

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ”**

***Streptomyces spp. como potencial agente bio-herbicida contra
Spermacoce verticillata, Eleusine indica e Lolium multiflorum***

Suzani Maria Rodrigues da Paz

Trabalho de conclusão de curso apresentado
como parte dos requisitos para obtenção do título
de: Bacharela em Ciências Biológicas pela
Universidade de São Paulo

**PIRACICABA
2020**

Suzani Maria Rodrigues da Paz

***Streptomyces spp. como potencial agente bio-herbicida contra Spermacoce
verticillata, Eleusine indica e Lolium multiflorum***

Orientador:

Prof. Dr. SERGIO FLORENTINO PASCHOLATI

Trabalho de conclusão de curso como parte dos
requisitos para obtenção do título de Bacharela em
Ciências Biológicas pela Universidade de São
Paulo

PIRACICABA

2020

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha família que me deu todo apoio e suporte durante esses anos de graduação. Aos meus pais, Maria de Lourdes e Vanildo, por toda luta e batalha para conseguirem que sua filha estudasse em uma universidade pública, e por saberem que os dias de choro e saudade valeriam a pena. Aos meus irmãos Abner e Suelen que, mesmo de longe sempre me ajudaram e me deram todo carinho. Obrigada por todo amor!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter guiado sempre o meu caminho e me dado conforto no coração. Agradeço a todos que passaram por minha vida durante esses anos de universidade, pois acredito que me tornei o que sou hoje devido às experiências que vivi com aqueles que convivi.

Agradeço aos meus pais Maria de Lourdes e Vanildo e os meus irmãos Suelen e Abner por todo suporte e amor nesses anos longe.

Agradeço imensamente o Prof Dr Sergio Pascholati pela oportunidade todos esses anos de estágio, muito aprendi durante esse período. Também agradeço a todos os amigos que tive a oportunidade de encontrar no laboratório: Wesler, Sabrina, Tainara, Samuel, Victor, Ruan, Dayson, Janaína, Daniele, Mariana, Abel, Natalia, Dablieny, Ronaldo, Sophia, Bruno, João e Pedro. Cada um foi importante na minha caminhada até aqui e os levarei para sempre no meu coração. Agradeço também ao Prof Dr. Ray Hammerschmidt que me acolheu em seu laboratório na Michigan State University por seis meses, assim como todos os colegas e amigos que ali tive a oportunidade de conviver.

Agradeço a todos os grupos de estágio de qual fiz parte ao longo desses anos e que contribuíram enormemente para minha formação como educadora e como bióloga.

Agradeço a todos os amigos que fiz na biologia, a convivência com vocês me fez olhar o mundo de uma forma melhor e mais bonita. Agradeço em especial Gian Silva, Thamires Brito, Barbara Moraes, Angelica Borges, Mariana Pariz e Paulo Antonio pelas experiências que a amizade de vocês me trouxe.

Agradeço as pessoas que foram minha segunda família na ESALQ e que levarei por toda a vida, em especial Thais Tamashiro, Wanderson Santos, Alexander Gonella e Fernando Hideki.

Agradeço também a Casa do Estudante Universitário (CEU) que me acolheu, que foi minha casa e que me permitiu conviver com pessoas incríveis e inspiradoras. Todos os amigos que aqui fiz foram muito importantes na minha caminhada. Levarei o nome dessa casa com enorme carinho no meu coração.

Agradeço aos pesquisadores Me. Abel Torres, Me. Samuel de Paula, Me. Sabrina Holz e Dr. Victor Souza por aceitarem fazer parte da minha banca e poderem contribuírem para a melhoria deste trabalho.

Por fim, gostaria de agradecer a Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-ESALQ/USP, escola que muito contribuiu para meu crescimento profissional e da qual levarei seu nome.

