação herbicida de metabólitos de quatro espécies distintas de *Trichoderma* spp., para *Avena fatua* L., obtiveram redução na biomassa da parte aérea em 56%. Os mesmos autores relacionam a redução da massa de plantas com a atividade de enzimas, tais como, endoglucanase, celobiohidrolase e  $\beta$ -glicosidase, que podem atuar na parede celular, ocasionando danos e resultando em

menor crescimento. Fato este, que pode explicar os resultados obtidos em relação à redução do peso da MSPA para a espécie *C. sp.*



**Figura 5** - Peso da massa seca de parte aérea (MSPA) de plantas, em função da aplicação de diferentes doses dos metabólitos de *Diaporthe* sp. Santa Maria, RS, 2015.

Varejão et al. (2013) relatam, que frequentemente as fitotoxinas estão presentes em baixas concentrações no filtrado oriundo dos processos fermentativos de microrganismos. Este fato possivelmente pode explicar o motivo pelo qual, a aplicação dos metabólitos de *Diaporthe* sp. apenas expressaram o efeito supressivo e não controlaram as plantas de *C. sp.*. A diluição dos metabólitos secundários em

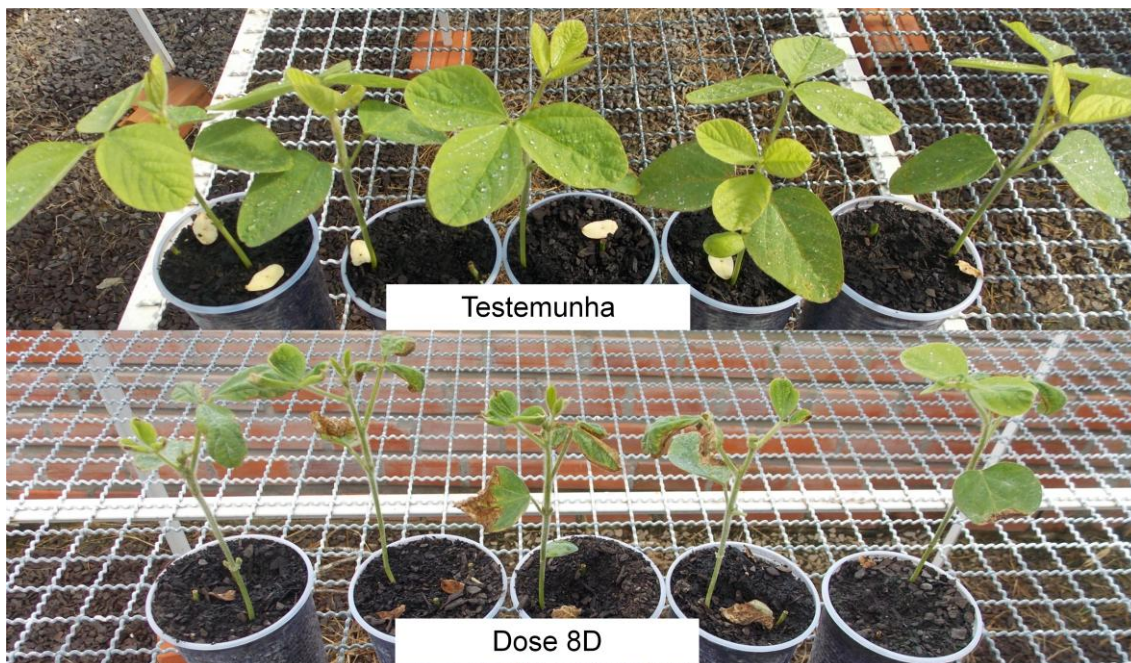
consequência do grande volume de água utilizada no processo fermentativo é indubitavelmente, um fator limitante para se avaliar o efeito herbicida desses compostos nos bioensaios. Isto fica evidente, quando compara-se os resultados do peso da MSPA obtidos para *C. sp.*, nos quais somente as doses mais altas 4D e 8D causaram um efeito supressivo no crescimento das plantas, indicando que foi necessário aumentar-se o volume dos metabólitos secundário para obter efeito sobre as plantas.

