

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

**OBTENÇÃO DE ISOLADOS A PARTIR DE  
RECURSOS BIOLÓGICOS DO BIOMA PAMPA COM  
POTENCIAL NO CONTROLE DE PLANTAS  
DANINHAS**

**TESE DE DOUTORADO**

**ANGÉLICA ROSSANA CASTRO DE SOUZA**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2015**

**OBTENÇÃO DE ISOLADOS A PARTIR DE RECURSOS  
BIOLÓGICOS DO BIOMA PAMPA COM POTENCIAL NO  
CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS**

**ANGÉLICA ROSSANA CASTRO DE SOUZA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Área de Concentração Engenharia Agro-ambiental, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau  
**Doutor em Engenharia Agrícola**

**Dr. MARCIO ANTONIO MAZUTTI**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2015**

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova o  
**Tese de Doutorado**

**OBTENÇÃO DE ISOLADOS A PARTIR DE RECURSOS BIOLÓGICOS  
DO BIOMA PAMPA COM POTENCIAL NO CONTROLE DE PLANTAS  
DANINHAS**

elaborada por:  
**Angélica Rossana Castro de Souza**

Como requisito parcial para a obtenção do grau de  
Doutora em Engenharia Agrícola

**Comissão Examinadora:**

**Marcio Antonio Mazutti, Dr. (Presidente/Orientador)**

**Jerson Vanderlei Carús Guedes, Dr. (UFSM)**

**Rodrigo Josemar Seminoti Jacques, Dr. (UFSM)**

**Altemir José Mossi, Dr. (UFSM/UFFS)**

**Helen Treichel, Dr<sup>a</sup> (UFFS)**

**Santa Maria, RS, 20 de março de 2015**

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

Rossana Castro de Souza, Angélica

Obtenção de isolados a partir de recursos biológicos do bioma Pampa com potencial no controle de plantas daninhas / Angélica Rossana Castro de Souza.-2015.  
74 p.; 30cm

Orientador: Marcio Antonio Mazutti

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, RS, 2015

1. micro-organismo 2. metabólitos secundários 3. biotecnologia 4. bioprocessos I. Antonio Mazutti, Marcio II. Título.

## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola  
Universidade Federal de Santa Maria

### **OBTENÇÃO DE ISOLADOS A PARTIR DE RECURSOS BIOLÓGICOS DO BIOMA PAMPA COM POTENCIAL NO CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS**

AUTORA: ANGÉLICA ROSSANA CASTRO DE SOUZA

ORIENTADOR: Dr. MARCIO ANTONIO MAZUTTI

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 20 de março de 2015.

A produção de um bioherbicida para o controle biológico de plantas daninhas requer o desenvolvimento de uma série de etapas que vão desde a seleção de uma cepa microbiana apropriada para a produção do produto com ação herbicida até a sua formulação final. Nesse sentido, esse trabalho teve como objetivo selecionar micro-organismos a partir dos recursos biológicos do bioma Pampa com potencial na produção de fitotoxinas. Foram realizadas coletas sistemáticas de plantas com sintomas infecciosos em áreas de cultivo de arroz irrigado e pastagens naturais do bioma Pampa. A primeira etapa da pesquisa foi selecionar isolados fitopatogênicos com potencial de inibição de plântulas de plantas-teste (*Cucumis sativus* L. var wisconsin.). O fungo que apresentou o melhor efeito inibitório foi o VP51, identificado através do uso de técnicas de biologia molecular, classificado como *Diaporthe* sp. Para estudos de otimização do meio de fermentação submersa, foram utilizados resíduos industriais de água de maceração de milho (AMM) e de sorgo (MAS), comparando com o meio sintético. O meio de fermentação submersa em meio industrial (AMM) apresentou melhor crescimento de biomassa fúngica e efeito na germinação de plantas-teste. Na fermentação submersa em biorreator do tipo STR, o efeito da agitação foi significativo, sendo que os melhores resultados foram obtidos nos ensaios com menor agitação. Na germinação das plantas testes foram registradas sementes dormentes e duras, sendo um resultado satisfatório como potencial biocontrole da germinação.

Palavras-Chave: micro-organismos; metabólitos secundários; biotecnologia; bioprocessos.

## **ABSTRACT**

Doctoral Thesis  
Agricultural Engineering Post Graduation Program  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### **OBTAINMENT OF ISOLATES BY MEANS OF BIOLOGICAL RESOURCES FROM THE PAMPAS BIOME WITH POTENTIAL FOR WEED CONTROL**

AUTHOR: ANGÉLICA ROSSANA CASRTO DE SOUZA  
ADVISOR: Dr. MARCIO ANTONIO MAZUTTI  
Santa Maria, 27<sup>th</sup> March, 2015.

The production of a bioherbicida for the biological control of weeds requires the development of a series of steps ranging from the selection of a suitable microbial strain for the production of product having herbicidal action until final formulation. Thus, this study aimed to select microorganisms from biological resources of the Pampa biome with potential for producing phytotoxins. Systematic samplings were performed with infectious symptoms in rice-growing areas and natural pastures of the Pampa biome. The first stage of the research was to select isolates with pathogenic potential inhibition test plants seedlings (*Cucumis sativus* L. var wisconsin.). The fungus that showed the best inhibitory effect was the VP51, identified through the use of molecular biology techniques, classified as *Diaporthe* sp. For optimization studies by means of submerged fermentation, industrial waste corn steep liquor were used (AMM) and sorghum (MAS), compared to synthetic medium. The means of submerged fermentation industry (AMM) showed better growth of fungal biomass and effect on test plant germination. In submerged fermentation bioreactor STR type, the rotation effect is significant, and the best results were obtained in tests with less rotation. In the pre-germination tests plants dormant and hard seeds were recorded, with a satisfactory result as biocontrol potential germination.

Keywords: microorganisms, secondary metabolites, biotechnology, bioprocesses

## LISTA DE TABELA

TABELA 1 – Coordenadas geográficas dos pontos de coleta, plantas daninhas infectadas e número de isolados fúngicos por planta, testados para análise de efeito fitoinibitório dos metabólitos secundários de micro-organismos em <i>C. sativus</i> . .....	24
TABELA 2 - Método de avaliação fitotóxica das plantas por Frans; Crowley (1986) .	27
TABELA 3 - Efeito fitoinibitório dos metabólitos secundários de micro-organismos sobre <i>C. sativus</i> nos testes de seleção primária. ....	30
TABELA 4 - Efeitos dos tratamentos na parte aérea e sistema radicular sobre a <i>C. sativus</i> . ....	32
TABELA 5 - Matriz de correlação entres as cinco principais espécies com melhores alinhamentos sequenciais. ....	33
.TABELA 6 - Matriz experimental de Plackett-Burman para avaliar a influência do meio sintético em concentração de biomassa fúngica após sete dias de fermentação de <i>Diaporthe</i> sp. ....	44
TABELA 7 - Matriz experimental fracionado utilizado na avaliação de biomassa fúngica de <i>Diaporthe</i> sp. em meio industrial de AMM. ....	47
TABELA 8 - Matriz experimental fracionado utilizado na avaliação de biomassa fúngica de <i>Diaporthe</i> sp. em meio industrial de AMS. ....	49
TABELA 9 - Variação de concentração de AMS para avaliação do crescimento de biomassa de <i>Diaporthe</i> sp. em meio industrial. ....	50
TABELA 10 - Substratos definidos como meios de fermentação otimizados para o fungo <i>Diaporthe</i> sp. ....	51
TABELA 11 - Matriz experimental para avaliar a influência do meio industrial em concentração de biomassa fúngica de <i>Diaporthe</i> sp. após sete dias de fermentação. ....	62

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Publicações relacionadas a herbicidas de origem microbiológica, no período de 1986 a 2013, registradas no banco de dados SCOPUS. ....	18
FIGURA 2 - Efeitos visuais de fitotoxicidade dos fungos VP76 (a), DF24 (b) e VP51 (c) e Testemunha (d) sobre <i>C. sativus</i> . ....	29
FIGURA 3 - Estimativa dos efeitos da variação de pH e as concentrações de peptona, extrato de levedura e glicose na concentração de biomassa fúngica de <i>Diaporthe</i> sp. em meio sintético. ....	44
Figura 4 - Concentração de biomassa fúngica de <i>Diaporthe</i> sp. em relação à variação de peptona. ....	45
FIGURA 5 - Estimativa dos efeitos das variáveis sacarose e AMM na produção de biomassa fúngica do <i>Diaporthe</i> sp. em meio industrial. ....	47
FIGURA 6 - Estimativa dos efeitos das variáveis sacarose e AMS na produção de biomassa fúngica do <i>Diaporthe</i> sp. em meio industrial. ....	49
FIGURA 7 – Crescimento de biomassa fúngica de <i>Diaporthe</i> sp. em meio sintético, industrial de AMM e industrial de AMS, em condições otimizadas. ....	52
FIGURA 8 - Efeito fitotóxico do <i>Diaporthe</i> sp. em meio de fermentação sintético na germinação de <i>Cucumis sativus</i> var. wisconsin (a) e <i>Sorghum</i> sp (b). ....	53
FIGURA 9 - Efeito fitotóxico do <i>Diaporthe</i> sp. em meio de fermentação industrial de AMM na germinação de <i>Cucumis sativus</i> var. wisconsin (a) e <i>Sorghum</i> sp. (b). ....	54
FIGURA 10 - Efeito fitotóxico do <i>Diaporthe</i> sp. em meio de fermentação industrial de AMS na germinação de <i>Cucumis sativus</i> var. wisconsin (a) e <i>Sorghum</i> sp. (b). ....	55
FIGURA 11 - Estimativa dos efeitos da variação de aeração e agitação na produção de biomassa fúngica de <i>Diaporthe</i> sp. ....	63
Figura 12 - Gráficos de contorno da concentração de biomassa fúngica de <i>Diaporthe</i> sp. em função da agitação (rpm) e aeração (vvm) ....	64
Figura 13 - Efeito fitotóxico do <i>Diaporthe</i> sp. em meio de fermentação industrial na germinação de <i>Cucumis sativus</i> var. wisconsin (a) e <i>Sorghum</i> sp.(b) ....	65
Figura 14 - Efeito do bioproduto produzido por <i>Diaporthe</i> sp. na germinação de <i>Cucumis sativus</i> (a) e <i>Sorghum</i> sp. (b). ....	66

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	12
2 OBJETIVOS .....	14
2.1 Objetivo geral .....	14
2.2 Objetivos específicos .....	14
3 REVISÃO DE LITERATURA .....	15
3.1 Plantas daninhas na orizicultura.....	15
3.2 Plantas daninhas em pastagens naturais.....	16
3.3 Métodos usados para o controle de plantas daninhas .....	16
3.4 Herbicidas produzidos por micro-organismos .....	17
3.5 Bioprospecção de micro-organismos na biodiversidade do bioma visando à sustentabilidade .....	19
4 RESULTADOS .....	22
4.1 ARTIGO I: ISOLAMENTO, SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS DO BIOMA PAMPA PRODUTORES DE SUBSTÂNCIAS BIOHERBICIDAS .....	22
4.1.1 INTRODUÇÃO .....	22
4.1.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	23
4.1.2.1 Prospeção dos micro-organismos .....	23
4.1.2.2 Isolamento de micro-organismos fitopatogênicos .....	25
4.1.2.3 Processo fermentativo .....	25
4.1.2.4 Screening .....	26
4.1.2.5 Delineamento experimental: <i>screening</i> .....	26
4.1.2.6 Identificação do micro-organismo fitotóxico.....	27
4.1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1.3.1 Triagem de fungos fitopatogênicos .....	28
4.1.3.2 Efeito do meio de cultura no crescimento e desenvolvimento das plântulas de pepino .....	29

4.1.3.3 Identificação Molecular do micro-organismo com potencial fitotóxico .....	33
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	35
REFERÊNCIAS .....	35
4.2 ARTIGO II: OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE UMA SUBSTÂNCIA BIOHERBICIDA PELO FUNGO <i>Diaporthe</i> sp. ....	40
4.2.1 INTRODUÇÃO .....	40
4.2.2 - MATERIAL E MÉTODOS .....	41
4.2.2.1 – Micro-organismo, inóculo, fermentações e biomassa.....	41
4.2.2.2 Otimização do meio sintético.....	42
4.2.2.3 - Otimização do meio industrial .....	42
4.2.2.4 – Crescimento de biomassa de <i>Diaporthe</i> sp.....	42
4.2.2.5 - Efeito biológico na germinação .....	43
4.2.3 RESULTADOS .....	43
4.2.3.1 Otimização em meio sintético.....	43
4.2.3.2 Otimização meio industrial .....	46
4.2.3.3 Meio industrial com Água de Maceração de Milho (AMM) e sacarose.....	46
4.2.3.4 Meio industrial com caldo de sorgo e sacarose.....	48
4.2.3.5 Análise do crescimento de biomassa fúngica.....	51
4.2.3.6 Teste biológico na germinação de sementes .....	53
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56
4.3 ARTIGO III: PRODUÇÃO DE BIOHERBICIDA POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM BIORREATOR OPERANDO COM O FUNGO <i>Diaporthe</i> sp.....	58
4.3.1 INTRODUÇÃO .....	58
4.3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	60
4.3.2.1 Micro-organismo e preparo do inóculo .....	60
4.3.2.2 Condições de Cultivo.....	61
4.3.2.3. Delineamento Experimental .....	61

4.3.2.4. Efeito biológico na germinação .....	61
4.3.3 RESULTADOS .....	62
4.3.3.1 Otimização do bioprocesso .....	62
4.3.3.2 Teste biológico na germinação de sementes .....	65
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	67
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	72

## INTRODUÇÃO

A China e a Índia são os maiores produtores de arroz, juntos correspondem mais da metade da produção anual mundial (USDA, 2013). O Brasil também apresenta uma produção significativa, sendo que o Estado do Rio Grande do Sul produziu cerca de 62% da safra no ano de 2012 (CONAB, 2012). Além da orizicultura, o Estado se destaca pela produção de outras culturas (soja, milho, trigo, aveia, entre outras) (CONAB, 2014) e, pelas vastas áreas de pastagem natural, ambientes excelentes para a produção animal resultando em vários benefícios econômicos ao longo de sua cadeia produtiva.

No entanto, o processo de degradação das áreas de pastagens e o manejo inadequado na produção agrícola são fatores que interferem na potencialidade e competitividade na pecuária e orizicultura. As plantas daninhas podem reduzir significativamente a produtividade nesses setores. As plantas infestantes também podem causar outros problemas, por meio de fatores como interferência, alelopatia, parasitismo, sendo hospedeiros de pragas e doenças, intoxicando animais e reduzindo a qualidade do produto pecuário e de forragens armazenadas (EMBRAPA, 2005).

O controle de plantas daninhas pode ser efetuado por métodos mecânico (PELLEGRINI et al., 2007), cultural (SILVA et al., 2011), químico (SANTOS et al. 2006). e biológico (HANADA et al., 2009). Segundo Hanada et al. (2009) o controle químico é amplamente utilizado, e tem promovido diversos problemas de ordem ambiental, sendo que uma alternativa para a diminuição desse método é o controle biológico.

De acordo com Duke et al. (2000) uma alternativa de controle biológico é a utilização de micro-organismos pela produção de fitotoxinas naturais usadas como modelos para o desenvolvimento de novos herbicidas, principalmente na forma de metabólitos secundários ou enzimas.

Para Mitchell (2003) a produção desse composto pode ser realizada através do emprego de fermentação submersa ou fermentação em estado sólido. A sua viabilidade técnica e econômica dependerá da quantidade de produto excretada pelo micro-organismo, bem como pela possibilidade de aumento de escala do processo

fermentativo, o que implica na formulação do meio e no projeto de biorreatores. De acordo com a literatura, ocorre uma maior produção de metabólitos por fermentação em estado sólido, por outro lado, a fermentação submersa apresenta maior facilidade de escalonamento, enquanto a produção normalmente é menor, uma vez que o metabólito produzido encontra-se diluído em um grande volume reacional. Nesse sentido, a escolha da melhor forma de condução do processo é fundamental para a viabilidade da produção do bioherbicida.

Tendo em vista que a pecuária de corte e a produção de arroz são importantes atividades econômicas do bioma Pampa, tem-se uma maior necessidade no desenvolvimento de um bioherbicida que tenha ação em plantas daninhas de folhas largas, podendo ser utilizado no manejo de plantas invasoras de pastagens e do arroz.

A utilização de bioherbicidas no manejo de plantas daninhas é atrativa devido ao menor espectro de ação destes produtos, que se deve à atividade de alguma enzima lítica, que é altamente específica no seu ataque, ou a produtos do metabolismo do micro-organismo que causam pouco impacto no ambiente. Nesse sentido, a obtenção de bioherbicidas a partir de micro-organismos do bioma Pampa representará um exemplo de utilização sustentável dos seus recursos biológicos, aliado ao desenvolvimento regional, dentro do princípio de produção eficiente com consciência ambiental.

O presente trabalho foi estruturado em artigos, no qual é realizada uma introdução geral ao tema e posteriormente os seus resultados são apresentados nos seguintes artigos: Isolamento, seleção e identificação de fungos do bioma pampa produtores de substâncias bioherbicidas; Otimização da produção de uma substância bioherbicida pelo fungo *Diaporthe* sp. e Produção de bioherbicida por fermentação submersa em biorreator operando com o fungo *Diaporthe* sp.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Este estudo tem o objetivo principal de selecionar e identificar microrganismos com potencial de produção de fitotoxinas utilizando recursos biológicos do bioma Pampa.

### 2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do trabalho foram:

Selecionar e identificar microrganismos com potencial de produção de fitotoxinas utilizando recursos biológicos do bioma Pampa, avaliando seus efeitos na morfologia e fitotoxicidade na emergência de plantas teste;

Otimizar os meios sintético e industrial, utilizando fermentação submersa, para o crescimento de *Diaporthe* sp. E, avaliar os efeitos fitotóxicos na germinação de plantas-teste;

Otimizar o processo de fermentação submersa em biorreator do tipo STR, utilizando resíduo agroindustrial como substrato para a produção de metabólitos do fungo *Diaporthe* sp., e avaliar sua ação fitotóxica na germinação de plantas-teste.

## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 Plantas daninhas na orizicultura

Em termos globais, o arroz desempenha importante papel tanto econômico quanto social. O cereal é cultivado em todos os continentes, em cerca de 150 milhões de hectares. Seu balanceamento nutricional fornece 20% da energia e 15% da proteína *per capita* necessárias ao homem, e, somado a sua versatilidade para se adaptar a diferentes condições de solo e clima, é considerada a espécie com maior potencial para o combate à fome no mundo (EMBRAPA, 2005).

A China é o maior produtor mundial de arroz, respondendo, em média, por aproximadamente 30% da produção mundial, seguida pela Índia, com mais de 20%. Portanto, esses dois países, conjuntamente, correspondem mais da metade da produção anual mundial de arroz, e, conseqüentemente, os eventos que os afetarem terão repercussão no mercado mundial do produto (USDA, 2013). O Brasil é um dos principais produtores mundiais de arroz irrigado sendo que o Estado do Rio Grande do Sul foi responsável por mais de 62% desta produção na safra de 2012 (CONAB, 2012).

No entanto, as plantas daninhas podem reduzir significativamente essa produtividade e a qualidade dos grãos, encarecendo o processamento industrial ou depreciando o produto beneficiado. As plantas infestantes também podem causar outros problemas a esse ecossistema, por meio de fatores como interferência, alelopatia, parasitismo, sendo hospedeiros de pragas e doenças, intoxicando animais e reduzindo a qualidade do produto pecuário e de forragens armazenadas (EMBRAPA, 2005).

Segundo a Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado – SOSBAI (2012), as principais plantas daninhas que infestam as lavouras orizícolas, pelos elevados níveis de invasão e/ou dificuldade de controle, pertencem a Família Poaceae, destacando-se *Oryza sativa* L. (arroz- vermelho), *Echinochloa* spp. (capim-arroz) e *Brachiaria plantaginea* (papuã) e da classe das dicotiledôneas destaca-se *Ipomoea grandifolia* (corriola). Segundo Menezes e Mariot (2007) a ocorrência de

*Aeschynomene* spp. (angiquinho) também preocupa os agricultores, pois se estima que em torno de 30% da área semeada com arroz no Rio Grande do Sul encontra-se infestada com essas espécies daninhas.