EPÍGRAFE

*“Não sei... se a vida é curta
ou longa demais para nós,
Mas, sei que nada do que vivemos
tem sentido,
se não tocamos o coração das pessoas.*

*Muitas vezes basta ser:
colo que acolhe,
braço que envolve,
palavra que conforta,
silêncio que respeita,
alegria que contagia,
lágrima que corre,
olhar que acaricia,
desejo que sacia,
amor que promove.*

*E isso não é coisa de outro mundo,
é o que dá sentido à vida.*

*É o que faz com que ela
Não seja nem curta,
nem longa demais,
mas que seja intensa,
verdadeira e pura
enquanto ela durar...”*

Cora Coralina

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Definição e relevância	12
1.2 Justificativa	13
1.3 Objetivos	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 O Controle Biológico	15
2.2 <i>Streptomyces</i> spp. como agente de controle biológico	16
2.3 O Manejo de Plantas Daninhas	17
2.4 Os danos na produção agrícola	18
2.5 O controle biológico de plantas daninhas com o uso de microrganismos	22
2.6 Daninhas de importância econômica	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Obtenção dos isolados	27
3.2 Coleção dos isolados bacterianos	28
3.3 Obtenção do inoculo de bacteriano	28
3.4 Teste de verificação do potencial da ação herbicida	28
3.4.1 Potencial da ação herbicida na germinação - <i>in vitro</i>	28
3.4.2 Potencial ação herbicida pós emergente em casa de vegetação- <i>in vivo</i>	29
3.5 Verificação da seletividade na germinação de sementes de soja	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Coleção Bacteriológica	31
4.2 Teste de germinação de sementes de daninhas <i>in vitro</i>	33
4.3 Influência das preparações no desenvolvimento das daninhas em condições de casa de vegetação	40
4.4 Seletividade para a cultura de soja	45
4.5 Considerações finais	47
5. CONCLUSÃO	48
6. PESQUISAS FUTURAS	48
7. REFERÊNCIAS	49
APÊNDICES	56

RESUMO

O uso do controle biológico na agricultura vem crescendo显著mente nos últimos anos, devido suas vantagens para uma produção agrícola mais sustentável, com menos impactos e com menor quantidade de resíduos químicos deixados no ambiente. Apesar do crescimento do mercado de biológicos ser de 10% ao ano no mundo e 15% ao ano no Brasil, poucos produtos com caráter bio-herbicida estão disponíveis como produtos comerciais. A ocorrência de plantas daninhas no campo é um fator de grande preocupação, visto que a sua presença pode aumentar significativamente os custos de produção, ocasionando assim diversos prejuízos para o produtor. Ainda, recentemente, o aumento no registro de plantas resistentes aos herbicidas químicos pressiona o mercado de biológicos para o desenvolvimento de bio-herbicidas. O presente trabalho testou o potencial de quinze isolados da bactéria *Streptomyces* spp. no controle de *Spermacoce verticillata* (vassourinha-de-botão), *Eleusine indica* (capim-pé-de-galinha) e *Lolium multiflorum* (azevém), daninhas encontradas em campos de soja que apresentam dificuldades no controle. Experimentos *in vitro* demonstraram que oito isolados (LFBF1901, LFBF1903, LFBF1906, LFBF1909, LFBF1912, LFBF1913, LFBF1926 e LFBF1928) tiveram efeito inibitório da germinação de sementes das daninhas maior que 75%, sendo estatisticamente semelhantes à inibição obtida com o herbicida químico Roundup. Experimentos em casa de vegetação demonstraram um potencial controle pós-emergência de dois isolados (LFBF1926 e LFBF1909) em *L. multiflorum*. Testes de seletividade em soja também demonstraram que os isolados com potencial ação herbicida não influenciam negativamente na germinação dessa cultura. Conclui-se que os dados obtidos apontam para um potencial uso de isolados de *Streptomyces* spp. no controle de plantas daninhas presentes em campos de soja.