Outro fator de suma importância a ser considerado para o bom desempenho de qualquer tipo de agrotóxico, esta relacionado a sua formulação. De acordo com Hynes; Boyetchko (2006) a formulação de um biopesticida deve ser composta, por ingrediente ativo, materiais inertes e adjuvantes, que auxiliam na preservação do ingrediente ativo as intempéries do meio. Os adjuvantes também podem contribuir ainda, para melhorar a penetração do microrganismo no hospedeiro. Auld; Morin (1995) afirmam que a formulação de bioherbicidas pode ser fundamental para a melhoria e para o sucesso do microrganismo em campo. Este fato também pode explicar o motivo pelo qual os metabólitos secundários não ocasionaram controle de *C. sp.*, tendo em vista que os metabólitos foram aplicados na forma bruta, sem qualquer tipo de formulação.

As plantas de *G. max* quando pulverizadas com a dose de 8D da solução contendo metabólitos de *Diaporthe sp.* também foram severamente afetadas, diferindo significativamente das demais doses em relação a variável peso da MSPA (Figura 5). Na avaliação aos 7 DAA as plantas apresentaram fitointoxicação que chegou a ordem de 80% para a maior dose como pode-se visualizar na (Tabela 3). Já para a avaliação aos 15 DAA as plantas demonstraram uma capacidade de recuperação, havendo uma redução de fitointoxicação.

Os sintomas visualizados nas plantas de *G. max* foi o amarelecimento e o crestamento das folhas mais jovens, a medida que as folhas mais velhas apresentaram

necrose parcial em suas extremidades. Além disto, as plantas tiveram uma redução em seu crescimento e desenvolvimento, o que resultou num menor peso da MSPA como pode-se visualizar na (Figura 6).



**Figura 6** - Na parte superior da figura, plantas de *Glycine max* isentas da aplicação dos metabólitos de *Diaporthe* sp., na parte inferior plantas submetidas a maior dose da solução contendo os metabólitos.

Embora ainda não se possa afirmar qual o modo de ação deste herbicida presente na solução dos metabólitos, os sintomas observados são semelhantes aos apresentados pelos herbicidas inibidores de aminoácidos, tais como, o grupo dos inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS). Os sintomas característicos dos herbicidas ALS são: amarelecimento das folhas, nervuras avermelhadas ou arroxeadas, limbo foliar com manchas amareladas, enrugamento das folhas mais jovens, redução ou até mesmo paralisia no crescimento e desenvolvimento das plantas, necrose, morte das gemas apicais e por fim morte das plantas (ROMAN et al., 2007). De acordo com Oliveira et al. (2011) os herbicidas deste grupo são responsáveis pela inibição da enzima produtora de três aminoácidos: valina, isoleucina e leucina. Esses herbicidas depois de aplicados são absorvidos e translocados rapidamente para os pontos de crescimento das plantas.

Atualmente no mercado existem diversos herbicidas inibidores de ALS, dentre os quais, Diclosulam, Penoxulam, Metsulfuron-methyl, Iodosulfuron-methyl, Chlorimuron-ethyl, Imazethapyr, Imazapic. Esses são empregados para o manejo de várias plantas daninhas, tais como, *Echinochloa* sp., *Conyza* sp., *Lolium multiflorum*, *Oryza sativa*, *Cyperus iria*, *Aeschynomene denticulata*, *Ipomea grandifolia*. Alguns herbicidas desse grupo tem ação pós-emergente e pré-emergente, como é o caso do Diclosulam, utilizado atualmente no manejo de buva resistente a glifosato na cultura da soja.