### **3.2 Plantas daninhas em pastagens naturais**

Suttie et al. (2005) ressalta que as pastagens naturais constituem um dos maiores biomas do mundo e podem ser definidas como a cobertura vegetal onde ocorre o predomínio de gramíneas, com pouca ou sem a cobertura de árvores. Corroborando com o autor, Garagorry (2008), destaca que estes ambientes são excelentes para a produção animal resultando em vários benefícios econômicos ao longo de sua cadeia produtiva.

Entretanto, segundo Macedo et al. (2000), o processo de degradação das áreas de pastagens, o manejo inadequado, e a baixa produtividade das espécies forrageiras no período seco do ano, são fatores limitantes à potencialidade da pecuária nacional.

Segundo Pereira e Silva (2002), a infestação por plantas daninhas é um dos fatores responsáveis pela baixa produtividade das pastagens brasileiras, causando problemas em ecossistemas naturais e, em ecossistemas transformados pelo homem. Ainda para Pereira e Silva (2002), além das plantas invasoras terem potencial competitivo em ambiente de pastagem, elas podem causar outros danos a esse ecossistema, como em atividades de interferência, alelopatia, parasitismo, intoxicação de animais, redução da qualidade do produto pecuário e de forragens armazenadas.

Para Pellegrini et al. (2007), no momento em que a proporção de espécies indesejáveis se torna um obstáculo para a produção animal, alguma medida de controle deve ser aplicada para melhorar a qualidade dessa pastagem

### **3.3 Métodos usados para o controle de plantas daninhas**

De acordo com Pellegrini, et al. (2007) os métodos de controle de plantas indesejáveis mais utilizados são os mecânicos, os de planejamento (culturais), os químicos e os biológicos. O método mecânico é caracterizado pelo corte, a capina com enxada, a capina manual e a roçada (Silva et al. 2011). Essa técnica manual segundo Deuber (2003), tem baixo rendimento, os custos são relativamente elevados e pode provocar danos ao sistema radicular da cultura.

Silva et al. (2011) define o controle cultural como manejo correto da lavoura e do ambiente ao seu redor para obter eficiente redução das plantas infestantes. Dentre as inúmeras práticas adotadas, pode-se citar a rotação de culturas, a seleção de cultivares de alta produtividade, o uso do espaçamento e da data de plantio adequados para cada região, e todos os demais itens relacionados com as boas práticas agrícolas.

O método químico consiste no uso de produtos químicos (herbicidas) para o controle das plantas daninhas. Este método de controle, embora seja amplamente adotado, nem sempre pode impedir o progresso das plantas daninhas (SANTOS et al. 2005; 2006).

Hanada et al. (2009) descreve que o controle biológico surge como uma alternativa ao uso de produtos químicos, podendo ainda, ser aplicado isoladamente ou como parte do sistema de manejo integrado de plantas daninhas.

### **3.4 Herbicidas produzidos por micro-organismos**

Segundo Petta (2008) a produção de herbicida por micro-organismos apresenta algumas vantagens sobre o herbicida sintético, como por exemplo, são biodegradáveis, além de que podem ser ativos em pequenas quantidades. Mesmo com as vantagens, as pesquisas e comercialização dos bioherbicidas ainda são em número reduzido.

Em pesquisa realizada na base de produção científica indexada no banco de dados "SCOPUS" (<http://www.scopus.com>) por meio de aplicativo *online* para busca de documentos, foram observados um total de 141 publicações relacionadas a

herbicidas de origem microbiológica, no período de 1986 a 2013. É possível verificar a distribuição temporal dos artigos na Figura 1.

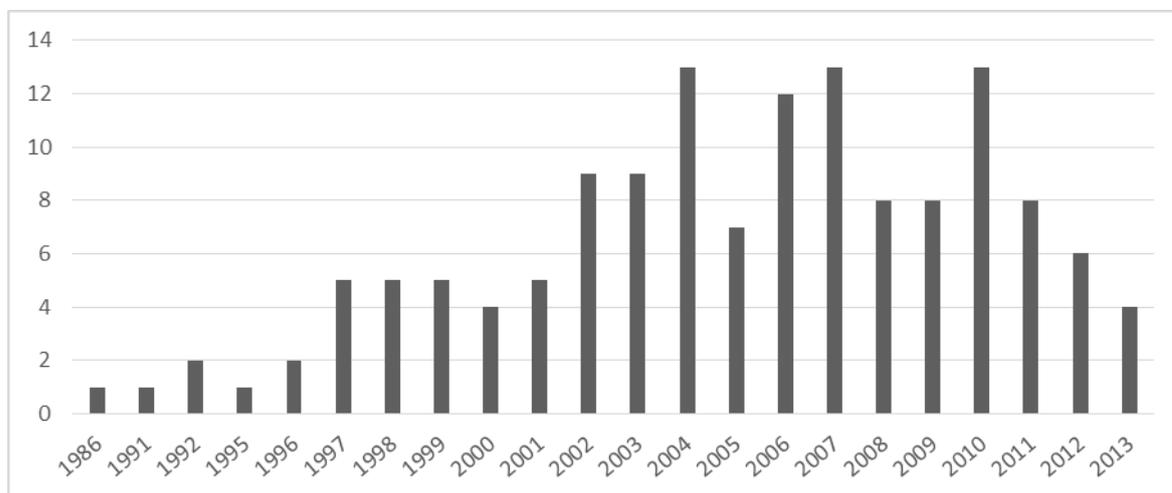


FIGURA 1 - Publicações relacionadas a herbicidas de origem microbiológica, no período de 1986 a 2013, registradas no banco de dados SCOPUS.

Na Figura 1 pode-se observar que a primeira publicação sobre controle com agentes biológicos ocorreu em 1986. Esse trabalho aborda sobre *Evaluation of Alternaria crassa for biological control of Jimsonweed: Host range and virulence*. Foram avaliados a produção de inóculo, a taxa de crescimento fúngico, a germinação de conídios e forma de infecção de *A. crassa* em diferentes temperaturas, e a gama de hospedeiros e virulência. Os resultados demonstraram o potencial de controle biológico de *A. crassa* (BOYETTE, 1986).

A partir do ano de 2004 aumentou a produção científica sobre o tema. Esse aumento do número de publicações pode estar relacionado à maior demanda por bioprodutos e a abordagem sustentável nesse período.

As pesquisas avançam principalmente na busca de soluções sustentáveis e ecológicas. Para Saxena e Pandey (2001) a maioria das fitotoxinas naturais possui estruturas não-halogenadas, o que as torna menos tóxicas ao ambiente. Segundo Vyvyan (2002), com esse fato pode-se afirmar que a contaminação de alimentos, do solo e da água é menos provável de ocorrer com os herbicidas naturais.

Duke et al. (2000) ressalta que os metabólitos podem ser produzidas por fitopatógenos ou por micro-organismos capazes de provocar doenças, causar

lesões, inibir o crescimento de plantas e levar a morte do hospedeiro. De acordo com Greaves (1996) em vista desses fatores, as fitotoxinas de origem microbianas são usadas como modelos para o desenvolvimento de novos herbicidas.

De acordo com Drew (1977) e, Sanches e Demain (2002), a versatilidade da biossíntese microbiana é enorme. As fitotoxinas podem estar, principalmente, na forma de metabólitos secundários ou enzimas. Os metabólitos secundários produzidos por micro-organismos podem ser obtidos em grandes quantidades por processos fermentativos, uma vez que há possibilidade do controle sobre as condições dos meios de cultivo para produção desses metabólitos.

Segundo Slater et al. (2008) as enzimas que hidrolisam a matéria orgânica em decomposição também podem ser utilizadas pelos patógenos para invadir os tecidos das plantas por meio da degradação de macromoléculas da parede celular. Nas primeiras etapas de uma infecção, ocorrem normalmente danos na parede celular. Os fungos fitopatogênicos excretam enzimas proteolíticas que causam a liberação de fragmentos da parede celular vegetal, como os oligômeros pécticos. Estes fragmentos atuam como sinais, ligando-se a receptores específicos, desencadeando uma cascata de eventos que levam à indução de genes específicos de defesa.

### **3.5 Bioprospecção de micro-organismos na biodiversidade do bioma visando à sustentabilidade**

O desenvolvimento sustentável de uma nação está diretamente ligado a sua capacidade de satisfazer as necessidades da geração atual, sem comprometer a capacidade das gerações futuras de satisfazerem as suas próprias necessidades, o que implica que as pessoas, agora e no futuro, atinjam um nível satisfatório de desenvolvimento social e econômico e de realização humana e cultural, fazendo, ao mesmo tempo, um uso razoável dos recursos da terra e preservando as espécies e os habitats naturais (LIMA e NETO, 2012).

Porém, há uma dificuldade muito grande em conciliar o desenvolvimento sustentável com o conceito de agricultura industrial, o qual transforma propriedade rural em uma micro, pequena ou grande empresa, usando dos recursos naturais

existentes de maneira intensiva. Do ponto de vista de produção de alimentos, a agricultura industrial é interessante, pois trabalha com a ideia de se produzir grandes quantidades o ano todo. A questão fundamental está em conciliar a produção industrial com o desenvolvimento sustentável.

Uma das alternativas é a utilização dos recursos genéticos da vasta biodiversidade brasileira ainda inexplorada. Uma possibilidade é, por exemplo, a seleção de micro-organismos que possam ser usados na produção de bioherbicidas, os quais podem ser aplicados diretamente na produção de alimentos orgânicos. Especificamente no Rio Grande do Sul, tem-se o bioma Pampa, que abrange uma área compartilhada pela Argentina, Uruguai e Brasil, sendo que no território brasileiro distribui-se pela metade sul do Estado do Rio Grande do Sul, abrangendo cerca de 176.000 km<sup>2</sup>, equivalendo a 64% do território gaúcho e a 2,07% do território brasileiro. Destaca-se de outros biomas por ser o único cuja ocorrência é restrita a somente um Estado e por ser o bioma mais desconhecido de todos os biomas brasileiros (IBGE, 2004).

De acordo com Boldrini (1997), Klein (1984), Bilenca e Minarro (2004) os poucos inventários realizados no bioma Pampa revelaram grande biodiversidade. Apesar de haver preocupação geral da sociedade com relação ao tema da biodiversidade, o foco tem se voltado predominantemente para os recursos animais e vegetais, sendo menor a atenção dispensada aos micro-organismos do solo, os quais representam uma gigantesca reserva genética, e conseqüentemente muito importante para diversos processos biotecnológicos.

A bioprospecção deste recurso pode contribuir para o desenvolvimento econômico e sustentável do país, devido aos inúmeros processos biotecnológicos que são desenvolvidos a partir dos micro-organismos. Diversas áreas de atividade humana podem beneficiar-se, como a saúde (produção de antibióticos, probióticos e outros medicamentos), a agricultura (produção de inoculantes para nutrição de plantas e controle biológicos de pragas, doenças e plantas daninhas), a indústria (obtenção de enzimas para as mais diversas finalidades, biomineração, produção de polímeros e outros produtos biodegradáveis), o saneamento ambiental (tratamento de resíduos sólidos e líquidos, na produção de inoculantes com micro-organismos degradadores), etc. (BRASIL, 2010).

Contudo, há uma grande escassez de estudos no Pampa sobre a diversidade de micro-organismos e suas aplicações biotecnológicas. Em um dos raros trabalhos

realizados no bioma, Sanchez (1987) isolou 20 espécies de fungos em pastagens no Pampa argentino, dentre esses, basidiomicetos lignocelulolíticos. Um agravante para esta situação diz respeito ao fato que o bioma Pampa vem passando por um processo acelerado de mudança do uso da terra, devido à substituição da paisagem natural, formada pelos campos sulinos, por lavouras (de arroz irrigado, soja, milho, cana de açúcar, etc) e por grandes áreas com espécies florestais exóticas (principalmente o eucalipto). Como grande parte dos solos desse Bioma é muito frágil, devido ao alto teor de areia e baixo teor de matéria orgânica, a retirada da vegetação natural e o manejo inadequado do solo (aração, gradagem, falta de terraceamento) utilizado para a implantação destas culturas exóticas, tem levado a sua degradação.

Com isso é possível que significativa parte da biodiversidade do Pampa, e com ela importantes processos biotecnológicos, estão sendo perdidos, sem que ao menos fossem devidamente conhecidos, estudados e preservados para as futuras gerações. Portanto, torna-se de suma importância o desenvolvimento de estudos que possam explorar a utilização biotecnológica dos recursos do Pampa como estratégia de preservação dos recursos naturais e de desenvolvimento sustentável do país e, principalmente, gerar renda e riqueza para a população Gaúcha.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ARTIGO I: ISOLAMENTO, SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS DO BIOMA PAMPA PRODUTORES DE SUBSTÂNCIAS BIOHERBICIDAS

**RESUMO:** Este estudo tem por finalidade selecionar e identificar microrganismos com potencial de produção de fitotoxinas utilizando recursos biológicos do bioma Pampa, avaliando seus efeitos morfológicos e visuais na emergência de plantas teste. Após o processo fermentativo, foram realizados bioensaios, no qual foi utilizado *Cucumis sativus* L. var wisconsin como planta-teste. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, utilizando o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 15 repetições para cada tratamento, sendo avaliada a altura da haste, comprimento da raiz, massa seca e verde da haste e da raiz. Foram testados 39 fungos isolados de plantas daninhas infectadas, no qual, 53% desse total, apresentaram efeitos na inibição do crescimento e desenvolvimento das plantas teste. Após avaliação física, foram atribuídas notas para o efeito fitotóxico, sendo os principais sintomas foram lesões foliares, tais como manchas, crestamento e amarelecimento. Dentre os tratamentos, optou-se em trabalhar com o VP51, que apresentou efeito de inibição em todos os fatores analisados e a nota 60 em avaliação fitotóxica. Na análise molecular o fungo com maior potencial fitotóxico (VP51) foi identificado do gênero *Diaporthe*.

#### 4.1.1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos principais produtores mundiais de arroz irrigado sendo que o Estado do Rio Grande do Sul foi responsável por mais de 62% desta produção na safra de 2012 (CONAB, 2012). No entanto, as plantas daninhas podem reduzir significativamente essa produtividade e a qualidade dos grãos, encarecendo o processamento industrial ou depreciando o produto beneficiado. As plantas daninhas também podem causar outros prejuízos como interferência, alelopatia, parasitismo, sendo hospedeiros de pragas e doenças, intoxicando animais e reduzindo a qualidade do produto pecuário e de forragens armazenadas (EMBRAPA, 2005).

Segundo Petta (2008) a produção de herbicida por micro-organismos apresenta algumas vantagens sobre o herbicida sintético, como por exemplo, são

biodegradáveis, não deixam resíduos tóxicos no meio ambiente, além de que, podem ser ativos em pequenas quantidades. Para Saxena e Pandey (2001) a maioria das fitotoxinas naturais possuem estruturas não-halogenadas, o que os torna menos tóxicas ao ambiente. Segundo Vyvyan (2002), com esse fato pode-se afirmar que a contaminação de alimentos, do solo e da água é menos provável de ocorrer com os herbicidas naturais.

De acordo com Duke et al. (2000) as fitotoxinas podem ser produzidas por fitopatógenos ou por microrganismos capazes de provocar doenças, causar lesões, inibir o crescimento de plantas e levar a morte do hospedeiro. Em vista desses fatores, as fitotoxinas de origem microbianas são usadas como modelos para o desenvolvimento de novos herbicidas (GREAVES, 1996).

Diante da importância do desenvolvimento de novos bioherbicidas, uma das alternativas é a utilização dos recursos genéticos da vasta biodiversidade brasileira ainda pouco explorada. Especificamente no Rio Grande do Sul, tem-se o bioma Pampa, que se destaca de outros biomas por ser o único cuja ocorrência é restrita a somente um Estado e por ser o bioma mais desconhecido de todos os biomas brasileiros (IBGE, 2004).

Nesta perspectiva, este estudo tem por finalidade selecionar e identificar microrganismos com potencial de produção de fitotoxinas utilizando recursos biológicos do bioma Pampa, avaliando seus efeitos na morfologia e fitotoxicidade na emergência de plantas teste.

## **4.1.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1.2.1 Prospecção dos micro-organismos**

Foram realizadas coletas sistemáticas de 13 plantas daninhas infectadas, exibindo sintomas típicos de enfermidades, em áreas de cultivo de arroz irrigado e pastagens naturais do bioma Pampa. Estas coletas ocorreram no período de

dezembro de 2012 a abril de 2013. As espécies coletadas e a distribuição geográfica dos pontos de coleta podem ser visualizadas na Tabela 1.

TABELA 1 – Coordenadas geográficas dos pontos de coleta, plantas daninhas infectadas e número de isolados fúngicos por planta, testados para análise de efeito fitoinibitório dos metabólitos secundários de micro-organismos em *C. sativus*.

Sigla	Local	Coordenadas		Planta daninha	Isolado
		Latitude	Longitude		
DF	Dona Francisca	-29,6340	-53,3530	<i>Commelina erecta</i> (Comelinaceae)	3
				<i>Solanum paniculatum</i> (Solanaceae)	4
				<i>Sagittaria montevidensis</i> (Alismataceae)	1
				<i>Solanum erianthum</i> (Solanaceae)	2
RS	Restinga Seca	-29,8456	-53,4020	<i>Ipomoea triloba</i> (Convolvulaceae)	3
				<i>Sorghum halepense</i> (Poaceae)	4
VP	Vila Paraíso (Santiago)	-29,3250	-54,9587	<i>Conoclinium macrocephalum</i> (Asteraceae)	2
				<i>Passiflora edulis</i> (Passifloraceae)	3
				<i>Solanum stipulaceum</i> (Solanaceae)	4
				<i>Solanum americanum</i> (Solanaceae)	5
				<i>Baccharis dracuntifolia</i> (Asteraceae)	3
				<i>Eryngium horridum</i> (Apiaceae)	3
				<i>Senecio brasiliensis</i> (Asteraceae)	2

As amostras coletadas foram acondicionadas em sacos plásticos individuais e mantidas a 4°C em caixas de isopor. Após, foram transportadas para o laboratório de Biologia do Solo, da Universidade Federal de Santa Maria, onde foi realizado o isolamento dos micro-organismos fitopatogênicos.

#### 4.1.2.2 Isolamento de micro-organismos fitopatogênicos

O isolamento dos microrganismos, a partir das amostras de plantas coletadas, foi realizado conforme Alfenas e Mafia (2007), em placas de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) e incubadas a 28°C por 7 dias, no escuro. Após esse período, foram realizadas repicagens sucessivas, nesse mesmo meio de cultura, até a obtenção de culturas puras. As culturas puras foram armazenadas em tubos inclinados e em placas de Petri, contendo meio de cultura BDA, a 4°C.

#### 4.1.2.3 Processo fermentativo

A obtenção do sobrenadante foi realizada em fermentação submersa por meio do uso de frascos agitados, contendo 125 mL de meio de cultura. A formulação do meio de cultura foi realizada com as seguintes proporções: 10 g/L<sup>-1</sup> de glicose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>); 7,5 g/L<sup>-1</sup> de extrato de levedura; 10g/L<sup>-1</sup> de peptona; 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); 1g/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>.H<sub>2</sub>O) (YU et al., 1998; SELBMANN et al., 2002; PARRA et al. 2005 e ZHANG et al., 2012).

Os meios de cultura líquidos foram esterilizados em autoclave a 121°C por 30 minutos. Após atingirem temperatura ambiente, os micro-organismos foram inoculados utilizando água destilada estéril, vertida sobre a colônia microbiana na placa de Petri, com o auxílio de uma lâmina microbiológica esterilizada.

As fermentações foram realizadas a 28°C em incubadora, marca Tecnal, modelo TE-420, a 120 rpm, permanecendo por 7 dias sob estas condições. Após, foram submetidos à centrifugação, agitados a 4.000 rpm durante 10 minutos. A biomassa foi submetida a avaliação de massa seca, retirando-a do tubo cônico para centrífuga para placas de Petri em estufa para secagem a 100°C, num período de 48 horas.

#### 4.1.2.4 Screening

O *screening*, visou selecionar entre os isolados fungicos, aqueles que produziram substâncias inibidoras do crescimento de plantas no caldo de fermentação (sobrenadante).