Palavras-chave: controle biológico, daninhas, bactéria, bio-herbicida

Streptomyces* spp. as potencial bio-herbicide agente agaisnt *Spermacoce verticillata*, *Eleusine indica* and *Lolium multiflorum

ABSTRACT

Nowadays, the use of biological control in the agriculture has increased significantly, due to its advantages related to a more sustainable production, reducing environmental impacts and chemical residues. Although the biological market reaches 10%/year globally and 15%/year in Brazil, just a few bio-herbicides products are available. The occurrence of weeds in the field is a factor of big concern among the farmers since their presence can increase production costs. Additionally, the recent expansion of herbicide-resistant plants pushes the biological market for the development of new bio-herbicides products. This study aims to test fifteen isolates of the *Streptomyces* sp bacteria as potential biological agent to control *Spermacoce verticillata* (vassourinha-de-botão), *Eleusine indica* (capim-pé-de-galinha) e *Lolium multiflorum* (azevém), a weed problem in soybean fields. *In vitro* tests have shown that eight isolates (LFBF1901, LFBF1903, LFBF1906, LFBF1909, LFBF1912, LFBF1913, LFBF1926 and LFBF1928) were efficient in germination inhibition by at least 75% of those three selected weeds, being statistically similar to the inhibition by the herbicide Roundup inhibition. Greenhouse tests showed the potential post-emergence control by two bacterial isolates (LFBF1926 and LFBF1909) on *L. multiflorum*. Selectivity tests on soybean crops were also carried out and it was shown that the isolates did not have any negative effect on seed germination. In conclusion, the obtained data suggest a potential use of *Streptomyces* spp. isolates to control weeds in soybean fields.

Key-words: biological control, weed, bacteria, bio-herbicide

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Número de casos registrados de daninhas resistentes ao longo do tempo	20
Figura 2 Estimativa do aumento percentual do custo de produção no controle de plantas daninhas	21
Figura 3 Isolados da coleção bacteriológica.....	33
Figura 4 Germinação de <i>S. verticillata</i> <i>in vitro</i> após tratamento com diferentes isolados.....	39
Figura 5 Germinação de <i>E. indica</i> <i>in vitro</i> após tratamento com diferentes isolados	39
Figura 6 Germinação de <i>L. multiflorum</i> <i>in vitro</i> após tratamento com diferentes isolados ...	40
Figura 7 Plantas de <i>S. verticillata</i> após inoculação em solo	41
Figura 8 Plantas de <i>S. verticillata</i> após inoculação em folha	42
Figura 9 Plantas de <i>L. multiflorum</i> após inoculação em solo com LFBF1909 e LFBF1926 .	44
Figura 10 Plantas de <i>L. multiflorum</i> após inoculação em folha com LFBF1909 e LFBF1926	44
Figura 11 Germinação em sementes de soja após tratamento <i>in vitro</i>	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Lista de exemplos de alguns produtos biológicos com efeito herbicida já desenvolvidos no mundo	23
Tabela 2 Dados gerais dos isolados da coleção bacteriológica obtida. Caracterização* dos isolados bacterianos feita com a utilização de microscopia de luz com observação do crescimento em meio de cultura sólido	32
Tabela 3 Média de germinação de sementes* de daninhas <i>in vitro</i> após tratamento com diferentes isolados de actinomicetos. Repetição do experimento, foi nomeada como E1 e E2= ensaio 1 e ensaio 2, respectivamente	35
Tabela 4 Percentagem da média de germinação de sementes* de daninhas <i>in vitro</i> após tratamento com diferentes isolados de actinomicetos. Repetição do experimento nomeada como E1 e E2= ensaio 1 e ensaio 2, respectivamente.....	36
Tabela 5 Percentual de inibição de germinação (-) de sementes de daninhas em relação ao controle água (+)* <i>in vitro</i> após tratamento com diferentes isolados de actinomicetos. Repetição do experimento nomeada como E1 e E2= ensaio 1 e ensaio 2, respectivamente37	
Tabela 6 Percentagem de inibição da germinação <i>in vitro</i> de sementes de daninhas expressa em escala de cores*. E1 e E2 correspondem aos ensaios 1 e 2, respectivamente	38
Tabela 7 Média massa (g) fresca e seca da parte aérea de <i>S. verticillata</i> após 7 dias da inoculação no solo e na folha. S= suspensão não autoclavada e A= suspensão autoclavada	41
Tabela 8 Média massa (g) fresca e seca da parte aérea de <i>L. multiflorum</i> após 7 dias de inoculação no solo e na folha com o isolado IBSBF2507*	42
Tabela 9 Média massa (g) fresca e seca da parte aérea de <i>L. multiflorum</i> com 7 dias após inoculação com LFBF1909* e LFBF1926*	43
Tabela 10 Dados do comportamento observado em cada espécie de daninha em relação ao seu desenvolvimento <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	45
Tabela 11 Média de germinação e anormalidades* de sementes de soja em um total de 25 sementes após 7 dias da inoculação com os isolados LFBF 1903, LFBF1913, LFBF1926 e LFBF1909	46