**Tabela 3** - Notas de fitotoxicidade para espécies de plantas cultivadas. Santa Maria, RS, 2015.

Tratamento	Fitotoxicidade (%)	
	7 DAA	15 DAA
<i>Glycine max</i>		
0	0	0
¼ D	0	0
½ D	0	0
1 D	0	0
2 D	10	10
4 D	40	20
8 D	80	70
<i>Triticum aestivum</i>		
0	0	0
¼ D	0	0
½ D	0	0
1D	0	0
2 D	0	0
4 D	0	0
8 D	0	0
<i>Oryza sativa</i>		
0	0	0
¼ D	0	0
½ D	0	0
1D	0	0
2 D	0	0
4 D	0	0
8 D	0	0

O espectro de ação dos metabólitos de *Diaporthe* sp. presentes na solução aplicados de forma pós-emergente, apresentaram efeito apenas para plantas dicotiledôneas, entre as espécies testadas, pois ocasionaram fitointoxicação para *G. max*

(Tabela 3) bem como, um controle supressivo para *C. sp.* (Figura 4). Para Li et al. (2003) as toxinas produzidas por microrganismos possuem distintos espectros de ação, podendo ser específicas (efeito sobre uma única planta) ou agirem sobre diversas espécies, bem como para diferentes famílias. Abbas et al. (1995) estudando a ação herbicida do composto AAL – Toxin, produzido pelo fungo *Alternaria alternata* sobre oitenta e oito espécies distintas de plantas, observaram danos como necrose, clorose, nanismo, murcha e morte, apenas para as plantas do grupo das dicotiledôneas, não verificando nenhum tipo de efeito para as plantas do grupo das monocotiledôneas.

#### 4.3.3 Avaliação secundária (Experimento 2)

Na avaliação secundária para o experimento 2, foram estudados os parâmetros: peso da MSPA, fitotoxicidade e controle de plantas daninhas. Em relação às avaliações de fitotoxicidade aos 7 DAA e 15 DAA, apenas as plantas de *G. max* foram afetadas pela aplicação da solução contendo metabólitos secundários do microrganismo como pode-se visualizar (Tabela 4). Os tratamentos ocasionaram diferentes níveis de fitointoxicação das plantas, que variaram de 30 a 40% aos 7 DAA e de 20 a 40% para a avaliação aos 15 DAA (Tabela 4). A fitointoxicação observada para *G. max* refletiu-se diretamente na redução do peso da MSPA de plantas.

Para as espécies *T. aestivum* e *O. sativa* os tratamentos utilizados não causaram fitointoxicação. Este fato se relaciona com a característica de seletividade do herbicida Cialofop butílico para cultura *O. sativa* e do Iodosulfurom-metílico para a cultura do *T. aestivum*.