O bioensaio foi conduzido em casa de vegetação, no qual utilizou-se *Cucumis sativus* L. var. wisconsin (pepino) como planta teste, por ser uma espécie sensível aos herbicidas sintéticos e de uso frequente nestas avaliações. Além disso, as sementes dessas espécies possuem germinação rápida, uniforme e não apresentam dormência.

A semeadura foi feita em copos plásticos com capacidade de 50 mL, contendo substrato comercial Mecplant<sup>®</sup>, e posteriormente distribuídos em bandejas de polietileno. A aplicação dos tratamentos ocorreram no estágio de desenvolvimento (V<sub>4</sub>), ou seja, com 4 folhas emergidas, em média 20 dias após a semeadura.

#### 4.1.2.5 Delineamento experimental: *screening*

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 40 tratamentos, sendo um o grupo controle (água), 15 repetições para cada tratamento. O tratamento corresponde a um sobrenadante produzido por um fungo e, foram aplicados sob pulverizações, aplicando-se 35 mL da solução diretamente na parte aérea da planta.

Foram avaliados os seguintes fatores de desenvolvimento: i) altura da planta; ii) comprimento da raiz; iii) massa fresca da parte aérea e da raiz; iv) massa seca da parte aérea e da raiz, após 20 dias da aplicação.

As aplicações foram realizadas em períodos diferentes, para efeito de avaliação, os tratamentos foram padronizados pelo critério da proporcionalidade obtidos através da relação entre o tratamento e a testemunha.

Com base nos valores obtidos, foram atribuídos “ - ” para efeito de inibição (entre 0 e 0,95), “ N ” para efeito nulo ou não significativo (entre 0,95 e 1,05) e “ + ”

efeito de crescimento (maior que 1,05). Para avaliar efeito fitotóxico nas plantas, foram atribuídas notas com base nas descrições especificadas na Tabela 2.

TABELA 2 - Método de avaliação fitotóxica das plantas por Frans; Crowley (1986)

<b>%</b>	<b>Descrição das categorias principais</b>	<b>Descrição da fitointoxicação da cultura</b>
0	Sem efeito	Sem injúria ou redução
10	Efeito leve	Leve descoloração ou atrofia
20		Alguma descoloração ou atrofia
30		Injúria mais pronunciada, mas não duradoura
40	Efeito moderado	Injúria moderada, normalmente com recuperação
50		Injúria mais duradoura, recuperação duvidosa
60		Injúria duradoura, sem recuperação
70	Efeito severo	Injúria pesada, redução de estande
80		Cultura próxima da destruição
90		Raramente restam algumas plantas
100	Efeito total	Destruição completa da cultura

As classificações foram utilizadas na seleção dos tratamentos que apresentaram efeito de inibição no crescimento das plantas teste em todas as análises realizadas e posteriormente foram submetidos ao teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro para comparar as médias.

#### 4.1.2.6 Identificação do micro-organismo fitotóxico

O micro-organismo selecionado foi identificado por técnicas de biologia molecular no Laboratório de Biologia do solo - UFSM. O DNA fúngico foi extraído a partir de alíquotas do crescimento em meio de cultura líquida usando Kit ZR Fungal/Bacterial DNA Mini Prep (Zymo Research). Após a extração completa do DNA, a região do nrDNA (ITS1-5.8S-ITS2) para fungos foi amplificada com os primers ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990). A reação de amplificação dos fragmentos alvo foi realizada conforme Baldoni et al. (2012). Posteriormente foi realizada a eletroforese para verificar a amplificação, em gel de agarose a 1,5% e tampão TBE 1X. As amostras de DNA foram coradas com BlueGreen Loading Dye I<sup>®</sup> (LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil) e observadas em luz ultravioleta. Os produtos da PCR foram purificados com o kit Gen Elute PCR clean-up Kit<sup>®</sup> (Sigma, Saint Louis, USA),

seguindo as instruções do fabricante. O sequenciamento das amostras foi realizado no sequenciador ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Os fragmentos sequenciados foram analisados utilizando o programa Staden Package 2.0.0b (STADEN et al., 2003) para a obtenção das sequências consenso. Após essa etapa as sequências consenso, foram depositadas no GenBank . Foi realizada a procura comparativa pela ferramenta BLASTn e a partir disso, foram escolhidas as sequências mais similares com as sequências consenso obtidas anteriormente.

Para a identificação do micro-organismo, todas as sequências foram alinhadas no programa BioEdit v7.2.5 (HALL, 1999) e para selecionar a espécie com máxima verossimilhança, utilizou-se a matriz de correlação, a qual define o grau de correlação entre duas a duas espécies e é definida pela equação 1:

$$r_{nm} = \frac{\sum_{i=1}^I (x_{in} - \bar{x}_n) \times (x_{im} - \bar{x}_m)}{\sqrt{\sum_{i=1}^I (x_{in} - \bar{x}_n)^2 \sum_{i=1}^I (x_{im} - \bar{x}_m)^2}} \quad (1)$$

Onde:  $x_{in}$  são os dados de variável n;  $\bar{x}_n$  é a média da variável n;  $x_{im}$  são os dados de variável m;  $\bar{x}_m$  é a média da variável n.

O coeficiente de correlação é adimensional e varia entre -1 e +1. Caso os dados se alinhem perfeitamente teremos a correlação linear positiva perfeita com o coeficiente de Pearson igual a 1.

### 4.1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.1.3.1 Triagem de fungos fitopatogênicos

Para a triagem dos fungos foram utilizados 39 isolados fúngicos, sendo que na maioria dos testes, o agente patogênico interferiu no comprimento da haste e da raiz. Resultados semelhantes foram observados por Peng et al. (2004) ao examinar a eficácia de *Pyricularia setariae*, isolado 94-409A, para o controle de plantas daninhas em condições controladas.

#### 4.1.3.2 Efeito do meio de cultura no crescimento e desenvolvimento das plântulas de pepino

A ação dos agentes com potencial de controle biológico se apresentou com diversas características, afetando tanto a parte aérea quanto o sistema radicular, conforme pode-se observar na Figura 2

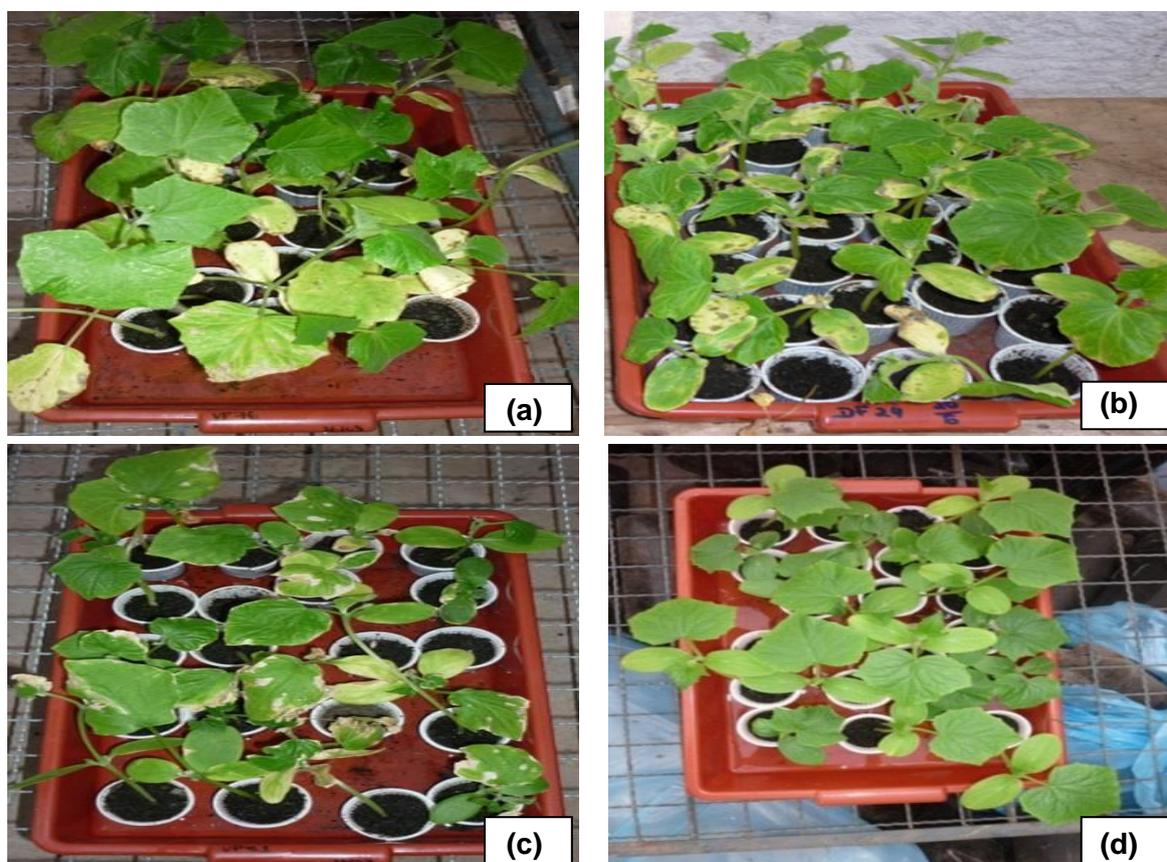


FIGURA 2 - Efeitos visuais de fitotoxidade dos fungos VP76 (a), DF24 (b) e VP51 (c) e Testemunha (d) sobre *C. sativus*.

Pode-se observar alguns dos efeitos visuais causados nas plantas por alguns tratamentos, dentre os quais, destacam-se os fungos VP76 (a), DF24 (b) e VP51 (c), causando efeitos de amarelecimento, manchas nas folhas e crestamento, respectivamente. O sintoma de crestamento, observado na Figura 2a e 2c, também foi notado por Chung et al. (1998) ao avaliar o potencial bioherbicida de *Plectosporium tabacinum* em *Sagittaria trifolia*. Berner et al. (2005) descreveu que um dos sintomas fitotóxicos causados por fungos do gênero *Cercospora* são pequenas manchas marrom nas folhas. Essas manchas muitas vezes se unem resultando em necrose de muitas das folhas e morte da planta hospedeira.

As manchas foliares (Figura 2b) foram observadas na fase inicial da fitotoxidade, 72 horas após a aplicação do sobrenadante. Apresentaram lesões discretas, verde-escuro ao marrom-escuro, distribuídas de forma irregular, limitada as folhas pulverizadas. O amarelecimento ao redor das manchas tornou-se generalizada no limbo foliar, formando necrose a partir das pontas e bordas da folha. As folhas que surgiram após o inóculo estavam isentas da doença. Os efeitos de mancha foliar seguido de amarelecimento também foi descrito por Yandoc et al. (2005) ao analisar o potencial de biocontrole e os efeitos de *Bipolaris sacchari* e *Drechslera gigantea*, fungos patogênicos, em *Imperata cylindrica*.

Após a realização dos bioensaios, os dados foram transformados e classificados quanto aos efeitos apresentados na haste e sistema radicular da planta de *C. sativus*, conforme Tabela 3.

TABELA 3 - Efeito fitoinibitório dos metabólitos secundários de micro-organismos sobre *C. sativus* nos testes de seleção primária.

Tratamento	Comprimento		Massa Verde		Massa Seca		Efeito Fitotóxico	
	Haste	Raiz	Haste	Raiz	Haste	Raiz		
DF11	1.23	(+)	0.98 N	1.30 (+)	1.20 (+)	0.81 (-)	1.00 N	0
DF12	0.73	(-)	0.96 N	0.69 (-)	1.63 (+)	0.78 (-)	0.78 (-)	40
DF13	0.78	(-)	0.78 (-)	0.63 (-)	1.40 (+)	0.73 (-)	0.85 (-)	30
DF21	0.60	(-)	0.94 (-)	0.65 (-)	0.93 (-)	0.69 (-)	0.83 (-)	40
DF23	0.74	(-)	1.51 (+)	0.73 (-)	1.19 (+)	0.71 (-)	0.81 (-)	10
DF24	0.73	(-)	1.08 (+)	0.59 (-)	1.52 (+)	0.70 (-)	0.65 (-)	30
DF25	1.09	(+)	0.91 (-)	1.10 (+)	1.82 (+)	1.27 (+)	1.03 N	20
DF3	1.05	N	0.98 N	0.94 (-)	1.07 (+)	0.89 (-)	0.84 (-)	10

DF41	1.05	(+)	0.91 (-)	0.96 N	1.07 (+)	1.05 N	1.23 (+)	0
DF42	1.13	(+)	1.21 (+)	1.22 (+)	1.62 (+)	1.02 N	1.35 (+)	0
RS11	0.77	(-)	0.89 (-)	0.80 (-)	1.20 (+)	0.85 (-)	0.83 (-)	10
RS12	1.01	N	0.94 (-)	0.84 (-)	1.06 (+)	0.77 (-)	1.17 (+)	0
RS13	0.71	(-)	1.02 N	0.73 (-)	1.64 (+)	0.77 (-)	0.83 (-)	30
RS22	1.24	(+)	1.01 N	1.05 (+)	1.15 (+)	1.23 (+)	1.28 (+)	0
RS24	1.21	(+)	0.95 (-)	1.19 (+)	1.33 (+)	1.12 (+)	1.05 (+)	0
RS25	0.69	(-)	1.00 N	0.83 (-)	0.88 (-)	1.04 N	1.24 (+)	30
RS26	0.64	(-)	0.90 (-)	0.68 (-)	1.43 (+)	0.66 (-)	0.78 (-)	50
VP11	1.11	(+)	0.94 (-)	1.22 (+)	1.54 (+)	1.20 (+)	1.62 (+)	0
VP14	1.19	(+)	1.10 (+)	1.15 (+)	1.62 (+)	1.12 (+)	1.32 (+)	10
VP21	1.05	N	0.95 (-)	1.12 (+)	1.40 (+)	1.02 N	1.17 (+)	0
VP22	1.19	(+)	1.10 (+)	1.26 (+)	1.24 (+)	1.20 (+)	0.99 N	0
VP23	1.08	(+)	0.94 (-)	1.39 (+)	2.45 (+)	1.23 (+)	1.03 N	0
VP41	0.96	N	0.54 (-)	1.05 N	0.98 N	0.79 (-)	0.91 (-)	20
VP43	0.88	(-)	0.50 (-)	0.91 (-)	0.99 N	0.68 (-)	0.85 (-)	20
VP44	0.98	N	0.45 (-)	1.00 N	1.13 (+)	0.76 (-)	1.04 N	10
VP45	0.84	(-)	0.57 (-)	0.92 (-)	0.98 N	0.75 (-)	0.70 (-)	40
VP51	0.65	(-)	0.82 (-)	0.89 (-)	0.80 (-)	0.64 (-)	0.78 (-)	60
VP52	0.92	(-)	0.83 (-)	0.92 (-)	0.70 (-)	0.75 (-)	0.73 (-)	20
VP53	0.74	(-)	1.50 (+)	1.05 N	1.57 (+)	1.04 N	1.04 N	20
VP55	0.77	(-)	0.79 (-)	0.74 (-)	0.74 (-)	0.75 (-)	0.89 (-)	30
VP56	1.22	(+)	0.98 N	1.11 (+)	1.28 (+)	1.12 (+)	1.68 (+)	40
VP62	0.83	(-)	1.32 (+)	1.02 N	1.51 (+)	0.95 N	2.08 (+)	10
VP63	0.89	(-)	0.58 (-)	0.94 (-)	1.29 (+)	0.85 (-)	1.19 (+)	20
VP68	0.89	(-)	1.50 (+)	1.20 (+)	1.78 (+)	1.11 (+)	1.11 (+)	20
VP72	0.91	(-)	1.26 (+)	1.06 (+)	1.62 (+)	0.81 (-)	1.44 (+)	10
VP73	0.89	(-)	1.10 (+)	0.93 (-)	1.10 (+)	0.90 (-)	0.96 N	30
VP76	1.47	(+)	0.91 (-)	1.39 (+)	1.48 (+)	1.44 (+)	1.32 (+)	0
VP81	0.94	(-)	1.21 (+)	0.98 N	1.13 (+)	0.73 (-)	0.73 (-)	10
VP88	1.07	(+)	1.12 (+)	0.90 (-)	0.60 (-)	0.83 (-)	0.83 (-)	10

(+): efeito de crescimento; (-): efeito de inibição; (N) efeito nulo ou sem efeito.

Na Tabela 3 pode-se observar que grande parte dos tratamentos apresentou algum efeito sobre a planta. Dentre os tratamentos, 54% apresentou efeito inibitório no comprimento da haste e 51% no comprimento do sistema radicular. Quanto a massa verde, pode-se observar que apenas 6 tratamentos apresentaram efeito inibitório na raiz e 19 na haste da planta. Com essas variações, nota-se que os efeitos apresentaram maior frequência na haste.

Para definir o tratamento com melhor potencial de controle biológico, refinou-se apenas os tratamentos que apresentaram efeito de inibição em todos os fatores avaliados, sendo eles: DF21, VP51, VP52 e VP55. Para avaliar os tratamentos selecionados, foi realizada a análise da variância, conforme pode ser observado na Tabela 4.

TABELA 4 - Efeitos dos tratamentos na parte aérea e sistema radicular sobre a *C. sativus*.

Tratamento	Haste			Raiz			Efeito Fitotóxico
	Comprimento	Massa Verde	Massa Seca	Comprimento	Massa Verde	Massa Seca	
DF21	0,604 b	0,648 b	0,688 a	0,938 a	0,933 a	0,835 a	40
VP51	0,650 b	0,885 ab	0,638 a	0,824 a	0,803 a	0,776 a	60
VP52	0,923 a	0,922 a	0,746 a	0,827 a	0,703 a	0,733 a	20
VP55	0,771 ab	0,742 ab	0,755 a	0,791 a	0,738 a	0,889 a	30

Na Tabela 4 observa-se que todos os tratamentos apresentaram efeito de inibição. Quando analisado a raiz, pode-se verificar que não houve efeito significativo a nível de 5% de erro no teste de Tukey. Esse resultado demonstra que ambos os tratamentos apresentaram inibição no crescimento e desenvolvimento da raiz de forma semelhante.

No comprimento da haste, os tratamentos DF21 e VP51 apresentaram resultados semelhantes e diferiram dos demais tratamentos. O DF21 apresentou menor proporção de massa verde, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos.

Dentre os tratamentos, o VP51 apresentou nota 60, quando avaliada os efeitos fitotóxico. Dentre os efeitos, apresentou crestamento e amarelecimento das folhas sobre a *C. sativus*.

A inibição do crescimento, também denominada de nanismo de ação lenta, também foi observada por Weissmann et al. (2003) ao avaliar o potencial fitotóxico de isolados bacterianos em plantas daninhas. Para Gronwald et al. (2002), a inibição do crescimento de haste é um fator importante na definição do bioherbicida,

sendo que em seus resultados obteve redução em 31% na altura das plantas e a redução do números de plantas vivas ao final do experimento.

Lynn Walker e Tilley (1997) também observaram o efeito significativo da redução do peso seco e não a mortalidade de diversas espécies de plantas causada por *Myrothecium verrucaria* como potencial agente herbicida de *Senna obtusifolia*.

Segundo Hetherington et al. (2002), um bioherbicida em muitos casos não irá necessariamente causar o mesmo efeito que um herbicida químico, causando mortalidade nas plantas. No entanto, ele tem o potencial através da infecção e do retardo no crescimento de mudas de plantas daninhas para fornecer uma vantagem competitiva para mudas de culturas.

Após a primeira etapa dos bioensaios, há necessidade de otimizar o processo fermentativo, realizando análises com diferentes concentrações e/ou até mesmo, com a mistura dos agentes.

#### 4.1.3.3 Identificação Molecular do micro-organismo com potencial fitotóxico

As sequências nucleotídicas do isolado foram comparadas com as espécies do banco de dados NCBI, selecionando-se 42 sequências com melhor cobertura e semelhança. O resultado da análise pela matriz de correlação, no qual os coeficientes encontrados são indicadores de melhor alinhamento. Os 5 melhores coeficientes de correlação podem ser visualizados na Tabela 5.

TABELA 5 - Matriz de correlação entres as cinco principais espécies com melhores alinhamentos sequenciais.