1. INTRODUÇÃO

1.1 Definição e relevância

O controle biológico é uma ferramenta de manejo que traz um caráter ambientalmente mais sustentável, podendo ser utilizado como alternativa ou como complemento para outros métodos de manejo. Podem ser consideradas daninhas àquelas plantas que crescem em locais não desejáveis, sendo que a sua presença afeta negativamente o ambiente onde se encontram (LORENZI, 2008). A origem das plantas daninhas pode ser atribuída ao momento em que o homem iniciou suas atividades de domesticação das plantas de interesse, também chamadas de plantas úteis.

Desde muito tempo, as daninhas são consideradas pragas de grande importância econômica e ambiental no mundo inteiro. Sua ocorrência na agricultura, por exemplo, pode reduzir a qualidade das plantas cultivadas devido a ocorrência de competição por água, nutrientes e luz, elementos essenciais para o desenvolvimento das plantas (TE BEEST et al., 1992). Essa situação gera perdas econômicas em dois principais aspectos: um grande aumento no custo de produção da cultura, e a perda na produtividade devido às reduções de 30-40% (LORENZI, 2008). O controle largamente utilizado atualmente para o manejo de daninhas no campo envolve o uso de herbicidas químicos. No Brasil, no ano de 2017, o uso de herbicidas representou aproximadamente 62% do uso total dos insumos agrícolas (FAO, 2020), o que reflete ainda mais as dificuldades enfrentadas pelos agricultores no manejo das daninhas. É preciso destacar, no entanto, que o uso desse método vem enfrentando alguns impasses, como por exemplo, o significativo aumento no aparecimento de casos de resistência na última década (HEAP, 2020). O número de casos é uma consequência, sobretudo, do uso intensivo dos herbicidas, como é o caso do glifosato considerado o herbicida de maior preocupação no momento (CHRISTOFFOLETI, 2016). Atualmente, foram registrados no mundo 512 casos de resistência de plantas daninhas, sendo que o país de maior ocorrência envolve o Estados Unidos da América (EUA), com 165 casos registrados. O Brasil ocupa a quinta posição, com 50 casos registrados (HEAP, 2020). Quando há ocorrência de uma espécie vegetal resistente no campo, o custo de produção pode aumentar 48%, podendo chegar a um aumento de até 403% quando há ocorrência de duas ou mais espécies concomitantemente (ADEGAS et al., 2017). Além da problemática

relacionada à economia, atualmente, há uma enorme exigência da sociedade em relação à produção de alimentos de maneira mais sustentável e saudável tanto para o ambiente quanto para o ser humano. A utilização de compostos químicos na agricultura deixa resíduos no solo, na água, nos alimentos e ainda pode ocasionar acidentes entre aqueles que os manuseiam (ANVISA, 2019; FIOCRUZ, 2014; STEFFEN; STEFFEN; ANTONIOLLI, 2011). Quando se pensa em uma produção sustentável, é válido lembrar que o “sustentável” vai além das práticas que tangem somente o presente, elas também necessitam ser pensadas a longo prazo. Isso é bem explorado na declaração do Relatório de Brundtland, escrito pela Comissão Mundial sobre o Meio Ambiente e o Desenvolvimento: “O desenvolvimento sustentável é o desenvolvimento que vai de encontro às necessidades atuais sem comprometer a habilidade das gerações futuras de atender suas próprias necessidades” (BRUNDTLAND, 1987).