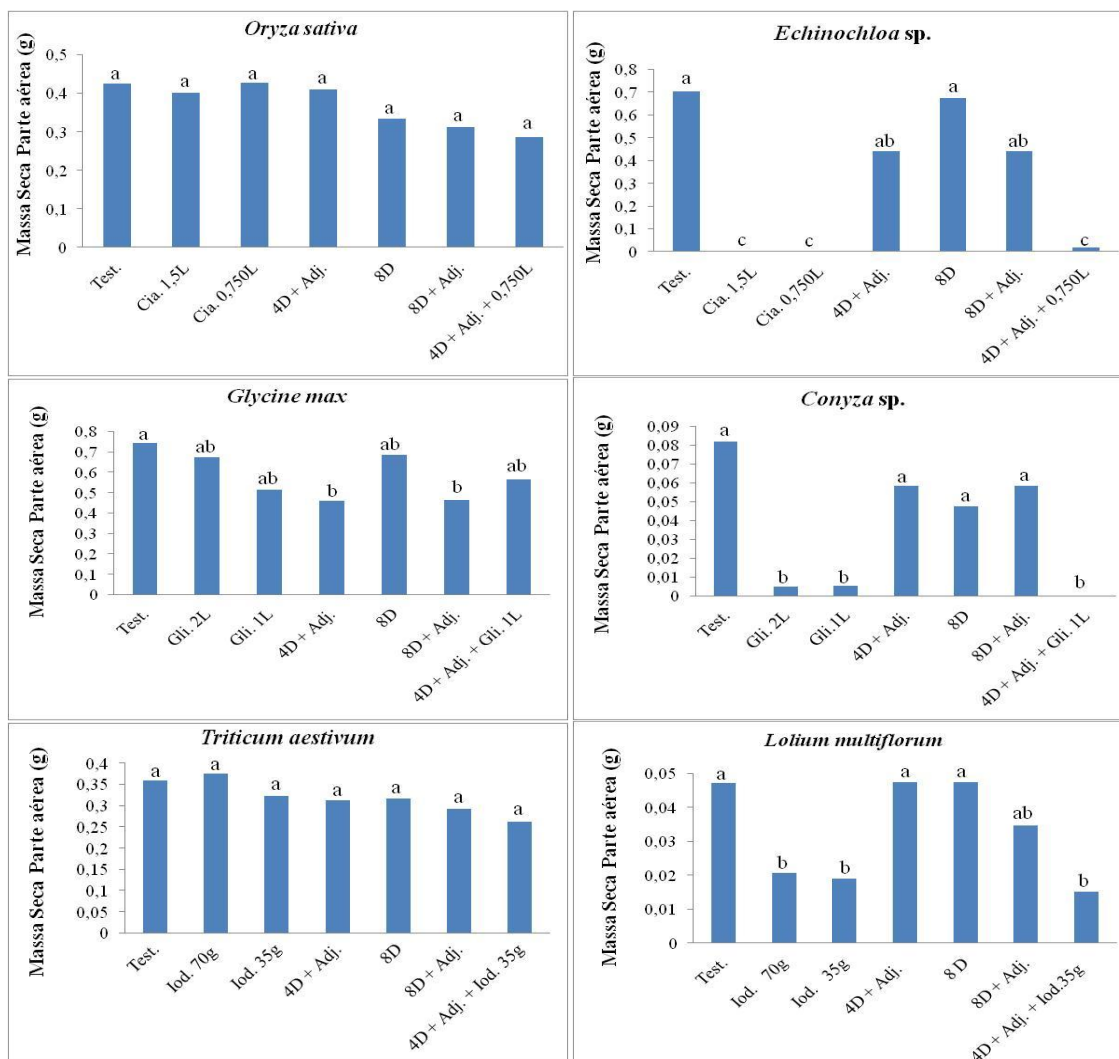
**Tabela 4** - Notas de fitotoxicidade para as distintas espécies de plantas cultivadas em consequência da aplicação de herbicidas sintéticos e metabólitos de *Diaporthe* sp.. Santa Maria, RS, 2015.

Tratamento		Fitotoxicidade (%)	
		7 DAA	15 DAA
<b><i>Glycine max</i></b>			
T1	0	0	0
T2	2 L	0	0
T3	1 L	0	0
T4	4D + 0,5% v/v	40	20
T5	8 D	40	40
T6	8 D + 0,5% v/v	30	30
T7	4 D + 0,5% v/v +1L	40	40
<b><i>Triticum aestivum</i></b>			
T1	0	0	0
T2	70 g + 0,5% v/v	0	0
T3	35 g + 0,5% v/v	0	0
T4	4 D + 0,5% v/v	0	0
T5	8 D	0	0
T6	8 D + 0,5% v/v	0	0
T7	4 D + 0,5% v/v + 35g + 0,5% v/v	0	0
<b><i>Oryza sativa</i></b>			
T1	0	0	0
T2	1,5 L + 0,5% v/v	0	0
T3	0,75 L + 0,5% v/v	0	0
T4	4 D + 0,5% v/v	0	0
T5	8 D	0	0
T6	8 D + 0,5% v/v	0	0
T7	4 D + 0,5% v/v + 0,75L + 0,5% v/v	0	0