	VP51	<i>Diaporthe schini</i>	<i>Diaporthe terebinthifolii</i>	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	<i>Diaporthe endophytica</i>	<i>Diaporthe phaseolorum</i>
VP51	1	0,993	0,987	0,986	0,968	0,982
<i>Diaporthe schini</i>	0,993	1	0,987	0,979	0,968	0,975
<i>Diaporthe terebinthifolii</i>	0,987	0,987	1	0,986	0,968	0,982
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	0,986	0,979	0,986	1	0,975	0,996
<i>Diaporthe endophytica</i>	0,968	0,968	0,968	0,975	1	0,972
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	0,982	0,975	0,982	0,996	0,972	1

Com base na Tabela 5, pode-se observar que o VP51 apresentou maior correlação com a espécie *Diaporthe schini* (0,993), mas somente esse resultado não é suficiente para garantir sua identificação. Pode-se considerar, no entanto, que o fungo VP51 pertence ao gênero *Diaporthe*.

O gênero *Diaporthe*, anamorfo *Phomopsis*, pertence ao Filo Ascomycota, sub-filo *Pezizomycotina*, Classe *Sordariomycetes*, Ordem *Diaporthales*, caracterizados como fungos de reprodução sexuada, dos quais a maioria possui sua forma assexual, dificultando a identificação desse gênero a nível de espécie (GOMES, 2012).

*Diaporthe* é frequentemente descrito como produtor de enzimas e metabólitos secundários (DAI et al., 2005) com potencial antibiótico (LIN et al., 2005); fungicida (WU et al., 2008); anticancerígeno (KUMARAN, 2009); impedindo a herbivoria (VESTERLUND et al., 2011), assim como no controle biológico de ervas daninhas (ASH et al., 2010).

Os compostos 2,4-dihidroxi-5,6-dimetil benzoato de etila e phomopsilactona (SILVA et al., 2005); phomopxanthona A, B (ISAKA et al., 2001); taxol (KUMARAN, 2009); sesquiterpeno, esterol (LIN et al., 2005); phomopsichalasin (TAN e ZOU, 2001); lactonas (WU et al., 2008); dicerandrol A,B,C (WAGENAAR e CLARDY, 2001); derivados de micoepoxidieno (PRACHYA et al., 2007) são produzidos por esse gênero para diversas finalidades.

Relata-se também a produção de metabólitos como phomopsina (SHIVAS et al., 1991); nonenolides, phomonol, phomotona, phomofeno (LI et al., 2010); meleina, nectriapirona, 4-hydroxymeleina, scitalona, tirosol, clavatul, ácido mevinico, mevalonolactona, phomol (WEBER et al., 2005) e lacase (DAI et al., 2010).

A ampla gama de hospedeiros suscetíveis a *Diaporthe*, a especificidade em causar doença a determinados hospedeiros e mecanismos de infecção de algumas espécies e a sua persistência no ambiente favorece o uso de algumas espécies desse gênero no controle de plantas daninhas (ORTIZ RIBBING; WILLIAMS, 2006).

Gomes (2012) relata que atualmente, *Phomopsis amaranthicola* tem sido utilizada como um agente bioherbicida, infectando e matando a planta daninha *Amaranthus* spp., em sistemas de cultivo em todo o mundo. A espécie fúngica foi

patenteada (Patente dos EUA n<sup>o</sup> s 5510316 e 5393728) para o controle de *Amaranthus* spp.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram isolados e testados 39 fungos coletados de plantas daninhas do bioma Pampa, sendo que, aproximadamente 53% do total, apresentou efeito na inibição do crescimento, o que demonstra a possibilidade da utilização de recursos do meio para o controle de plantas daninhas. Dentre os fungos, foi selecionado o tratamento VP51, identificado, através de análise morfológica, do gênero *Diaporthe*, apresentando resultados de inibição do crescimento e efeito fitotóxico de crestamento e amarelecimento das folhas em plantas testes. Os resultados obtidos a priori ressaltam o potencial de biocontrole do fungo *Diaporthe* sp, sendo necessário otimizar os processos e os meios fermentativos, a fim de obter um produto de reduzir o custo e aumentar a produção de metabólitos.

## REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C.; MAFIA, A, R. G. (Eds). **Métodos em Fitopatologia**. Ed UFV, 2007. 382p.

ASH, G. J.; STODART, B.; SAKUANRUNGSIRIKUL, S.; ANSCHAW, E.; CRUMP, N. et al. Genetic characterization of a novel *Phomopsis* sp., a putative biocontrol agent for *Carthamus lanatus*. **Mycologia**, v. 102: p. 54–61, 2010.

BALDONI, D.B.; COELHO, G.; JACQUES, R.J.S.; SILVEIRA, R.M.B.; GREBENC, T.; ANTONIOLLI, Z.I. Brown rotting fungus closely related to *Pseudomerulius curtisii* (Boletales) recorded for the first time in South America. **Mycosphere**, v. 3, n. 5, p. 533–541, 2012.

BERNER, D.K.; ESKANDARI, F.M.; BRAUN, U.; MCMAHON, M.B.; LUSTER, D.G. *Cercospora acroptili* and *Cercospora centaureicola* sp. nov. - Potential biological control agents of Russian knapweed and yellow starthistle, respectively. **Mycologia**, v. 97, n. 5, p. 1122-1128, 2005.

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

CONAB-COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2011/12**, Sexto Levantamento, 32p. 2012.

DAI, C. C.; XIE, H.; WANG, X. X.; LI, P. H.; LI, Y. L.; ZHANG, T. L. The effects of intercropping with medicinal plants and addition of endophytic fungus on soil microflora and peanut yield. **Acta ecologia sinica**, v. 30, n. 8, p. 2105-2111, 2010.

DAI, J.; KROHN, K.; FLOERKE, U.; GEHLE, D.; AUST, H. J.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; RHEINHEIMER, J. Novel highly substituted biraryl ethers, phomopsines D-G, isolated from endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Adenocarpus foliolosus*. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 23, p. 5100–5105, 2005.

DUKE, S. O.; DAYAN, F. E.; ROMAGNI, J. G.; RIMANDO, A. M.; Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. **Weed Research**, v. 40, p. 99-111, 2000.

EMBRAPA-EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISAS AGROPECUÁRIAS –. **Cultivo do arroz irrigado no Brasil**: consumo, mercado e comercialização, 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/cap01.htm>> Acesso em: 01 out. 2013.

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

GREAVES, M. P. Microbial herbicides: Factors in development. In COPPING, L.G. Crop protection agents from nature. Cambridge: p. 444-467, 1996.

GRONWALD, J.W.; PLAISANCE, K.; IDE, D.A.; WYSE, D.L. Assessment of *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis* as a biocontrol agent for Canada thistle. **Weed Science**, v. 50, n. 3, p. 397- 404, 2002.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium**, Series 41, p. 95–98, 1999.

HETHERINGTON, S.D.; SMITH, H.E.; SCANES, M.G.; AULD, B.A. Effects of some environmental conditions on the effectiveness of *Drechslera avenacea* (Curtis ex Cooke) Shoem.: a potential bioherbicidal organism for *Avena fatua* L. **Biological Control**, v. 24, p. 103–109, 2002.

IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Mapas de biomas e vegetação**. 2004. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=169](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=169). Acesso em: 20 jan. 2012.

ISAKA, M.; JATURAPAT, A.; RUKSEREE, K.; DANWISETKANJANA, K.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. Phomoxanthonones A and B, novel xanthone dimers from the endophytic fungus *Phomopsis* species. **Journal Natural Products**, v. 64, p. 1015–1018, 2001.

KUMARAN, R. S.; HUR, B. Screening of species of the endophytic fungus *Phomopsis* for the production of the anticancer drug taxol. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 54, p. 21–30, 2009.

LI, Y.; WANG, M.; HUANG, Y.; SHEN, Y. Secondary metabolites from *Phomopsis* sp. A123. Mycology. **An International Journal on Fungal Biology**, v. 1, n. 4, p. 254–261, 2010.

LIN, X.; HUANG, Y.; FANG, M.; WANG, J.; ZHENG, Z.; SU, W. Cytotoxic and antimicrobial metabolites from marine lignicolous fungi, *Diaporthe* sp. **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, p. 53–58, 2005.

LYNN WALKER, H., TILLEY, A.M. Evaluation of an isolate of *Myrothecium verrucaria* from sicklepod (*Senna obtusifolia*) as a potential mycoherbicide agent. **Biological Control**, v.10, n. 2, p. 104–112, 1997.

ORTIZ RIBBING, L; WILLIAMS, II, 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.

PARRA, P.; ALDRED, D.; MAGAN, N. Medium optimization for the production of the secondary metabolite. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 704–711, 2005.

PENG, G.; K. N.; BYER; BAILEY, K. L. *Pyricularia setariae*: a potential bioherbicide agent for control of green foxtail (*Setaria viridis*). **Weed Science**, v. 52, p. 105–114. 2004.

PETTA, T. **Técnicas modernas em espectrometria de massas aplicadas no isolamento de bioherbicidas produzidos por microrganismos**. 2008. 99 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

PRACHYA, S.; WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; NGAMROJANAVANICH, N.; MAHIDOL, C.; RUCHIRAWAT, S.; KITTAKOOP, P. Cytotoxic mycoepoxydiene derivatives from an endophytic fungus *Phomopsis* sp. isolated from *Hydnocarpus anthelminthicus*. **Planta Médica**, v. 73, p. 1418–1420, 2007.

SAXENA, S.; PANDEY, K. A.; Microbial metabolites as eco-friendly agrochemicals for the next millennium. **Applied Microbiology and Biotechnology**; v. 55, p. 395 – 403, 2001.

SELBMANN, L.; ONOFRI, S.; FENICE, M.; FEDERICI, F.; PETRUCCIOLI, M. Production and structural characterization of the exopolysaccharide of the Antarctic fungus *Phoma herbarum* CCFEE 5080. **Research in Microbiology**, v.153, p. 585–592, 2002.

SHIVAS, R.G.; ALLEN, J.G.; WILLIAMSON, P.M. Intraspecific variation demonstrated in *Phomopsis leptostromiformis* using cultural and biochemical techniques. **Mycological Research**, v. 95, p. 320–323, 1991.

SILVA, G. H.; TELES, H. L.; TREVISAN, H.C.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; et al. New bioactive metabolites produced by *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus in *Cassia spectabilis*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1463–1466, 2005.

STADEN R.; JUDGE, D.P.; BONFIELD, J.K.; Managing sequencing projects in the GAP4 environment. **In:** Krawetz SA, Womble DD. Introduction to Bioinformatics. A Theoretical and practical approach. Human Press Inc, Totawa (2003).

TAN R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, v.18, p. 448-459, 2001.

VESTERLUND, S. R.; HELANDER, M.; FAETH, S. H.; HYVÖNEN, T.; SAIKKONEN, K. Environmental conditions and host plant origin override endophyte effects on invertebrate communities. **Fungal Diversity**, v. 47, p. 109–118, 2011.

VYVYAN, J. R.; Allelochemicals as leads of new herbicides and agrochemicals. **Tetrahedron**; v. 58, p. 1631-1646, 2002.

WAGENAAR, M. M.; CLARDY, J. Dicerandrols, new antibiotic and cytotoxic dimers produced by the fungus *Phomopsis longicolla* isolated from an endangered mint. **Journal of Natural Products**, v.64, p. 1006-1009, 2001.

WEBER, D. Endophytic fungi, occurrence and metabolites. **Physiology and Genetics** (The Mycota), v. 15, v. 153–195, 2009.

WEISSMANN, R., UGGLA, C., GERHARDSON, B. Field performance of a weed-suppressing *Serratia plymuthica* strain applied with conventional spraying equipment. **BioControl**, v. 48, n. 6, p. 725-742, 2003.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S e TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes for phylogenetics, **in:** GELFAND, D.H.; SNINSKYI, J. J. e WHITE, T. J. (ED) PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications. New York. Academic Aprescs. 1990, p. 315-322.

WU, S. H.; CHEN, Y. W.; SHAO, S. C.; WANG, L. D.; LI, Z. Y.; YANG, L. Y.; LI, S. L.; HUANG, R. Ten-membered lactones from *Phomopsis* sp., an endophytic fungus of *Azadirachta indica*. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 731– 734, 2008.

YANDOC,C.B.; CHARUDATTAN, R.; SHILLING, D.G. Evaluation of Fungal Pathogens as Biological Control Agents for Cogongrass (*Imperata cylindrica*). **Weed Technology**, v. 19, n. 1, p.19-26, 2005.

YU, X.; HALLETT, S.G.; SHEPPARD, J.; WATSON, A.K. Effects of carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio on growth, conidiation, spore germination and efficacy of the potential bioherbicide *Colletotrichum coccodes*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 333–338, 1998.

ZHANG, L.; WANG, S.; LI, X.; ZHANG, A.; ZHANG, Q.; GAO, J. New insight into the stereochemistry of botryosphaeridione from a *Phoma* endophyte. **Journal of Molecular Structure**, v. 1016, p. 72–75, 2012.

## 4.2 ARTIGO II: OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE UMA SUBSTÂNCIA BIOHERBICIDA PELO FUNGO *Diaporthe* sp.

**RESUMO:** O objetivo deste trabalho é otimizar os meios sintético e industrial, utilizando fermentação submersa, para o crescimento de *Diaporthe* sp. e, avaliar os efeitos fitotóxicos dos metabólitos na germinação de plantas-teste. Como inóculo foi utilizado um fungo isolado a partir de amostras infectadas de planta daninha. As fermentações foram realizadas a 28°C e sob agitação em incubadora a 120 rpm, permanecendo por 7 dias. Para otimizar os meios de fermentação sintético foi utilizado o delineamento experimental Plackett-Burman, avaliando o pH, peptona, extrato de levedura glicose. Para os meios industriais foi utilizado o Delineamento Composto Central Rotacional, avaliando a sacarose e o composto agroindustrial (água de maceração de milho e água de maceração de sorgo). A biomassa fúngica foi determinada pelo método de peso do micélio seco. Para avaliar o desempenho do herbicida de origem biológica foram utilizadas sementes de plantas-teste e papel *germitest*. O meio de fermentação composto por água de maceração de milho pode ser empregado em processos de fermentação, apresentando um crescimento correspondente a 23,872 g.L<sup>-1</sup> de biomassa fúngica, assim como, pode ser inibidor de desenvolvimento de culturas monocotiledôneas e dicotiledôneas.

### 4.2.1 INTRODUÇÃO

Na década de 1980 deu-se início às pesquisas utilizando metabólitos de origem fúngica para o controle de plantas daninhas. Os produtos fitotóxicos naturais apresentam maiores massas molares e estrutura mais complexa que compostos obtidos sinteticamente, observam-se uma maior proporção de átomos de oxigênio e nitrogênio e a ausência de átomos da família dos halogênios, os quais são bastante comuns nos compostos utilizados tradicionalmente como agroquímicos na agricultura (DUKE et al., 2000).

Algumas dessas substâncias fitotóxicas podem ser produzidas por bactérias, fungos, plantas e algas, na forma de metabólitos secundários. Esses compostos não apresentam características enzimáticas, hormonais ou de ácidos nucleicos (GOODMAN et al., 1986) e são capazes de causar doenças e até a morte de plantas (SCHMELZ et al., TRUCKSESS, 2004).

Descobrir herbicidas com novos sítios de ação é muito importante, uma vez que o aparecimento de plantas daninhas com resistência aos herbicidas sintéticos convencionais tem aumentado em escala logarítmica, considerando o fato de que o

mercado para esses produtos alcançou o nível de saturação. As micotoxinas são utilizadas como ferramentas para o conhecimento de novos sítios moleculares de ação ainda não descobertos para os herbicidas convencionais (TREMACOLDI, 2006).

Para conciliar o desenvolvimento sustentável com o conceito de agricultura industrial (SANTOS et al., 2012), uma das alternativas é a utilização dos recursos genéticos da vasta biodiversidade brasileira ainda inexplorada. O bioma Pampa destaca-se de outros biomas por ser o único cuja ocorrência é restrita a somente um Estado e por ser o bioma mais desconhecido de todos os biomas brasileiros (IBGE, 2004). A bioprospecção dos micro-organismos neste bioma pode contribuir para o desenvolvimento econômico e sustentável do país, devido aos inúmeros processos biotecnológicos que podem ser desenvolvidos, utilizando enzimas e metabólitos secundários (BOLDRINI, 1997; KLEIN, 1984; BILENCA e MIÑARRO, 2004).

Diante deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo otimizar os meios sintético e industrial, utilizando fermentação submersa, para o crescimento de *Diaporthe* sp. e, avaliar os efeitos fitotóxicos na germinação de plantas-teste.

## 4.2.2 - MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.2.1 – Micro-organismo, inóculo, fermentações e biomassa

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioprocessos, Departamento de Engenharia Química-Universidade Federal de Santa Maria, RS. Foi utilizado *Diaporthe* sp. como inóculo, isolado a partir de amostras infectadas da planta *Solanum americanum* Mill. obtida no bioma Pampa.

Para a fermentação submersa, foi selecionado 1 disco (6 mm) do micélio fúngico, cultivado em BDA, e inoculado em Erlenmeyers contendo 150 mL de meio líquido esterilizado. A formulação do meio de cultura foi realizada, mantendo as concentrações de sulfato de amônio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $2 \text{ g/L}^{-1}$ ), sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) ( $0,5 \text{ g/L}^{-1}$ ); sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) ( $1\text{g/L}^{-1}$ ) e sulfato de manganês ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) ( $1 \text{ g/L}^{-1}$ ) (PARRA et al., 2005; ZHANG et al., 2012;

SELBMANN et al., 2002; YU et al., 1998). As fermentações foram realizadas a 28°C e sob agitação em incubadora a 120 rpm, permanecendo por 7 dias sob estas condições.

A biomassa fúngica foi determinada pelo método de peso do micélio seco (PRAKASH e SRIVASTAVA, 2008). Após a fermentação, a massa de células foi separada pelo processo de centrifugação em centrífuga orbital a 4000 rpm em 5 minutos. As células foram lavadas com água destilada e colocadas para secar em estufa a 50° C, num período de 48 horas.

#### 4.2.2.2 Otimização do meio sintético

A composição do meio sintético foi definido combinando, inicialmente, diferentes valores de glicose, peptona, extrato de levedura e pH. Para analisar os efeitos das variáveis independentes sobre o crescimento do fungo, foi utilizado o delineamento experimental de Plackett-Burman com 8 ensaios mais 3 pontos centrais (PB8). As variáveis investigadas foram glicose (5-15 gL<sup>-1</sup>), peptona (5-10 gL<sup>-1</sup>), extrato de levedura (5-10 gL<sup>-1</sup>) e pH (5-7).

#### 4.2.2.3 - Otimização do meio industrial

O meio industrial consistiu em substituir a glicose, peptona e extrato de levedura por substratos industriais como a água de maceração de milho (AMM) e sacarose (açúcar cristal). Outra combinação de substratos foi caldo de sorgo e sacarose. Para este propósito, foi utilizado o experimento DCCR com duas variáveis independentes para avaliar o efeito na produção de biomassa fúngica em cada uma das combinações de substrato.

#### 4.2.2.4 – Crescimento de biomassa de *Diaporthe* sp.

Para verificar o crescimento de biomassa fúngica, foram utilizados os meios otimizados sintético e industriais (AMM e AMS). Para cada meio, foram realizados 8 repetições e submetidos a fermentação em incubadora, por 8 dias, a 120 rpm e 28°C a temperatura, sendo que a cada 24 horas foi retirado um amostra para avaliar a massa seca.

#### 4.2.2.5 - Efeito biológico na germinação

Para avaliar o desempenho do herbicida de origem biológica produzido por *Diaporthe* sp. foram utilizadas sementes de *Cucumis sativus* var. wisconsin (pepino) e *Sorghum* sp.- AS 4420 (sorgo). Foram aplicados 35 mL do bioprodutos, sem diluição, em papel *germitest* contendo 50 sementes de cada cultura e colocados em sacolas plásticas fechadas, sendo mantidas em estufa a 28°C. Utilizando-se como grupo controle um tratamento com água. As avaliações dos efeitos foram realizadas 10 dias após a aplicação, de acordo com as Regras para Análise de Sementes - RAS (Brasil, 2009).

### 4.2.3 RESULTADOS

#### 4.2.3.1 Otimização em meio sintético

A utilização do planejamento experimental visou determinar as melhores condições para crescimento de biomassa fúngica, e seus resultados podem ser visualizados na Tabela 6.