1.2 Justificativa

Em um momento em que o método mais utilizado para controle, o químico, tem se tornado menos eficiente e seu uso exagerado ocasionado debates quanto à segurança na saúde, algumas alternativas vêm sendo necessárias. Além do controle em si, as boas práticas agrícolas são essenciais para a desaceleração do processo de surgimento de novas plantas resistentes aos herbicidas. Dentre elas, estão os princípios do “Manejo Integrado de Plantas Daninhas” (MIPD), que inclui a utilização do controle biológico como complemento das ferramentas de manejo (OLIVEIRA, M. F. DE; BRIGHENTI, 2018; CARVALHO; ROSSI, DEMANT, 2019). O controle biológico, nos últimos anos, vem ganhando bastante popularidade. Houve um grande aumento do número de estudos conduzidos, assim como o aumento na utilização de produtos biológicos pelos produtores rurais. No ano de 2018, o mercado de biológicos cresceu 77% no Brasil, sendo o país de destaque nesse mercado, com crescimento de cerca de 15% ao ano, enquanto que outros países crescem apenas 10% (CROPLIFE, 2020). O uso de fitopatógenos como agentes de controle têm sido bastante documentado em artigos científicos, no entanto, apesar da tendência de aumento no mercado, poucos produtos biológicos de ação herbicida são comercializados. Os produtos mais conhecidos no exterior são o DeVine® (*Phytophthora citrophthora*) usado para o controle de *Morrenia odorata* em citrus, e o

Collego[®], a base de *Colletotrichum gloeosporioides*, usado no controle de *Aeschynomene virginica* em arroz e soja (TE BEEST et al., 1992). Adicionalmente, em 2013, nos EUA foi lançado pela empresa Marrone Bio Inovation, o bio-herbicida Opportune[®], que tem como base do produto a Taxtomina A, um metabólito secundário oriundo da bactéria *Streptomyces* spp. O mesmo foi registrado para diversas plantas alvo sendo recomendado tanto para uso pré-emergência quanto pós-emergência (MARRONE, [s.n]).

Neste sentido, há uma grande necessidade de pesquisas que visem a utilização do controle biológico no manejo de daninhas, principalmente no Brasil, onde ainda não há nenhum produto comercial disponível. Ademais, o gênero *Streptomyces* vem mostrando-se bastante promissor para esse uso.

1.3 Objetivos

Tendo em vista o cenário explanado acima, esse trabalho tem como objetivo geral analisar o potencial da bactéria *Streptomyces* spp. como agente de controle biológico em daninhas de comum ocorrência em campos de soja e que vêm apresentando dificuldades no manejo e controle. Para tal, experimentos foram conduzidos com três espécies de daninhas, a saber *Lolium multiflorum*, *Eleusine indica* e *Spermacoce verticillata*, que tiveram registros de resistência nos últimos anos no Brasil e têm causado preocupação entre os agricultores (CORDEAU et al., 2016; HEAP, 2020).

Por sua vez, dentre os objetivos específicos temos:

- Isolar e manter uma coleção de *Streptomyces* spp;
- Avaliar o efeito de isolados do actinomiceto na germinação das daninhas *in vitro*;
- Avaliar o efeito de isolados do actinomiceto na pós-emergência das daninhas *in vivo*;
- Avaliar o efeito de isolados do actinomiceto na germinação de sementes de soja *in vivo*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Controle Biológico

O controle biológico vem sendo utilizado na agricultura há décadas, sendo que os primeiros casos registrados que obtiveram sucesso ocorreram entre 1890 e 1900 com o projeto conduzido na Califórnia, EUA, no controle de *Icerya purchasi* em citros (VAN DEN BOSCH et al., 1982), desde então, diferentes definições para esse tipo de controle foram criadas. De acordo com SMITH (1919), controle biológico é quando ocorre o uso de parasitas e/ou predadores para o controle de pragas. Já para HARRIS (1991), o termo é definido como “todos os tipos de controles não-químicos”, o que inclui não apenas os agentes biológicos, mas também os produtos que deles são derivados, como por exemplo, os metabólitos secundários produzidos por microrganismos.