Em relação a variável peso da MSPA, os resultados mostraram que houve diferença significativa, tanto para aplicação isolada dos metabólitos secundários, bem como para sua mistura com herbicidas sintéticos (Figura 7). A aplicação isolada dos herbicidas sintéticos, tratamentos T2 (Glifosato potássico 2L) e T3 (Glifosato potássico 1L) para a espécie *C. sp.*, T2 (Cialofope butílico 1,5L) e T3 (Cialofope butílico 0,750L) para *E. sp.* e T2 (Iodosulfurom-metílico 70g) e T3 (Iodosulfurom-metílico 35g) para *L. multiflorum* resultaram na redução do peso da MSPA diferindo significativamente do tratamento testemunha. Estes resultados já eram esperados, tendo em vista que esses

herbicidas possuem registro e são recomendados para o controle destas espécies (MAPA, 2015) Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Da mesma forma, as misturas entre Glifosato potássico + metabólitos secundários, Cialofope butílico + metabólitos secundários e Iodosulfurom-metílico + metabólitos secundários reduziu significativamente o peso da MSPA para as espécies *C. sp.*, *L. multiflorum*, *E. sp.* (Figura 7). Todavia não houve efeito sinérgico ou antagônico para a mistura de metabólitos secundários com os herbicidas Glifosato potássico, Cialofope butílico ou Iodosulfurom-metílico.





**Figura 7** - Peso da massa seca de parte aérea (MSPA) de plantas, em função da aplicação de solução contendo metabólitos de *Diaporthe* sp. isolados e em mistura com herbicidas sintéticos. Santa Maria, RS, 2015.

Os tratamentos T4 (metabólito secundário 4D + óleo mineral) e T6 (metabólito secundário 8D + óleo mineral) demonstraram efeito significativo para variável peso da MSPA quando comparados ao tratamento T1 (testemunha) para a espécie *G. max*. Já para as demais espécies, não houve diferença estatística, entretanto para às espécies *C. sp.* e *E. sp.* ocorreu uma redução de aproximadamente 30% a 40% para a variável peso da MSPA. A diferença significativa em relação a variável peso da MSPA obtida apenas para *G. max*, possivelmente se deve ao fato desta espécie apresentar uma maior

sensibilidade aos metabólitos secundários quando comparada as demais espécies utilizadas no estudo.

A adição de adjuvante resultou em melhores resultados para os metabólitos secundários em relação a variável peso da MSPA. Embora não tenha havido diferença estatística, exceto para a espécie *G. max* quando houve diferença, a solução contendo metabólitos secundários em mistura com adjuvante, resultaram em redução do peso da MSPA para as espécies de *G. max*, *E. sp.* e *L. multiflorum*, quando comparados à aplicação isolada da solução contendo metabólitos. De acordo com Bukovac et al. (1990) as propriedades químicas e físicas da estrutura cuticular das folhas, influenciam diretamente no processo tanto de absorção como na adsorção dos compostos ativos e nesse caso, a adição de um adjuvante junto à calda de pulverização pode tornar mais eficiente o desempenho do agrotóxico, pois melhora a molhabilidade, reduz a tensão superficial e aumenta a penetração de compostos (CURRAN et al., 1999). Neste caso, pode-se explicar a redução do peso da MSPA obtida para os tratamentos que foram compostos pela aplicação dos metabólitos secundários em mistura com adjuvante.

Na avaliação aos 15 DAA, houve controle de plantas na ordem de 100%, para as espécies de *L. multiflorum* e *E. sp.* para os tratamentos T2, T3 e T7 (Tabela 5). Estes resultados estão relacionados ao efeito da aplicação dos herbicidas Cialofope butílico ou Iodosulfurom-metílico que são recomendados e possuem registro para o controle destas duas espécies. Para a espécie *C. sp.* apesar de ter havido uma redução de aproximadamente 100% no peso da MSPA, não verificou-se morte de plantas para nenhum dos tratamentos utilizados. Embora os tratamentos T2 (Glifosato potássico 2L) e T3 (Glifosato potássico 1L) foram compostos pelo herbicida Glifosato potássico recomendado para o controle desta planta daninha, demonstrando desta forma, que possivelmente as plantas utilizadas no estudo sejam biótipos resistentes. O tratamento

T7 (Glifosato potássico 1L + metabólito secundário 4D) apesar de ter obtido peso de MSPA inferior ao tratamento T2 e T3 não propiciou controle das plantas.

**Tabela 5** - Notas de controle para espécies de plantas daninhas em consequência da aplicação de herbicidas sintéticos e solução contendo metabólitos de *Diaporthe* sp.. Santa Maria, RS, 2015.