É possível observar que em todos os tratamentos houve crescimento de biomassa, sendo que a concentração fúngica variou entre 4,03 g.L<sup>-1</sup> (ensaio 6) e 16,934 g.L<sup>-1</sup> (ensaio 4). Contudo, pode-se verificar que houve variação no crescimento conforme se altera as concentrações das variáveis (pH, glicose, peptona e extrato de levedura)

.TABELA 6 - Matriz experimental de Plackett-Burman para avaliar a influência do meio sintético em concentração de biomassa fúngica após sete dias de fermentação de *Diaporthe* sp.

Ensaio	pH	Glicose (g.L <sup>-1</sup> )	Peptona (g.L <sup>-1</sup> )	Extrato de levedura (g.L <sup>-1</sup> )	Biomassa fúngica (g.L <sup>-1</sup> )
1	7 (1)	5 (-1)	5 (-1)	10 (1)	9,44
2	7 (1)	15 (1)	5 (-1)	5 (-1)	4,85
3	7 (1)	15 (1)	15 (1)	5 (-1)	12,31
4	5 (-1)	15 (1)	15 (1)	10 (1)	16,93
5	7 (1)	5 (-1)	15 (1)	10 (1)	12,91
6	5 (-1)	15 (1)	5 (-1)	10 (1)	4,03
7	5 (-1)	5 (-1)	15 (1)	5 (-1)	13,98
8	5 (-1)	15 (-1)	5 (-1)	5 (-1)	4,76
9	6 (0)	10 (0)	10 (0)	7.5 (0)	10,29
10	6 (0)	10 (0)	10 (0)	7.5 (0)	11,46
11	6 (0)	10 (0)	10 (0)	7.5 (0)	11,78

A análise do efeito de cada variável na produção de biomassa de *Diaporthe* sp. pode ser observado no gráfico de pareto na Figura 3.

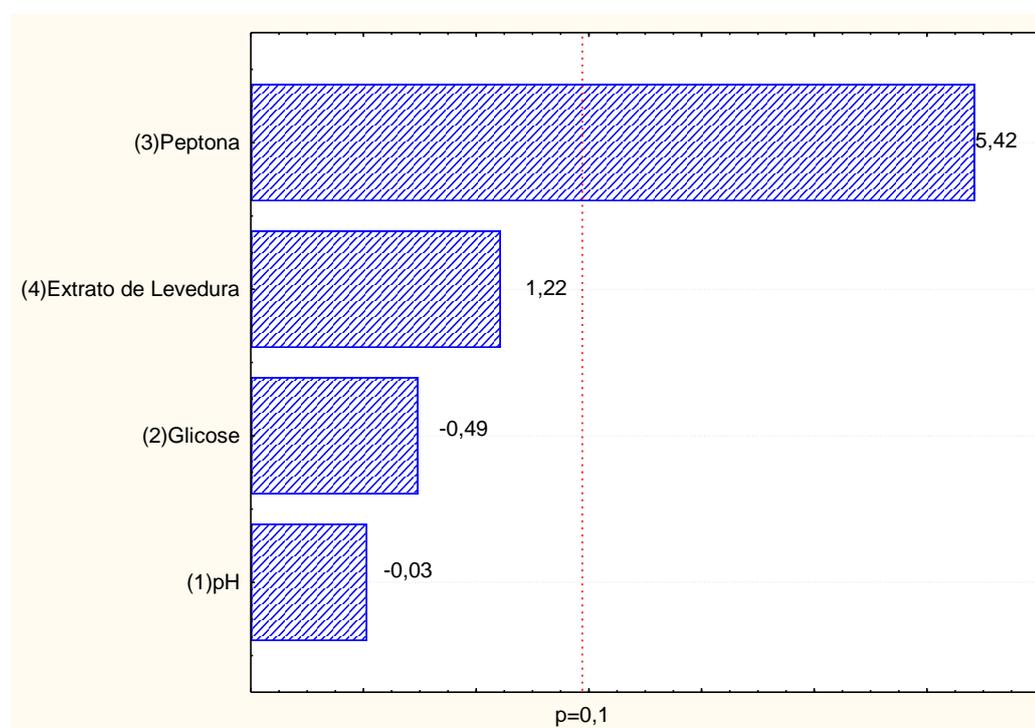


FIGURA 3 - Estimativa dos efeitos da variação de pH e as concentrações de peptona, extrato de levedura e glicose na concentração de biomassa fúngica de *Diaporthe* sp. em meio sintético.

Na Figura 3, pode-se verificar que no crescimento de biomassa fúngica, a variável peptona apresentou efeito significativo a 90% de confiança ( $p < 0,1$ ). O efeito foi positivo (5,4255), indicando que para otimizar a produção de biomassa fúngica é necessário o aumento da concentração de peptona. Ainda na Tabela 4, pode-se verificar que os melhores resultados foram obtidos nos ensaios com  $15 \text{ g.L}^{-1}$  de peptona (ensaios 3,4,5 e 7).

Para otimizar o meio fermentativo, foi realizado um experimento aumentando gradativamente a concentração de peptona, fixando entre  $10 \text{ g.L}^{-1}$  e  $80 \text{ g.L}^{-1}$  e os experimentos foram realizados com três repetições. Os resultados podem ser verificados na Figura 4.

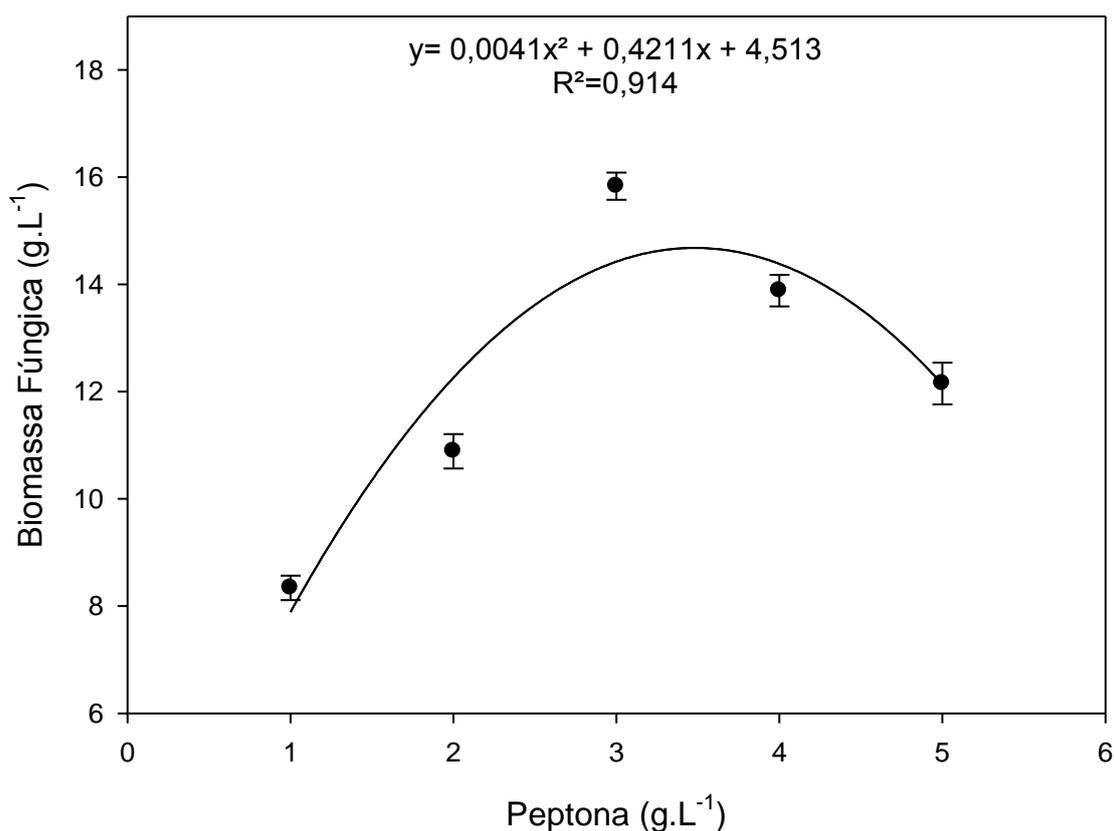


Figura 4 - Concentração de biomassa fúngica de *Diaporthe sp.* em relação à variação de peptona.

A concentração de biomassa fúngica variou entre  $8,3388 \text{ g.L}^{-1}$  e  $15,83 \text{ g.L}^{-1}$  para  $10 \text{ g.L}^{-1}$  e  $40 \text{ g.L}^{-1}$  de peptona, respectivamente. Todos os tratamentos

apresentaram diferenças significativas no Teste de Tukey a nível de 5% de erro, e foi possível verificar que o maior crescimento ocorreu no tratamento 3 (40 g.L<sup>-1</sup> de peptona), obtendo em média 15,86 g.L<sup>-1</sup> de biomassa fúngica.

O modelo apresentou um coeficiente de determinação  $R^2 = 0,914$ , indicando um bom ajuste dos dados experimentais, sendo possível estimar o ponto de máxima com aproximadamente 51 g.L<sup>-1</sup> de peptona para otimizar a produção de biomassa.

#### 4.2.3.2 Otimização meio industrial

O meio sintético apresenta um crescimento significativo, mas seu custo é considerado elevado para a produção em escala industrial. Para minimizar o custo de produção, foram avaliados dois substratos alternativos para a composição do meio de cultura, sendo eles: água de maceração de milho e sacarose.

#### 4.2.3.3 Meio industrial com Água de Maceração de Milho (AMM) e sacarose

A concentração de biomassa fúngica de *Diaporthe* sp. foi avaliada através de uma matriz experimental DCCR com duas variáveis independentes, ou seja, foram alteradas as concentrações de sacarose (entre 12,95 e 27,05 g.L<sup>-1</sup>) e percentual de AMM (entre 2,95 a 17,05 % v.v<sup>-1</sup>). Para a avaliação, foram realizados 11 ensaios, sendo 3 testemunhas no ponto central.

Na Tabela 7 estão dispostos os resultados obtidos no experimento fatorial, no qual pode-se verificar que a concentração de biomassa fúngica do *Diaporthe* sp. variou entre 10,076 g.L<sup>-1</sup> (ensaio 7) e 23,872 g.L<sup>-1</sup> (ensaio 8), resultando em um aumento de aproximadamente 41% em comparação com a maior produção de biomassa em meio sintético.

TABELA 7 - Matriz experimental fracionado utilizado na avaliação de biomassa fúngica de *Diaporthe* sp. em meio industrial de AMM.

Ensaio	Sacarose (g.L <sup>-1</sup> )	AMM (%.v.v <sup>-1</sup> )	Biomassa fúngica (g.L <sup>-1</sup> )
1	15 (-1)	5 (-1)	13,109
2	25 ( 1)	5 (-1)	11,907
3	15 (-1)	15 ( 1)	19,863
4	25 ( 1)	15 ( 1)	21,817
5	12,95 (-1,41)	10 ( 0)	18,394
6	27,05 (1,41)	10 ( 0)	15,639
7	20 ( 0)	2,95 (-1,41)	10,076
8	20 ( 0)	17,05 (1,41)	23,872
9	20 ( 0)	10 ( 0)	17,889
10	20 ( 0)	10 ( 0)	17,154
11	20 ( 0)	10 ( 0)	18,256

Como houve variação no crescimento de biomassa, foi realizada a análise dos efeitos das variáveis independentes para identificar suas relações e interações com a produção de biomassa, conforme pode ser visualizado na Figura 5.

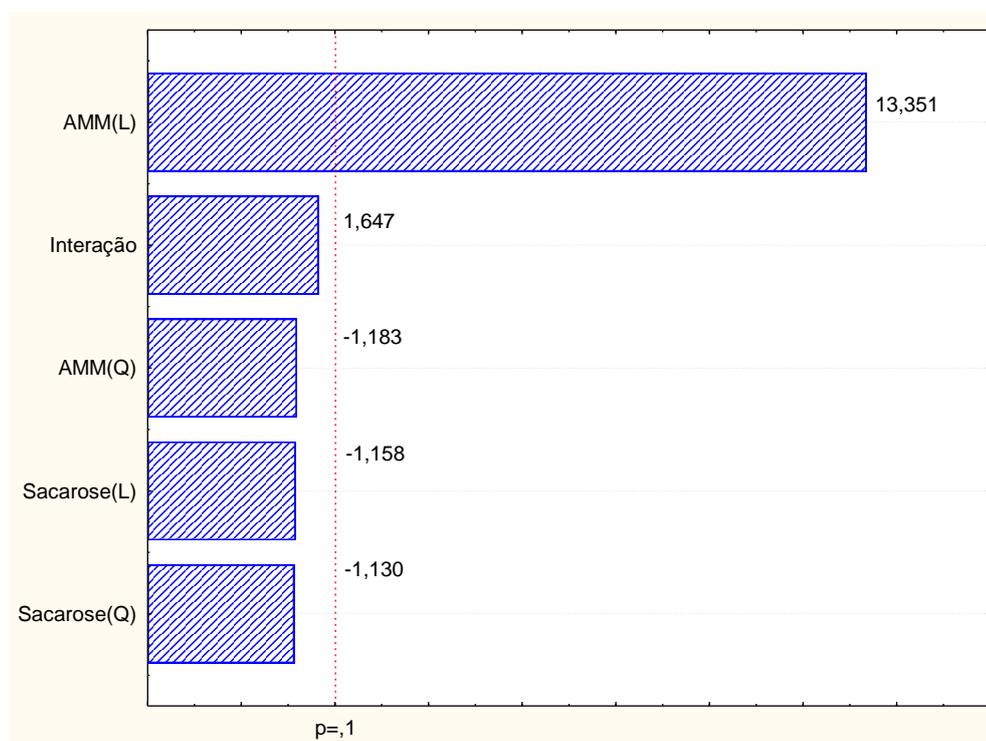


FIGURA 5 - Estimativa dos efeitos das variáveis sacarose e AMM na produção de biomassa fúngica do *Diaporthe* sp. em meio industrial.

Na Figura 5, pode-se observar que apenas o efeito linear de AMM apresentou significância a nível de confiança de 90% ( $p < 0,1$ ) e coeficiente positivo, demonstrando que a medida que aumenta o percentual de AMM sobre o volume, há um incremento na concentração de biomassa fúngica. Esse resultado é possível verificar ao observar a Tabela 7, no qual os melhores resultados ocorreram nos tratamentos 3, 4 e 8 com biomassa de 19,863, 21,817 e 23,872 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, sendo que todos possuíam maior percentual de AMM.

Com base nos resultados obtidos, pode-se modelar uma função que representa a concentração de biomassa fúngica em relação às variáveis independentes, conforme a equação 2.

$$FB_{CSL} = 1,049 + 0,653.S - 0,018.S^2 + 1,288.CSL - 0,0191.CSL^2 \quad (2)$$

Onde:  $FB_{CSL}$  é a concentração de biomassa fúngica (g.L<sup>-1</sup>) no meio industrial com AMM, S é a concentração de sacarose (g.L<sup>-1</sup>) e CSL representa o percentual AMM (%.v.v<sup>-1</sup>).

O modelo foi validado pela análise de variância e obteve um índice de determinação  $R^2=0,9723$ , demonstrando um ótimo desempenho na predição da biomassa fúngica. A maximização da produção de biomassa fúngica é obtida com aproximadamente 18 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 33 % v.v<sup>-1</sup> de AMM, estimando o valor da biomassa em 28,6 g.L<sup>-1</sup>, representando um incremento de 60% sobre a produção máxima obtida na otimização em meio sintético.

#### 4.2.3.4 Meio industrial com caldo de sorgo e sacarose

Assim como a AMM, o resíduo gerado na maceração de sorgo, também foi avaliado no crescimento de biomassa fúngica para o fungo *Diaporthe* sp. Para a realização da análise, utilizou-se da matriz experimental DCCR variando a concentração de sacarose (g.L<sup>-1</sup>) e água de sorgo macerado (%.v.v<sup>-1</sup>). Na Tabela 8 pode-se avaliar a biomassa fúngica em meio industrial de AMS.

TABELA 8 - Matriz experimental fracionado utilizado na avaliação de biomassa fúngica de *Diaporthe* sp. em meio industrial de AMS.

Ensaio	Sacarose (g.L <sup>-1</sup> )	AMS (%v.v <sup>-1</sup> )	Biomassa fúngica (g.L <sup>-1</sup> )
1	15 (-1)	5 (-1)	0,01
2	25 ( 1)	5 (-1)	0,01
3	15 (-1)	15 ( 1)	4,81
4	25 ( 1)	15 ( 1)	5,69
5	12,95 (-1,41)	10 ( 0)	0,21
6	27,05 (1,41)	10 ( 0)	0,75
7	20 ( 0)	2,95 (-1,41)	0,02
8	20 ( 0)	17,05 (1,41)	5,91
9	20 ( 0)	10 ( 0)	0,42
10	20 ( 0)	10 ( 0)	0,58
11	20 ( 0)	10 ( 0)	0,51

A concentração de biomassa não foi expressiva quando comparado com os meios anteriores, sendo que os resultados variaram entre 0,009 g.L<sup>-1</sup> a 5,909 g.L<sup>-1</sup>. Na Figura 6 é possível observar a estimativa dos efeitos de cada variável independente na produção de biomassa do *Diaporthe* sp.

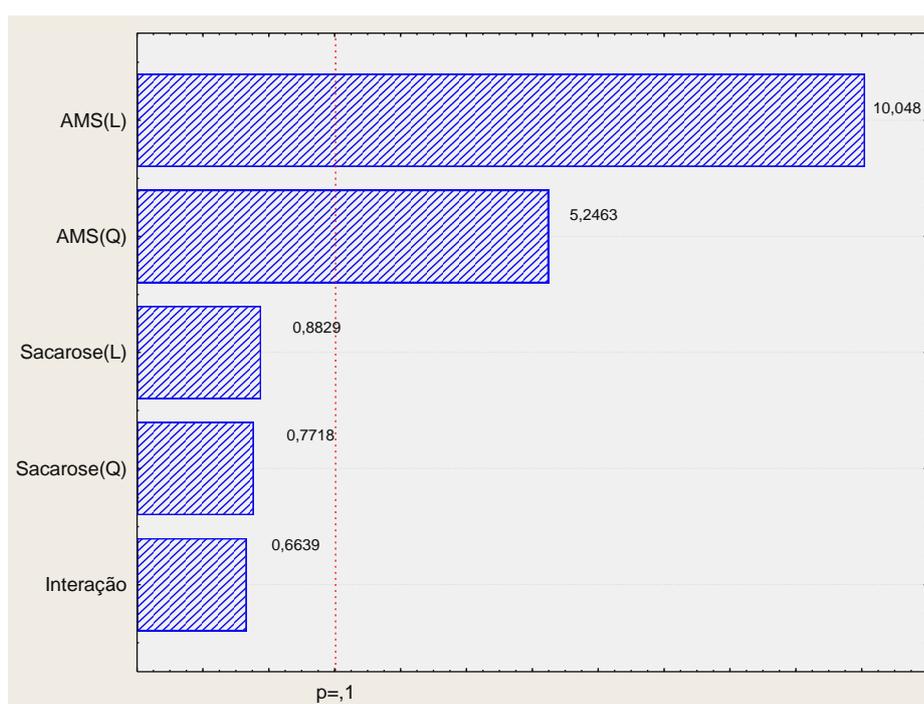


FIGURA 6 - Estimativa dos efeitos das variáveis sacarose e AMS na produção de biomassa fúngica do *Diaporthe* sp. em meio industrial.

Como se pode analisar na Figura 6, apenas a concentração de AMS apresentou efeito estatisticamente significativo ( $p < 0,1$ ) a um intervalo de confiança de 90%. Os resultados apresentados na Tabela 8 foram utilizados na modelagem de uma função quadrática representando a concentração de biomassa fúngica em relação às variáveis independentes, conforme equação 3.

$$FB_{MS} = 4,282 - 0,304.S + 0,009.S^2 - 0,702.MS + 0,059.MS^2 \quad (3)$$

Onde:  $FB_{MS}$  é a concentração de biomassa fúngica ( $g.L^{-1}$ ) no meio industrial com AMS,  $S$  é a concentração de sacarose ( $g.L^{-1}$ ) e  $MS$  representa o percentual AMS ( $\%.v.v^{-1}$ ).