<b>Tratamento</b>	<b>Controle (%)</b>	
	<b>15 DAA</b>	
<b><i>Conyza</i> sp.</b>		
T1	0	0
T2	2 L	0
T3	1 L	0
T4	4D + 0,5% v/v	0
T5	8 D	0
T6	8 D + 0,5% v/v	0
T7	4 D + 0,5% v/v + 1 L	0
<b><i>Echinochloa</i> sp.</b>		
T1	0	0
T2	1,5 L + 0,5% v/v	100
T3	0,75 L + 0,5% v/v	100
T4	4 D + 0,5% v/v	0
T5	8 D	0
T6	8 D + 0,5% v/v	0
T7	4 D + 0,5% v/v + 0,75L + 0,5% v/v	100
<b><i>Lolium multiflorum</i></b>		
T1	0	0
T2	70 g + 0,5% v/v	100
T3	35 g + 0,5% v/v	100
T4	4 D + 0,5% v/v	0
T5	8 D	0
T6	8 D + 0,5% v/v	0
T7	4 D + 0,5% v/v + 35g + 0,5% v/v	100

#### 4.4 CONCLUSÃO

Os metabólitos secundários de *Diaporthe* sp. apresentam ação herbicida pré-emergente para *G. max*, *C. sativus*, *T. aestivum*, *O. sativa*, *L. multiflorum* e *S. halepense*.

A aplicação da solução contendo metabólitos secundários de *Diaporthe* sp. na parte aérea das plantas não resultou em controle para as espécies *G. max*, *T. aestivum*, *O. sativa*, *L. multiflorum*, *C. sp.* e *E. sp.*. As maiores doses apresentaram redução do peso da MSPA de plantas, para as espécies *G. max* e *C. sp.*

A aplicação dos metabólitos secundários em mistura com herbicidas sintéticos não resultou em melhor controle de plantas, efeito sinérgico ou efeito antagônico, para nenhuma das espécies utilizadas.

A adição de um adjuvante aos metabólitos secundários contribuiu para redução no peso da MSPA para as espécies de *G. max*, *L. multiflorum* e *E. sp.* quando comparado a aplicação da solução contendo metabólitos de forma isolada.

#### 4.5 REFERÊNCIAS

ABBAS, H. K. et al. Susceptibility of Various Crop and Weed Species to AAL-Toxin, a Natural Herbicide. **Weed Technology**, v. 9, p. 125-130, 1995.

AULD, B. A.; MORIN, L. Constraints in the development of bioherbicides. **Weed Technology**, v.9, p. 638–652, 1995.

BARRETO, R. W; EVANS, H. C. Fungal pathogens of *Euphorbia heterophylla* and *E. hirta* in brazil, with particular reference to biological control agents. **Mycopathologia**, v. 141, p. 21- 36, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNPV/CLAV, 2009. 162p.

BUKOVAC, M. J. et al. Sorption of Organic Compounds by Plant Cuticle. **Weed Science**, v.38, p.289-298, 1990.

CASTRO, H. G. et al. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2001. 104p.

CHRISTOFFOLETI, P. J. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. In: SIMPÓSIO SOBRE HERBICIDAS E PLANTAS DANINHAS, 1., Dourados– MS, 1997. **Palestras...** Dourados: EMBRAPA, 1997. p.75-94.

CURRAN, W. S. et al. Adjuvants for enhancing herbicide performance. **Agronomy Facts 37**. Penn State College of Agricultural Sciences, 1999. p 1-5.

DAYAN, F.; DUKE, S. O. Natural Compounds as Next-Generation Herbicides. **Plant Physiology**, v. 166, p. 1090-1105, 2014.

DUKE, S. O. et al. Natural Products as Sources of herbicides: current status and future trends. **Weed Research**, v. 40, n. 1, p. 99–111, 2000.

DUKE, S. O. et al. Chemicals from nature for weed management. **Weed Science**, v. 50, p. 138–151, 2002.

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.