O modelo foi validado pela análise da variância (ANOVA) e obtendo um índice de determinação ( $R^2$ ) de 0,97, considerado um ótimo desempenho. Mas como o coeficiente que acompanha as variáveis quadráticas é positivo, o modelo não pode ser utilizado para estimar a produção máxima, apenas ponto com menor crescimento de biomassa.

Para otimizar o meio, foi realizada uma experimentação fixando o valor da concentração de sacarose em  $20 g.L^{-1}$  e variando o percentual de AMS sobre o volume total entre  $10 \% v.v^{-1}$  e  $30 \% v.v^{-1}$  (Tabela 9). A variável sacarose foi fixada em ponto central (-1,41), visto que na análise estatística não apresentava efeito significativo.

TABELA 9 - Variação de concentração de AMS para avaliação do crescimento de biomassa de *Diaporthe* sp. em meio industrial.

Ensaio	AMS (%.v.v <sup>-1</sup> )	Biomassa fúngica (g.L <sup>-1</sup> )
1	10	0,703
2	12,5	2,920
3	15	4,833
4	17,5	7,793
5	20	8,289
6	22,5	8,337
7	25	9,183
8	27,5	9,570
9	30	9,487
10	10	0,944
11	10	0,763

Na Tabela 9, observou-se que a concentração de biomassa variou entre 0,703 g.L<sup>-1</sup> (ensaio 1) e 9,570 g.L<sup>-1</sup> (ensaio 8), constatando um melhor crescimento quando comparado com o a primeira avaliação.

Os valores foram modelados numa função quadrática em relação a concentração de AMS, conforme equação 4.

$$FB_{MS} = -0,0304.MS^2 + 1,6402.MS - 12,581 \quad (4)$$

Onde:  $FB_{MS}$  é a concentração de biomassa fúngica (g.L<sup>-1</sup>) no meio industrial com AMS e MS representa o percentual AMS (%.v.v<sup>-1</sup>). Este modelo apresentou índice de determinação ( $R^2$ ) de 0,987, sendo estimado uma produção máxima em aproximadamente 9,6 g.L<sup>-1</sup> de biomassa fúngica, com uma concentração de 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 27 % v.v<sup>-1</sup> de água de maceração de sorgo. Mesmo com os resultados obtidos na otimização, o meio industrial com AMS não apresentou vantagem, representando apenas 33% da produção do meio com AMM, sendo indicado como alternativa para a redução do custo de produção.

#### 4.2.3.5 Análise do crescimento de biomassa fúngica

Após a otimização dos meios fermentativos, foi realizada a análise do crescimento de biomassa fúngica num período de 8 dias. Os meios utilizados podem ser observados na Tabela 10.

TABELA 10 - Substratos definidos como meios de fermentação otimizados para o fungo *Diaporthe* sp.

Substratos	Meio de fermentação		
	Sintético	Milho	Sorgo
Glicose (g.L <sup>-1</sup> )	10	----	----
Peptona (g.L <sup>-1</sup> )	51	----	----
Extrato Levedura (g.L <sup>-1</sup> )	7,5	----	----
Sacarose (g.L <sup>-1</sup> )	----	18	20
AMM (%.v.v <sup>-1</sup> )	----	33	----
AMS (%.v.v <sup>-1</sup> )	----	----	27
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	2	2	2
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g.L <sup>-1</sup> )	1	1	1
MgSO <sub>4</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	0,5	0,5	0,5
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O (g.L <sup>-1</sup> )	1	1	1

Na Figura 7 observa-se o crescimento de biomassa fúngica de *Diaporthe* sp. em meio sintético, industrial de AMM e industrial de AMS, em condições otimizadas.

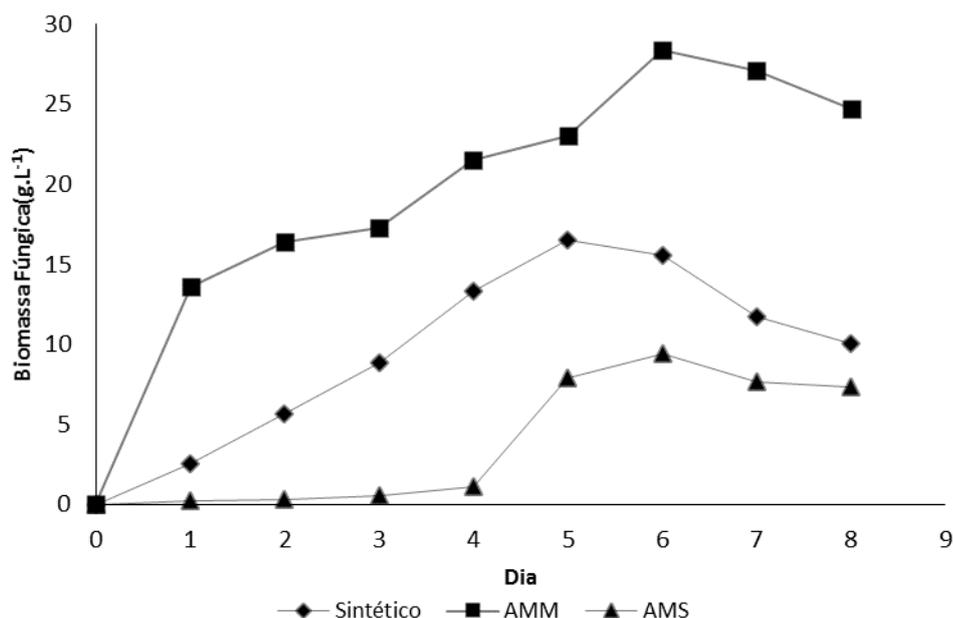


FIGURA 7 – Crescimento de biomassa fúngica de *Diaporthe* sp. em meio sintético, industrial de AMM e industrial de AMS, em condições otimizadas.

O meio de fermentação industrial de AMS otimizado apresentou máxima de 29,41 g.L<sup>-1</sup> de concentração de biomassa entre 5 e 7 dias de fermentação. No meio sintético a concentração máxima de biomassa fúngica foi obtida entre 4 e 6 dias de fermentação submersa.

Para o meio industrial de AMM otimizado, o pico de crescimento foi registrado entre 5 e 7 dias com máximo de 28,40 g.L<sup>-1</sup>, que representa um incremento de aproximadamente 58% na biomassa de *Diaporthe* sp. corroborando com a análise realizada anteriormente na otimização do meio. Este resultado pode ser relacionado as características do composto industrial. Segundo Hoch (1997), a milhocina (água de maceração de milho), é economicamente atrativa, e os estudos demonstram resultados satisfatórios na produção de biomassa, por ser uma

potencial fonte de nitrogênio. Para Formanek (1998), Parekh et al.(1999) e Valduga et al (2007), a milhocina possui vitaminas, minerais e carboidratos que são eficazes no processo de fermentação.

#### 4.2.3.6 Teste biológico na germinação de sementes

Para os avaliação do efeito na germinação de sementes, foram utilizadas *C. sativus* var. wisconsin e *Sorghum* sp como teste e aplicado os bioprodutos dos três meios fermentativos otimizados resultantes da análise de crescimento fúngico, conforme Figura 8.

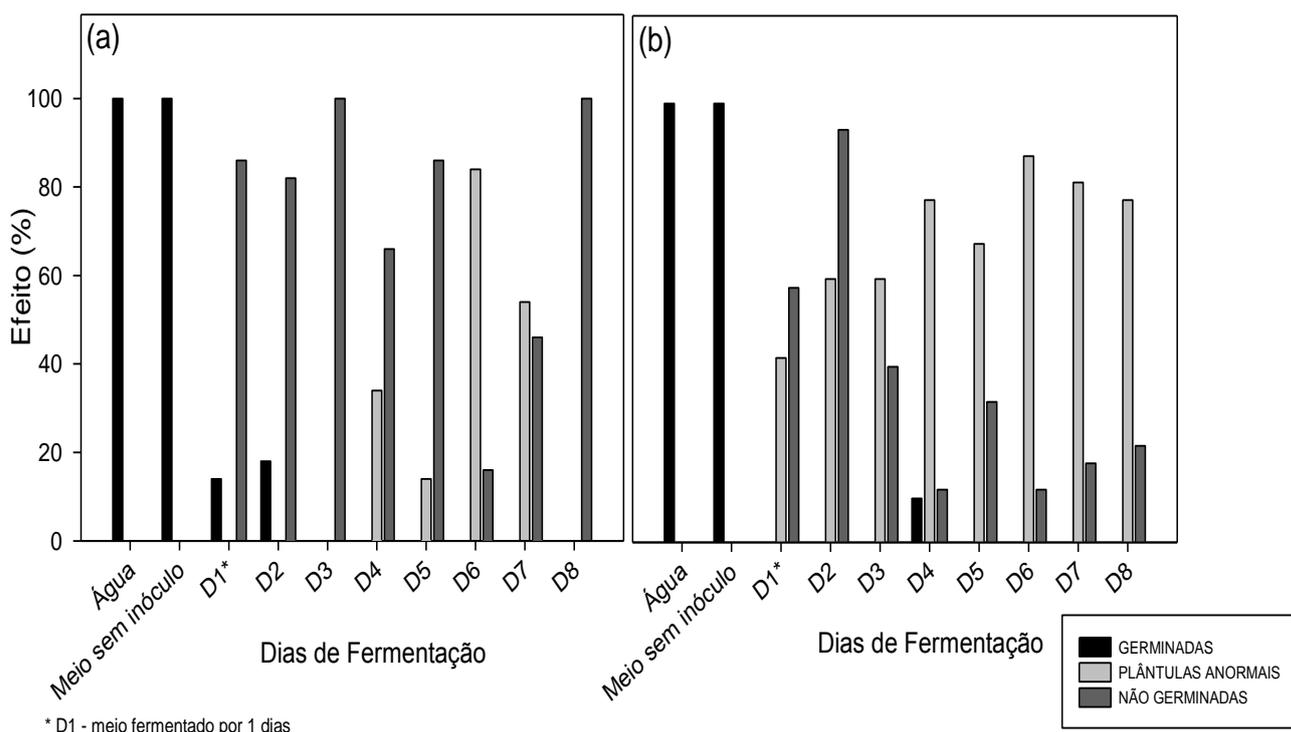


FIGURA 8 - Efeito fitotóxico do *Diaporthe* sp. em meio de fermentação sintético na germinação de *Cucumis sativus* var. wisconsin (a) e *Sorghum* sp (b).

Pode-se observar na Figura 8, os efeitos fitotóxicos causados na germinação, sendo que as testemunhas (água e o meio sem o inóculo) obteve a

totalidade das sementes germinadas em ambas as plantas teste, demonstrando que o meio não interfere no efeito fitotóxico na germinação.

Na Figura 8a estão dispostos os efeitos na germinação de de *C. sativus*, no qual variou o efeito conforme a quantidade de dias de fermentação do meio. Nos ensaios D3 (três dias de fermentação) e D8 (oito dias de fermentação) não apresentou germinação.

Os efeitos nas sementes de *Sorghum* sp. pode ser visualizada na figura 8b, o qual variou o efeito conforme a quantidade de dias em processo fermentativo. As plântulas anormais foram registradas com maior frequência nos dias 3, 4, 5, 7 e 8. Nesses dias, as plântulas que se desenvolviam eram deformadas, ou seja, desenvolvimento fraco ou com estruturas essenciais deformadas.

Na Figura 9, pode-se observar os efeitos fitotóxicos produzido em meio de fermentação industrial AMM, na germinação de *C. sativus* (a) e *Sorghum* sp. (b).

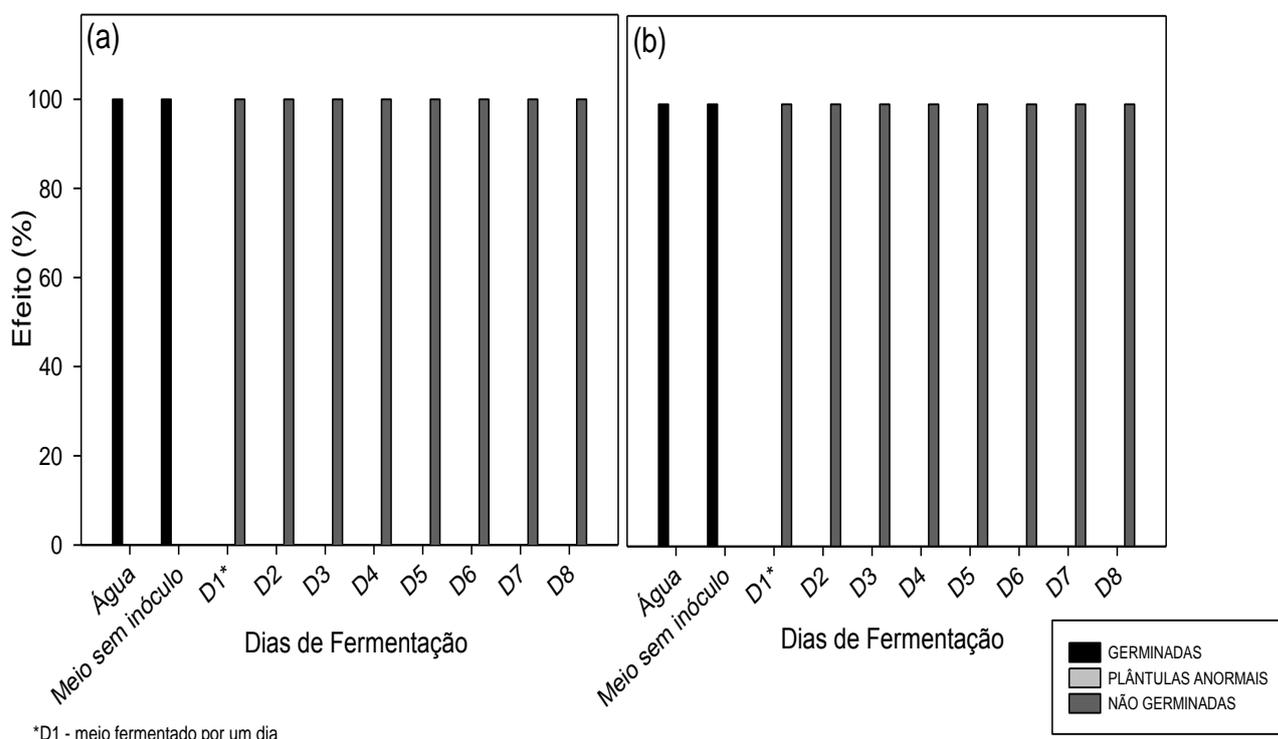


FIGURA 9 - Efeito fitotóxico do *Diaporthe* sp. em meio de fermentação industrial de AMM na germinação de *Cucumis sativus* var. wisconsin (a) e *Sorghum* sp. (b).

Os efeito fitotóxico nas duas espécies não diferiram, ou seja, quando analisado apenas os meios fermentativos com inóculo, inibiram a germinação das sementes das plantas teste, no qual as sementes estavam em estágio de dormência.

A avaliação de fitotoxicidade do *Diaporthe* sp. inoculado em meio de água de maceração de sorgo na germinação pode ser visualizado na Figura 10.

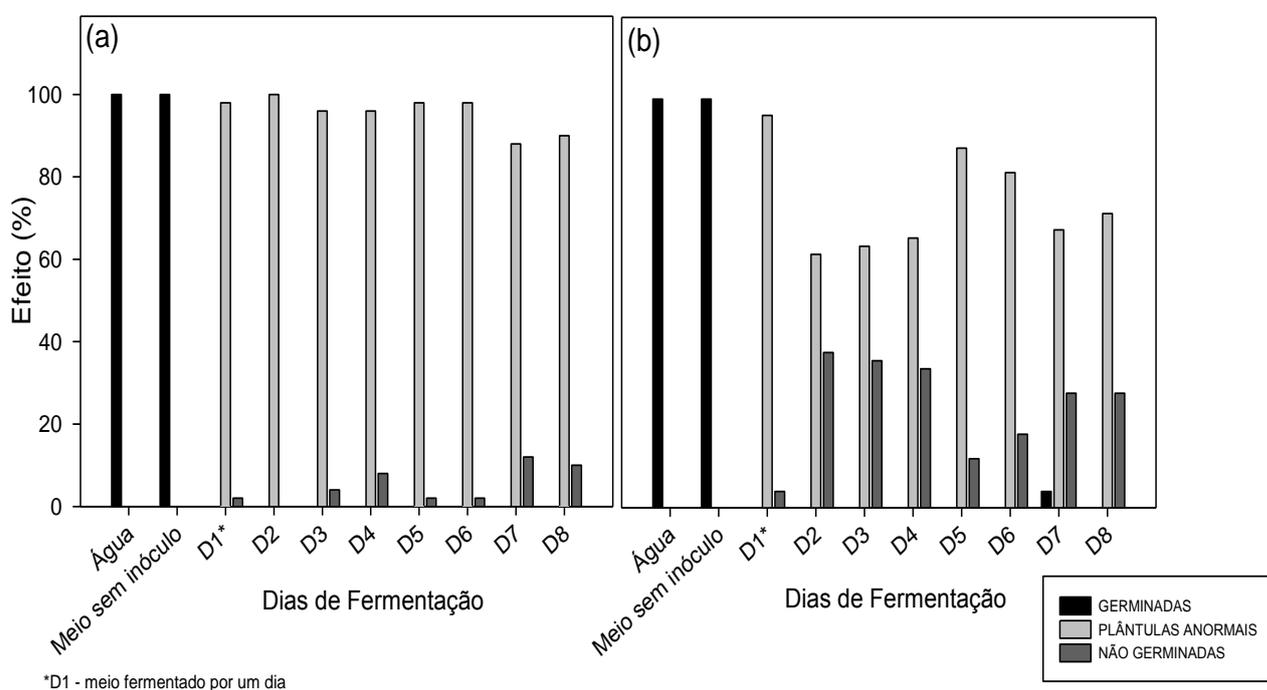


FIGURA 10 - Efeito fitotóxico do *Diaporthe* sp. em meio de fermentação industrial de AMS na germinação de *Cucumis sativus* var. wisconsin (a) e *Sorghum* sp. (b).

Na Figura 10a, é possível observar que o efeito mais frequente foi o desenvolvimento de plântulas anormais em sementes de *C. sativus*. Todas as plântulas apresentaram deformações ou fraco desenvolvimento quando comparado com as sementes testemunhas. Nas sementes de *Sorghum* sp. (Figura 10b) foi mais frequente o desenvolvimento de plântulas anormais ou deformadas. Algumas sementes não germinaram, a maioria eram dormentes, principalmente nos dias 2, 3 e 4.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível observar que, em todos os meios fermentativos utilizados, houve a produção de biomassa fúngica do *Diaporthe* sp., sendo que a concentração no meio com resíduo agroindustrial de água de maceração de milho apresentou maior produção. Este resultado afirma a possibilidade de reutilização desse resíduo como fonte de nitrogênio na produção de biomassa, bem como uma forma eficiente na redução do custo de produção.

O meio de fermentação submersa com água de maceração de sorgo não apresentou resultados expressivos, quando comparados com os demais meios, podendo ser utilizado como alternativa de redução de custo, substituindo o meio sintético.

Os efeitos na germinação de plantas teste, ambos os meios apresentaram inibição, com destaque para o meio de fermentação industrial com AMM, no qual impediu a germinação em todas as sementes testadas. Estes resultados indicam a possibilidade da utilização do meio industrial na concentração de biomassa fúngica e produção de um bioproduto com potência de controle de plantas daninhas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BILENCA, D.; MIÑARRO, F. **Identificación de áreas valiosas de pastizal en las Pampas y Campos de Argentina, Uruguay y Sur de Brasil.** Fundación Vida Silvestre, 2004.

BOLDRINI, I. I. **Campos no Rio Grande do Sul. Fisionomia e problemática ocupacional.** Boletim do Instituto Central de Biociências, v. 56, p. 1-39, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes.** Brasília: SNDA/DNPV/CLAV, 2009. 365p.

CUTLER, H.G. Phytotoxins of microbial origin. In DUKE, O.S.; ROMAGNI, G.J.; DAYAN, E.F.; Natural products as source for new mechanisms of herbicidal action. **Crop Protection**, v.19, p.583, 2000.

FORMANEK, J.A. **Genetic manipulation and characterization of solventproducing clostridia.** Ph.D. Thesis. University of Illinois, IL, USA, 1998.