GOMES, R. R. **Filogenia e taxonomia do complexo *Diaporthe* e a sua aplicação no controle biológico da mancha preta dos citros**. 2012. 94 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

GRAUPNER, P. R. et al. The macrocidins: novel cyclic tetramic acids with herbicidal activity produced by *Phoma macrostoma*. **Journal of Natural Products**, v.66, p.1558–1561, 2003.

HAWKSWORTH, D. L. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. **Studies in Mycology**, v.50, p.9–18, 2004.

HRAC-BR. Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas Daninhas aos Herbicidas. **Assuntos Técnicos**. São Paulo, 2015. Disponível em: <http://www.hrac-br.com.br/wordpress/?p=527>. Acesso em: 01 de jun. 2015.

HYNES, R. K.; BOYETCHKO, S. M. Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations. **Soil Biology & Biochemistry**, v.38, p. 845–849, 2006.

JAVAID, A., ALI, S. Alternative management of a problematic weed of wheat *Avena fatua* L. by metabolites of *Trichoderma*. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v.71, p.205-211, 2011.

KHATTAK, S. U. et al. Phytotoxic and herbicidal activities of *Aspergillus* and *Penicillium* species isolated from rhizosphere and soil. **Weed Science Research**, v.20, n.3, p.293-303, 2014.

LI, Y. et al. Research progress on microbial herbicides. **Crop Protection**, v.22, p. 247–252, 2003.

MACÍAS, F. A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J. M. G. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Jornal Agriculture Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2512-2521, 2000.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 15 de mar. de 2015.

NUNES, L. A.; TREZZI, M. M.; DEBASTIANI, C. Manejo integrado de plantas daninhas na cultura do milho. **Bragantina**, v. 69, n.2, p. 299-304, 2010.

OLIVEIRA JR. et al. *Biologia e Manejo de Plantas Daninhas*. Curitiba: ed. Omnipax, 2011. 348.

PHATTANAWASIN, P. et al. Screening of Fungal Extracts for Weed Germination and Growth Inhibitory Activity. **Silpakorn University International Journal**, v.6, n. 1/2, p. 136-144, 2006.

ROMAN, E. S. et al. **Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação**. Passo Fundo: Gráfica Editora Berthier, 2007. 160p.

SILVA, A. A.; SILVA, J. F. (Eds. 3). **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2012. p. 7.

SOUZA, A. R. C. **Obtenção de isolados a partir de recursos biológicos do bioma pampa com potencial no controle de plantas**. 2015. P.75. Tese. (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.

VAREJÃO, E. V. V. et al. Phytotoxic Effects Of Metabolites From *Alternaria euphorbiicola* Against Its Host Plant *Euphorbia heterophylla*. **Química Nova**, v.36. n.7, p. 1004-1007, 2013.

**ANEXO**



**Anexo 1** – Escala para avaliação de fitotoxicidade adaptada de FRANS; CROWLEY (1986).

Percentual	Descrição das categorias principais	Descrição detalhada de fitotoxicidade na cultura
0	Sem efeito	Sem injúria ou redução
10	Efeito Leve	Leve descoloração ou atrofia
20		Alguma descoloração ou atrofia, ou perda por atrofia
30		Injúria mais pronunciada, mas não duradoura
40	Efeito moderado	Injúria moderada, mas normalmente com recuperação
50		Injúria mais duradoura, recuperação duvidosa
60		Injúria duradoura, sem recuperação
70	Efeito severo	Injúria pesada, redução de estande
80		Cultura próximo da destruição - poucas plantas sobreviventes
90		Raramente restam algumas plantas
100	Efeito total	Destruição completa da cultura

**Anexo 2** – Escala para avaliação de controle adaptada de FRANS; CROWLEY (1986).

Percentual	Descrição das categorias principais	Descrição detalhada de controle
0	Sem efeito	Sem controle
10	Efeito Leve	Controle muito pobre
20		Controle pobre
30		Controle pobre e deficiente
40	Efeito moderado	Controle deficiente
50		Controle deficiente a moderado
60		Controle moderado
70	Efeito severo	Controle satisfatório
80		Controle de satisfatório a bom
90		Controle muito bom a excelente
100	Efeito total	Destruição completa