GOODMAN, R. N.; KIRÁLY, A.; WOOD, K. R. **The Biochemistry and physiology of plant disease**. Columbia: University of Missouri Press, 1986. 433 p.

HOCH, J.A. Panspermia, spores and the *Bacillus subtilis* genome. **Nature**. 390: 237-238, 1997.

IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Mapas de biomas e vegetação**. 2004. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=169](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=169). Acesso em: 20 jan. 2012.

KLEIN, R. M. Aspectos dinâmicos da vegetação do sul do Brasil. **Sellowia**, v. 36, p. 5-54, 1984.

MACIAS, F.A. et al. Sesquiterpene lactones as allelochemicals. **Journal Natural Products**, v.69, p.795-800, 2006.

PAREKH, M., FORMANEK, J., BLASCHECK, H.P. Pilot-scale production of butanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 using a low-cost corn steep water based fermentation medium. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 51, 152–157, 1999.

SANTOS, E.L; BRAGA, V.; SANTOS, R.S.; BRAGA, A.M.S. Desenvolvimento: Um conceito multidimensional. **Revista Eletrônica da Universidade do Contestado**, n.1, p. 44-61, 2012.

SCHMELZ, E. A.; ENGELBERTH, J.; ALBORN, H. T. O'DONNELL, P.; SAMMONS, M.; TOSHIMA, H.; TUMLINSON, J. H. Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins and volatile organic compounds in plants. **PNAS**, v. 100, n. 18, p. 10551-10557, Sep. 2003.

TREMACOLDI, C. R. Toxinas produzidas por fungos fitopatógenos: possibilidades de uso no controle de plantas daninhas. Antônio Pedro da Silva Souza Filho.– Belém, PA: **Embrapa Amazônia Oriental**,. 22p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 274), 2006.

TRUCKSESS, M. W. Mycotoxins. **JAOAC International**, v. 87, p. 275-284, 2004.

### 4.3 ARTIGO III: PRODUÇÃO DE BIOHERBICIDA POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM BIORREATOR OPERANDO COM O FUNGO *Diaporthe* sp.

**RESUMO:** O objetivo deste trabalho foi otimizar o processo de fermentação submersa em resíduo industrial, de fungo fitopatogênico isolado a partir de planta daninha com sintomas de infecção, avaliando a produção de biomassa e o efeito fitotóxico na germinação de plantas-teste. As fermentações foram realizadas em biorreator STR, pH 5.8, a 28°C, por um período de 72 horas. O delineamento foi definido pela matriz experimental 2<sup>n</sup>, considerando as variáveis aeração e agitação. A biomassa fúngica foi determinada pelo método de peso do micélio seco. Para avaliar o desempenho do herbicida de origem biológica foram utilizadas sementes de plantas-teste e papel *germitest*. O crescimento de biomassa fúngica foi maior em condições com menores rotações, no qual apresentou efeito significativo. Houve efeito de 100% na germinação das plantas teste, no qual não apresentou sementes germinadas, sendo um potencial biocontrole.

#### 4.3.1 INTRODUÇÃO

As plantas daninhas crescem e competem com a plantação por nutrientes e disseminam suas sementes, o que faz permanecer o problema para as gerações seguintes (MCFADYEN, 1998), afetando o rendimento da produção de grãos na agricultura (LI et al., 2003). Uma das formas de manejo é o controle biológico por micro-organismos endofíticos, fitopatogênicos ou sapróbios. Esse método ganhou ascensão por ser prático e ambientalmente seguro (TRUJILLO, 2005).

Devido à sua diversidade, os fungos endofíticos recebem maior destaque no meio científico, principalmente em estudos com foco na descoberta de novos metabólitos e enzimas, com aplicações nas áreas da saúde, ambiental e agrícola (MITCHELL et al., 2010; SMITH et al., 2008, XU et al., 2010). Segundo Schulz e Boyle (2005), aproximadamente 80% dos fungos endofíticos produzem compostos biologicamente ativos, como antibióticos, fungicidas e herbicidas.

Os metabólitos secundários podem ser obtidos por processo fermentativo (SANCHES e DEMAIN, 2002), na qual a fermentação submersa é a mais utilizada atualmente pela facilidade operacional, economia, espaço reduzido e por possibilitar o controle sobre as condições dos meios de cultivo (MACHADO, 2002).

Um biorreator mantém este processo natural provendo condições adequadas como temperatura, pH, substrato, sais nutricionais, vitaminas e oxigênio (para organismos aeróbios), possibilitando que as células cresçam e produzam os metabólitos de interesse (SCHÜGERL, 1987). O modelo mais comumente utilizado é o convencional do tipo tanque agitado e aerado (STR).

Diversos trabalhos têm sido publicados demonstrando a utilização de matérias-primas alternativas. Os resíduos vegetais vêm sendo intensamente estudados como fonte de carboidratos para processos fermentativos, pois estes materiais constituem uma fonte renovável (MISHRA; SINGH, 1993; SHAN; LEE, 1994).

De acordo com a Associação Brasileira das Indústrias de Milho (2014), nos últimos anos, a produção de milho vem apresentando rendimento recorde a cada ano, comprovando grande disponibilidade deste no mercado. Há duas formas para realizar o beneficiamento do milho, por processo a seco ou por via úmida. O subproduto do processamento dos grãos de milho obtido durante a lavagem e embebição dos grãos quando do fracionamento em amido e germe (óleo) é denominado água de maceração de milho (*corn steep liquor*) (ABIMILHO, 2014).

A água de maceração de milho, também chamado de milhocina, contém grande quantidade de nitrogênio, aminoácidos entre outros nutrientes, sendo utilizado principalmente como alimento complementar na fabricação de ração para ruminantes e aves (AMARTEY e LEUNG, 2000) e, em processos fermentativos, por ser fonte dos principais aminoácidos, nutrientes necessários às várias espécies de microrganismos (ARAI et al., 2003; GERN et al., 2008).

Algumas espécies do gênero *Diaporthe* podem ser utilizadas em processos biotecnológicos com potencial no controle de ervas daninhas, ou seja, para produção de bioherbicida (ROSSKOPF et al., 2000a, b). Nesse contexto, há várias descobertas importantes relacionadas a este gênero, incluindo novos metabolitos estruturalmente significativos e fisiologicamente ativos (UDAYANGA et al., 2011).

É possível avaliar a potencialidade da amostra testada, mesmo antes da análise da composição química, a partir de ensaios biológicos, que permitam avaliar

os efeitos fitotóxicos. Para avaliar o potencial de fitotoxicidade dos extratos, pode-se considerar a morfologia das sementes de uma grande variedade de plantas, verificando o crescimento das raízes e do caule (DUKE et al., 2000).

Esse trabalho teve como objetivo otimizar o processo de fermentação submersa em biorreator do tipo STR, utilizando resíduo agroindustrial como substrato para a produção de metabólitos do fungo *Diaporthe* sp., e avaliar sua ação fitotóxica na germinação de plantas-teste.

### 4.3.2 MATERIAL E MÉTODOS

#### 4.3.2.1 Micro-organismo e preparo do inóculo

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioprocessos, Departamento de Engenharia Química-Universidade Federal de Santa Maria, RS. Para inóculo foi utilizado *Diaporthe* sp., isolado a partir de amostras infectadas da planta *Solanum americanum* Mill., coletada no bioma Pampa.

Para acelerar a fase lag da cinética, o micro-organismo foi incubado em Erlenmeyers, contendo 150 mL de meio otimizado, sob as mesmas concentrações utilizadas para o processo de fermentação. O meio otimizado é composto por 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>.H<sub>2</sub>O) (PARRA et al., 2005; ZHANG et al., 2012; SELBMANN et al., 2002; YU et al., 1998). O material foi previamente autoclavado e incubado a 28°C, num período de 15 dias. A AMM foi cedida pela empresa Yakult S/A, localizada no município de Piracicaba-SP e a sacarose obtida em comércio local.

Pela ausência da produção de esporos dessa espécie em meio de cultura, principalmente quando isolado endofiticamente (REHNER; UECKER, 1994), foi utilizado o micélio macerado (ALFENAS e MAFIA, 2007). Aproximadamente 7 g de micélio foram inoculados em garrafas de Roux contendo 150 mL do meio de cultura, o mesmo utilizado para o crescimento do fungo.

#### 4.3.2.2 Condições de Cultivo

Os cultivos foram realizados em um biorreator batelada do tipo STR de volume útil de 4,5 L. Foram avaliadas a aeração (0,1; 1,5 e 2,0 vvm) e a agitação (40; 50 e 60 rpm). A temperatura de incubação foi de 28°C e pH 5,8 por 72 horas.

Para ajuste do pH foram acopladas às bombas peristálticas do processador do aparelho, soluções 2 M de ácido acético e hidróxido de sódio e, para controle de espuma foi utilizado o Agrotox AG229. Ao final do cultivo, a biomassa foi coletada por filtração e seca em estufa a 50°C durante 48h. Antes da fermentação, o meio de cultivo, juntamente com o biorreator e acessórios, foram autoclavados a 121°C, durante 45 min.

#### 4.3.2.3. Delineamento Experimental

Os parâmetros estudados foram avaliados utilizando o delineamento experimental fatorial 2<sup>n</sup> (Box, Hunter e Hunter) com três repetições do ponto central. A análise estatística foi realizada com o auxílio do Software Statistica 7.

#### 4.3.2.4. Efeito biológico na germinação

Para avaliar o desempenho do herbicida de origem biológica produzido por *Diaporthe* sp. foram utilizadas sementes de *Cucumis sativus* var. wisconsin (pepino) e *Sorghum* sp.- AS 4420 (sorgo). Foi aplicado 35 mL do bioprodutos, sem diluição, em papel *germitest* contendo 50 sementes de cada espécie e, colocados em sacos plásticos de polietileno transparente, sendo mantidas em estufa a 28°C. Utilizando-se como grupo controle um tratamento com água e outro com o meio de fermentação sem inóculo. As avaliações dos efeitos foram realizadas 10 dias após a aplicação, de acordo com as Regras para Análise de Sementes - RAS (Brasil, 2009).

### 4.3.3 RESULTADOS

#### 4.3.3.1 Otimização do bioprocesso

A utilização do planejamento experimental visou determinar as melhores condições para crescimento de biomassa fúngica, e seus resultados podem ser visualizados na Tabela 11.

TABELA 11 - Matriz experimental para avaliar a influência do meio industrial em concentração de biomassa fúngica de *Diaporthe* sp. após sete dias de fermentação.

Ensaio	Agitação (rpm)	Aeração (vvm)	Biomassa fúngica (g.L <sup>-1</sup> )
1	40 (-1)	1 (-1)	29,17
2	60 ( 1)	1 (-1)	21,24
3	40 (-1)	3( 1)	27,80
4	60( 1)	3( 1)	22,39
5	50 (0)	2 (0)	25,67
6	50 (0)	2 (0)	24,78
7	50 (0)	2 (0)	25,63

Com a realização da matriz experimental, observa-se que a produção de biomassa fúngica do *Diaporthe* sp. variou de 21,237 g.L<sup>-1</sup> e 29,175 g.L<sup>-1</sup>, nos ensaios 2 e 1, respectivamente.

Para verificar os efeitos da agitação e aeração na produção de biomassa fúngica, foi realizada a ANOVA com 90% de nível de confiança, podendo ser verificado na Figura 11.

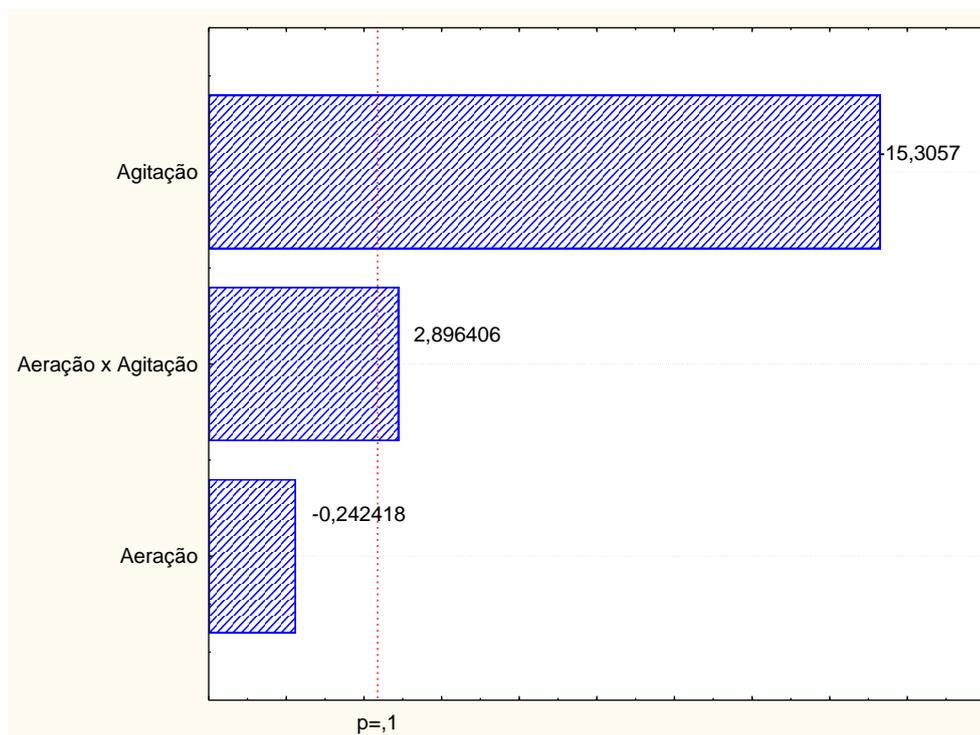


FIGURA 11 - Estimativa dos efeitos da variação de aeração e agitação na produção de biomassa fúngica de *Diaporthe* sp.

A velocidade de agitação apresentou efeito  $p < 0,1$  na produção de biomassa de *Diaporthe* sp., a medida que aumentava a velocidade de agitação foi menor a produção de biomassa. Outro fator importante foi a interação das variáveis, que também apresentou efeito significativo. Com esse resultado, cabe verificar que os efeitos ocorrem na produção de biomassa com a alteração das duas variáveis, pois a interação significativa expressa que, mesmo que uma variável tenha mais influência na produção, as duas estão relacionadas entre si. Com isso será possível otimizar a produção com menor custo.

Comparando com os resultados obtidos na tabela 11, verifica-se que os ensaios 2 e 4 apresentaram menores concentrações de biomassa, sendo que estes ensaios foram realizados com 60 rpm de velocidade de agitação. Conseqüentemente, nos ensaios 1 e 3, com maiores biomassa fúngica, a velocidade de agitação foi reduzida para 40 rpm.

Este efeito pode estar relacionado ao tipo de biorreator, pois mesmo que o biorreator STR seja o mais utilizado em trabalhos, não é o mais adequado para cultivo de fungos. Royse (1987), conclui que o grau de agitação, em muitos casos,

pode causar danos às estruturas vegetativas devido às zonas de alto cisalhamento das pás do agitador.

Para melhor ilustrar o efeito da interação entre as variáveis agitação e aeração, foi modelada a função da produção de biomassa e após, realizou-se o gráfico de contorno, conforme Figura 12.

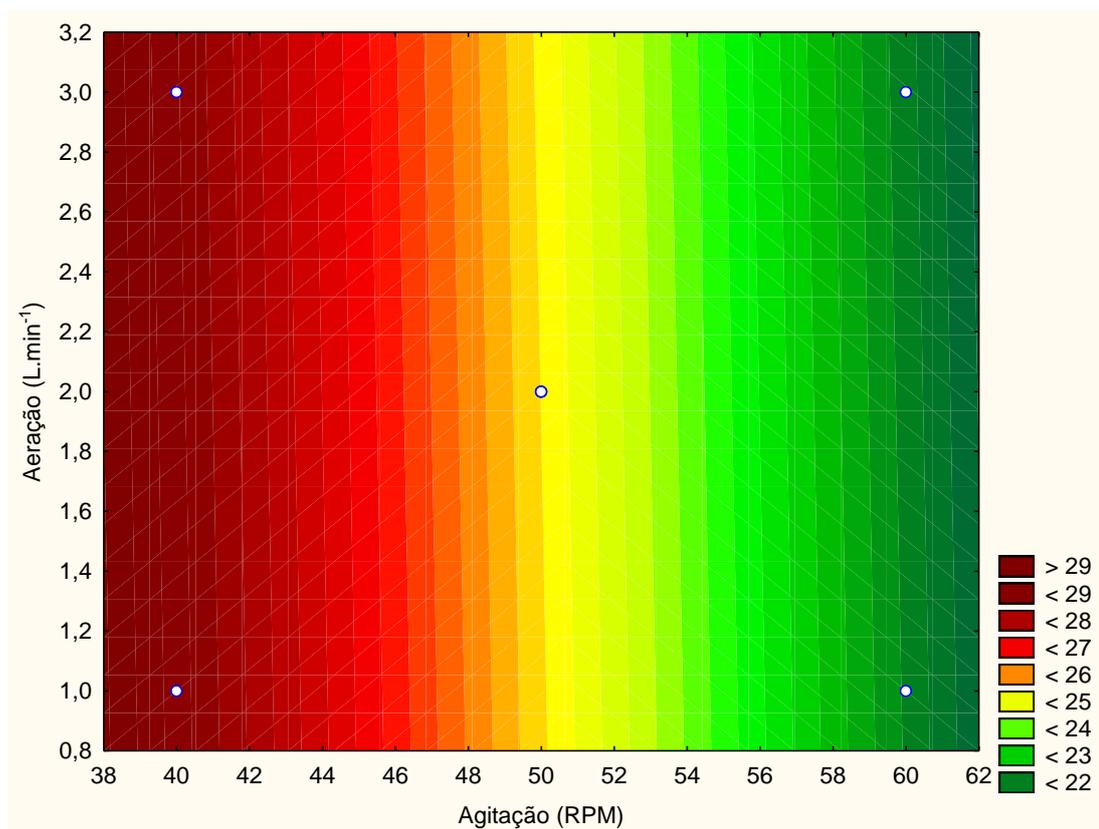


Figura 12 - Gráficos de contorno da concentração de biomassa fúngica de *Diaporthe* sp. em função da agitação (rpm) e aeração (vvm)

O efeito da agitação sobre a produção de biomassa é evidenciado no gráfico de contorno, corroborando com as análises apresentadas anteriormente. Ainda é possível observar que a aeração não afeta diretamente na concentração de biomassa, apresentando um efeito linear.

A função utilizada na modelagem do gráfico de contorno pode ser visualizado na equação 5.

$$FB = 42,0315 - 0,3337.R - 0,053.F$$

Onde FB é a concentração de biomassa fúngica ( $\text{g.L}^{-1}$ ), R é a velocidade de agitação (rpm) e F é a aeração ( $\text{L.min}^{-1}$ ).

Os resultados obtidos no modelo foi testado pela ANOVA com 90% de nível de confiança e apresentou um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,93047, demonstrando que a função possui uma ótima capacidade de predição da concentração de biomassa fúngica para o *Diaporthe* sp. nas mesmas condições do trabalho.

#### 4.3.3.2 Teste biológico na germinação de sementes

Os produtos derivados da fermentação em biorreator STR foram testados sobre a germinação de sementes de *C. sativus* var. wisconsin e *Sorghum* sp. Na Figura 13 é possível verificar os efeitos sobre a germinação.

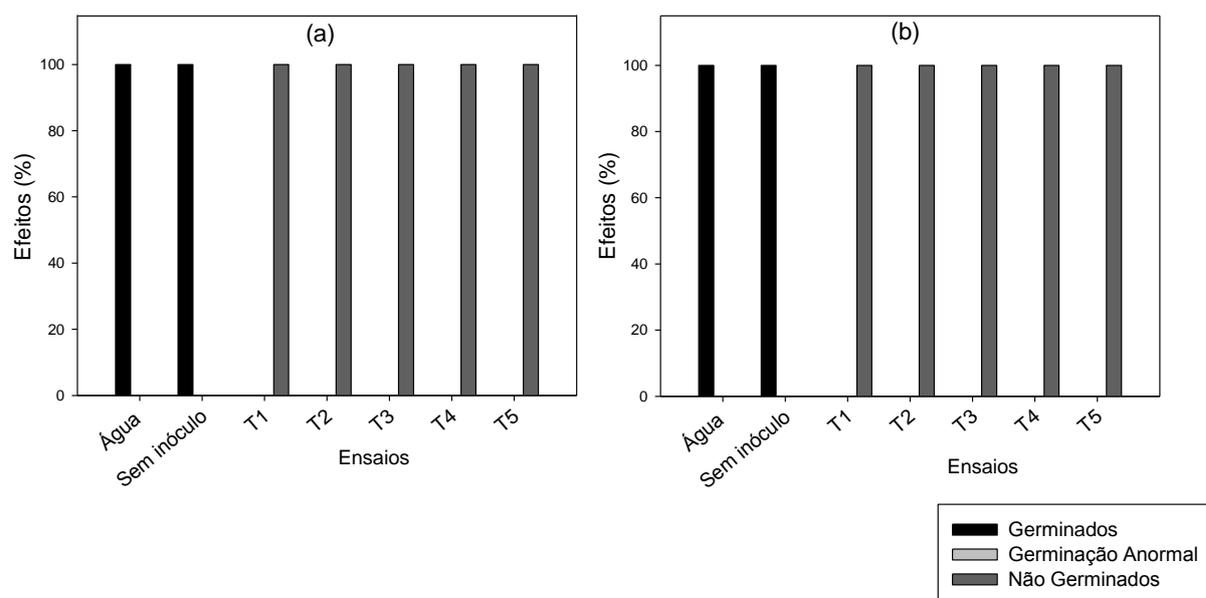


Figura 13 - Efeito fitotóxico do *Diaporthe* sp. em meio de fermentação industrial na germinação de *Cucumis sativus* var. wisconsin (a) e *Sorghum* sp.(b)

Quando avaliado os efeitos dos tratamentos nas plantas-teste, pode-se observar que não diferiram entre si, não havendo a germinação das sementes de *Cucumis sativus* e *Sorghum* sp. O efeito dos tratamentos comparado com as testemunhas, pode ser observado na Figura 14,

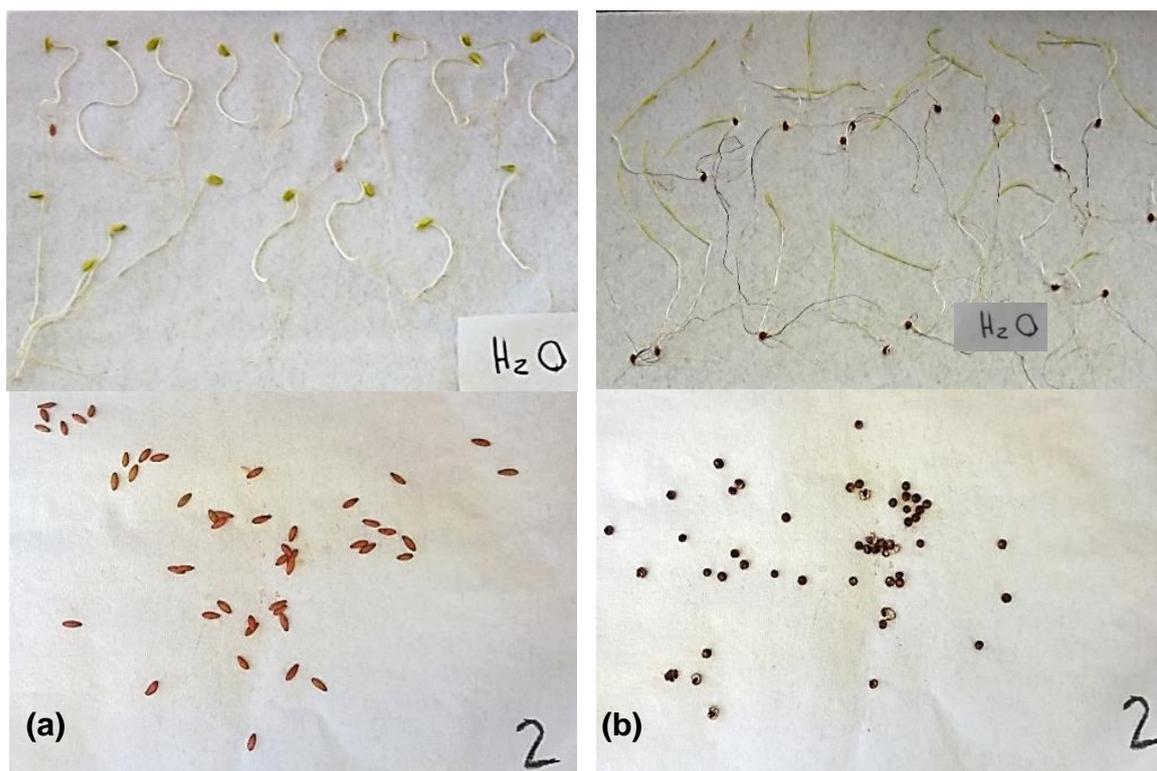


Figura 14 - Efeito do bioproducto produzido por *Diaporthe* sp. na germinação de *Cucumis sativus* (a) e *Sorghum* sp. (b).

Em ambas as espécies testes, as sementes estavam em estágio de dormência ou duras. Na dormência as sementes absorveram o extrato, mas não germinaram ou apodreceram até o final do teste. Quando duras, as sementes não intumesceram. Pode-se observar que o extrato da fermentação em biorreator STR com meio industrial de AMM possui um potencial de bioherbicida, apresentando um efeito inibitório na germinação das plantas testes.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O crescimento de biomassa fúngica do *Diaporthe* sp. em fermentação submersa no biorreator do tipo STR sofre influência da velocidade de agitação, sendo que os melhores resultados foram obtidos nos ensaios com menores valores. A aeração não apresentou efeito significativo na produção de biomassa.

Na germinação das plantas teste *Cucumis sativus* var. wisconsin e de *Sorghum* sp., foram registradas sementes dormentes e duras, sendo verificado efeito satisfatório como potencial de biocontrole na germinação.

Estes resultados devem ser estendidos para a germinação e em plântulas de plantas daninhas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIMILHO. Associação Brasileira das Indústrias de Milho. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br>>. Acessado em dez de 2014.

ALFENAS, A. C.; MAFIA, A, R. G. (Eds). **Métodos em Fitopatologia**. Ed UFV, 2007. 382p.

AMARTEY A. LEUNG J. **Corn steep liquor as a source of nutrients for ethanologic fermentation by bacillus stearothermophilus t-13**. Bulletin of the Chemists and Technologists. Vol. 19. Londres, 2000. Disponível em: <[http://www.mjcce.org.mk/PDF/19\\_1\\_164.pdf](http://www.mjcce.org.mk/PDF/19_1_164.pdf)> Acesso em dez de 2014.

ARAI, Y.; TAKAO, M.; SAKAMOTO, R.; YOSHIKAWA, K.; TERASHITA, T. Promotive effect of the hot water-soluble fraction from fiber on vegetative mycelial growth in edible mushroom. **J. Wood Science**, n. 49, p.437-43, 2003.

DUKE, S. O.; DAYAN, F. E.; ROMAGNI, J. G.; “Investigating the mode of action of natural phytotoxins” - **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, p. 2079-2094, 2000.

GERN, R. M. R.; WISBECK, E.; RAMPINELLI, J. R.; NINOW, J. L.; FURLAN, S. A. Alternative medium for production of *Plerotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. **Bioresource Technology**, v. 99, n.1, p. 76-82, 2008.

LI, Y.; SUN, Z.; ZHUANG, X.; XU, L.; CHEN, S; Li, M; “Research progress on microbial herbicides” - **Crop Protection**; v. 22, p. 247–252, 2003.

MACHADO C.M.M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de hormônio vegetal (ácido giberélico – GA3) por fermentação no estado sólido em resíduos agroindustriais brasileiros: relação da produção de GA3 em**

biorreator piloto e bioensaios em mudas de tomateiro (*Lycopersicum esculentum*). Tese de doutorado em Processos Biotecnológicos - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná. (2002)

MCFADYEN, R.E.C.; "Biological control of weeds"; **Annual review of entomology**; 43:369–93; 1998.

MISHRA, P.; SINGH, A. Microbial pentose utilization. **Advances in Applied Microbiology**, v.15, p.91-149, 1993.

MITCHELL AM, STROBEL GA, MOORE E, ROBISON R, SEARS J. Volatile antimicrobials from *Muscodor crispans*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**. v. 156, p. 270-277, 2010.

REHNER, S.A.; UECKER, F.A.; Nuclear ribosomal internal transcribed spacer phylogeny and host diversity in the coelomycete *Phomopsis*. **Canadian Journal of Botany**. v. 72, p. 1666–1674, 1994.

ROSSKOPF, E.N., CHARUDATTAN, R., DEVALERIO, J.T., STALL, V.M., Field evaluation of *Phomopsis amaranthicola*, a biological control agent of *Amaranthus* spp. **Plant Dis**. v. 84, p. 1225–1230, 2000.

ROSSKOPF, E.N., CHARUDATTAN, R., SHABANA, Y.M., BENNY, G.L., *Phomopsis amaranthicola* a new species from *Amaranthus* sp. **Mycologia**. v. 92, p. 114–122, 2000.

SANCHES, S.; DEMAIN, A. L.; "Metabolic regulation of fermentation processes" - **Enzyme and Microbial Technology**. v. 31, p. 895-906, 2002.

SANTOS, R.S. **Obtenção de ácido cítrico por fermentação submersa a partir de hidrolisado hemicelulósico em biorreator**. (Mestrado em Biotecnologia Industrial). Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Lorena-SP, 2005.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**. v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.

SCHURGEL, K.; LÜKE, J.; OELS, U. Bubble column bioreactors. **Adv. Biochem. Eng.**, v. 7, p. 1-84, 1977.

SHAN, M.M; LEE, Y.Y. Process Improvement in acetone-butanol production from hardwood by simultaneous saccharification e extractive fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.45/46, p. 585-597, 1994

SMITH PK, MAHDAVI J, CARVALHO M, FISHER S, RUSSELL S, TIPPETT N Cyberbullying: its nature and impact in secondary school pupils. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**. v. 49, p. 376–385, 2008.

TRUJILLO, E. E. History and success of plant pathogens for biological control of introduced weeds in Hawaii. **Biological Control**. v. 33, p. 113-112, 2005.

UDAYANGA, D.; XINGZHONG L.; MCKENZIE E.H.C.; CHUKEATIROTE, E.; BAHKALI, A.H.A.; HYDE, K.D. The genus *Phomopsis*: biology, applications, species

concepts and names of common pathogens. **Fungal Diversity**. v. 50, p. 189–225, 2011.

XU J, EBADA SS, PROKSCH P. *Pestalotiopsis* a highly creative genus: chemistry and bioactivity of secondary metabolites. **Fungal Diversity**. v. 44, p. 15-31, 2010.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Alguns fungos existentes no bioma Pampa apresentaram potencial de controle biológico de plantas daninhas devido à produção de fitotoxinas que inibe o crescimento das plantas e causam lesões foliares, como manchas e amarelecimento, podendo originar necrose. Durante a seleção primária, foram selecionados 39 micro-organismos que apresentaram melhores resultados na inibição do desenvolvimento de plantas-teste, sendo definidos os tratamentos DF21, VP51, VP52 e VP55, sendo que o VP51 destacou-se apresentando efeito visual, ou seja, o crestamento das folhas. Para a realização das demais etapas, foi utilizado o fungo VP51, classificado pela identificação molecular como *Diaporthe* sp., fungo este já citado em diversos trabalhos sobre biocontrole de plantas daninhas.

A otimização do meio de fermentação submersa apresentou melhor desempenho com o meio industrial contendo água de maceração de milho (AMM), resultando em um aumento de aproximadamente 41% na produção de biomassa, quando comparado com a maior produção em meio sintético. Ao analisar o efeito sobre a germinação de plantas-teste, o sobrenadante do meio de AMM apresentou efeito na totalidade de sementes testadas, inibindo a germinação e ocasionando a dormência ou endurecimento da semente. Estes resultados demonstram a importância dos estudos com meios alternativos, por ser uma ótima fonte de nutrientes, auxiliar na redução de impactos ambientais gerados por esses resíduos e por proporcionar redução nos custos da fermentação, principalmente para o aumento de escala.

Nos experimentos realizados com o meio otimizado de AMM em escala de bancada, utilizando o biorreator STR, o crescimento de biomassa fúngica variou apenas quanto à velocidade de agitação, sendo que os maiores crescimentos são registrados com menor velocidade de agitação. Os bioprodutos foram testados na germinação e apresentaram efeitos satisfatórios, inibindo 100% da germinação das plantas-teste.

Cabe ressaltar que os resultados obtidos neste trabalho caracteriza-se como um passo inicial da definição do bioproduto, sendo que até o presente momento,

pode-se observar um efeito de danos morfológicos e visuais nas plantas-teste e inibitório na germinação.

Como sugestão para trabalhos futuros, é necessário realizar a análise química dos sobrenadantes afim de identificar os metabólitos secundários produzidos por *Diaporthe* sp., além de determinar suas concentrações. Outro processo importante, é a realização de estudos em plântulas, otimizando o bioproduto com a utilização de adjuvantes, identificar quais os tipos de ervas daninhas que tem ação e caracterizar o mecanismo e modo de ação deste bioherbicida.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, W. L.; MARCON, W.; MACCHERONI, J. D.; VAN ELSAS, J. W. L.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 68, pág. 4906–4914, 2002.

BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas.** Jaguaraúna: Embrapa CNPDA, 199. 388p.

BILENCA, D.; MIÑARRO, F. **Identificación de áreas valiosas de pastizal en las Pampas y Campos de Argentina, Uruguay y Sur de Brasil.** Fundación Vida Silvestre, 2004.

BOLDRINI, I. I. **Campos no Rio Grande do Sul. Fisionomia e problemática ocupacional.** Boletim do Instituto Central de Biociências, v. 56, p. 1-39, 1997.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. **Livro Azul da 4ª Conferência Nacional de Ciência e Tecnologia e Inovação para o Desenvolvimento Sustentável.** Brasília: MCT/CGEE, 2010. 99 p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2011/12,** Sexto Levantamento, 2012. 32p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Levantamento de safra.** 2014. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&>> Acesso em: 27 out. 2014.

DREW, S. W.; Effect of primary metabolites on secondary metabolism. **Annual Review of Microbiology;** v. 3, p. 343-56, 1977.

DUKE, S. O.; DAYAN, F. E.; ROMAGNI, J. G; RIMANDO, A. M.; Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. **Weed Research;** v. 40, p. 99-111, 2000.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISAS AGROPECUÁRIAS – EMBRAPA. **Cultivo do arroz irrigado no Brasil:** consumo, mercado e comercialização, 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/cap01.htm>> Acesso em: 01 out. 2013.

FONTES, J. R. A.; NEVES, J. L. **Manejo integrado de plantas daninhas.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2003. 48 p.

GARAGORRY, F. C. Construção de uma tipologia funcional de gramíneas em pastagens naturais sob diferentes manejos. **Dissertação de mestrado** (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

GONZAGA, S. S. Controle de plantas invasoras (melhoramento do campo nativo visando o aumento na capacidade de suporte da pastagem natural, através de práticas de manejo). In: EMBRAPA, Ministério da Agricultura e Planejamento (Eds.) **Plano de safra 1998/99**. Seminários técnicos sobre a produção de carne de qualidade para o Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 1999. p.42-49.

GREAVES, M. P. Microbial herbicides: Factors in development. In COPPING, L.G. Crop protection agents from nature. Cambridge: p. 444-467, 1996.

GUETSKY, R.; SHTIENBERG, D.; ELAD, Y.; FISCHER, E.; DINNOR, A. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. **Phytopathology**. v. 92, p. 976-985, 2002.

HANADA, R. E.; POMELLA, A. W. V.; SOBERANIS, W.; LOGUERCIO, L. L.; PEREIRA, J. O. Biocontrol potential of *Trichoderma martiale* against the black-pod disease (*Phytophthora palmivora*) of cacao. **Biological Control**. v. 50, p. 143–149, 2009.

IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Mapas de biomas e vegetação**. 2004. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=169](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=169). Acesso em: 20 jan. 2012.

KLEIN, R. M. Aspectos dinâmicos da vegetação do sul do Brasil. **Sellowia**, v. 36, p. 5-54, 1984.

LAHLALI, R.; HAMADI, Y.; GUILLI, M. E.; JIJAKLI, M. H. Efficacy assessment of *Pichia guilliermondii* strain Z1, a new biocontrol agent, against citrus blue mould in Morocco under the influence of temperature and relative humidity. **Biological Control**. v. 56, p.217-224, 2011.

LIMA, M.VN; NETO, R.L.A. Meio Ambiente equilibrado como Direito Fundamental. **Revista Jurídica Justa Pena** v.1, p. 121-130, 2012.

MACEDO, M. C. M.; KICHEL, A. N.; ZIMMER, A. H. Z. **Degradação e alternativas de recuperação e renovação de pastagens**. Campo Grande: Embrapa – CNPQC, 2000.

MENEZES, V. G; MARIOT, C. H. P. Controle de angiquinho no Sistema ClearField de produção de arroz irrigado. In. CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 5, 2007, Pelotas. **Anais...** Pelotas: SOSBAI, 2007. p. 296-299.

MITCHELL, J. K. Development of a submerged-liquid sporulation medium for the potential smartweed bioherbicide *Septoria polygonorum*. **Biological Control**, v. 27, p. 293–299, 2003.

NARDO, E. A. B. de; CAPALB, D. M. F. Utilização de agentes microbianos de controle de pragas: mercado, riscos e regulamentações. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. v.1, cap. 8, p.231-262.

OLIVEIRA JR., R.S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M.H (edt). **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba, PR: Ompipax, 2011. 348 p.

PELLEGRINI, L. G.; NABINGER, C.; CARVALHO, P. C F.; NEUMANN, M. Diferentes métodos de controle de plantas indesejáveis em pastagem nativa. **R. Bras. Zootec.**, v.36, n.5, p.1247-1254, 2007.

PEREIRA, J. R. P.; SILVA, W. **Controle de plantas daninhas em pastagens: Instrução técnica para o produtor de leite.** EMBRAPA – Juiz de Fora, MG, 2002.

PETTA, T. **Técnicas modernas em espectrometria de massas aplicadas no isolamento de bioherbicidas produzidos por micro-organismos.** 2008. 99 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SANCHES, S.; DEMAIN, A. L.; Metabolic regulation of fermentation processes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 895-906, 2002.

SANCHEZ, C. P. Decomposicion Fungica de La Celulosa em um Pastizal de La Pampa Deprimida. **Ciencia Del Suelo**, v. 5, n. 2, p.135-141, 1987.

SANTOS, G. R.; CAFÉ-FILHO, A. C.; REIS, A. Resistência de *Didymella bryoniae* a fungicidas no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 5, p. 476-482, 2006.

SANTOS, G. R.; CAFÉ-FILHO, A. C.; SABOYA, L. M. F. Controle químico do crestamento gomoso do caule da melancia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 155-163, 2005.

SAXENA, S.; PANDEY, K. A.; Microbial metabolites as eco-friendly agrochemicals for the next millennium. **Applied Microbiology and Biotechnology**; v. 55, p. 395 – 403, 2001.

SHARMA, R. R.; SINGH, D.; SINGH, R. Biological control of postharvest diseases offruits and vegetables by microbial antagonists: A review. **Biological Control**, v.50, p. 205-221, 2009.

SILVA, M. C. C.; BRAUN, H.; COELHO, F. S. Manejo e controle de plantas daninhas na cultura da batata. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v.1, n.1, p. 60-67, Julho, 2011.

SLATER, A.; FOWLER, M.R.; SCOTT, N.W. **Plant biotechnology.** 2ª ed. Oxford University Press, 2008. 400p.

SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO (SOSBAI). **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil.** Gravataí: SOSBAI, 2012. 179p.

SUTTIE, J. M.; REYNOLDS, S.G.; BATELLO, C. Grasslands of the world. Rome: FAO - Food and Agriculture of the United Nations, **Plant Production and Protection**, v. 34, 2005. 514 p.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA. **Foreign Agricultural Service.** Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdQuery.aspx>>. Acesso em: 01 out. 2013.

VYVYAN, J. R.; Allelochemicals as leads of new herbicides and agrochemicals. **Tetrahedron**; v. 58, p. 1631-1646, 2002.