O controle biológico pode ser vantajoso em diversos aspectos como, por exemplo: 1. Tem a vantagem de possuir diversos mecanismos de ação envolvidos (inibição da produção de cloroplasto, interferência na produção de ATP, redução do desenvolvimento vegetal, por exemplo); 2. Possui pouca pressão de seleção, pois não utiliza apenas um mecanismo de ação específico; 3. É uma ferramenta que possibilita que os agentes de controle se estabeleçam no campo, sem a necessidade de constantes aplicações; 4. É uma opção quando o uso de produtos químicos ou alternativas genéticas não são viáveis; 5. Pode ser utilizado quando há exigências de redução dos resíduos químicos nos produtos alimentares; 6. Auxilia na recomposição da biodiversidade do local (MEDEIROS; SILVA; PASCHOLATI, 2018).

De acordo com dados publicados pela ABCBio - Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico, o controle biológico no Brasil se iniciou em 1921, com o controle da cochonilha-de-escama-branca do pêssego (*Pinnaspis aspidistrae*) através da utilização do inseto *Prospaltella berlesei*. Atualmente, dentre os produtos biológicos já registrados no Brasil, os mais comuns são: os agentes macrobiológicos (ácaros, insetos e nematóides), microbiológicos (vírus, bactérias e fungos), os semioquímicos (feromônios) e os bioquímicos (hormônios). Todos os produtos comercializados para a agricultura, que possuem um caráter biológico devem, primeiramente, passar pela aprovação de órgãos regulamentadores. O processo de registro e regulamentação no Brasil é conduzido por três principais

órgãos: Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), os quais avaliam o efeito do produto em relação ao impacto ambiental, impacto à saúde humana e a sua eficiência agronômica.

No final do ano de 2019, um total de 231 produtos biológicos comerciais estavam presentes na lista de registrados no Brasil, sendo que, dentre eles, 40 produtos à base de bactérias, 88 à base de fungos, 1 à base de bactéria combinado com fungo, 19 à base de vírus, 43 à base de insetos, 10 à base de ácaros, 1 à base de nematóides, 19 à base de feromônios, 1 à base de hormônios, 8 à base de extratos vegetais e 1 à base de rocha (ABC BIO, 2020). Com isso, é notável o crescimento na área de biocontrole no Brasil e no mundo, principalmente na área de proteção de plantas.

Há também uma grande vantagem econômica no uso dos produtos biológicos, uma vez que o seu custo de desenvolvimento e produção é bem inferior ao custo envolvido no desenvolvimento de um produto químico. Os custos necessários desde a pesquisa e desenvolvimento até o lançamento de uma nova molécula química pode chegar a U\$ 250 milhões, enquanto que para um produto biológico, os custos variam entre U\$ 2 milhões e U\$ 10 milhões (JUNIOR, 2015).

2.2 *Streptomyces* spp. como agente de controle biológico

Streptomyces spp. são bactérias gram-positivas, filamentosas capazes de produzir diversos tipos de cadeias de esporos. As cadeias de esporos são estruturas formadas por hifas aéreas de formatos diferentes, que são características usadas para taxonomia: as cadeias podem ser retas, espiralada ou flexuosas (SCHAAD et al., 2001). *Streptomyces* é um actinomiceto bem adaptado em ambientes de solo devido a sua alta capacidade de se estabelecer em diferentes condições ambientais, como pH ácidos e falta de nutrientes, assim como possui alta capacidade de produzir um diverso número de metabólitos secundários, os quais são capazes de degradar polímeros e/ou atuar como antibióticos contra outros microrganismos presentes no ambiente (SCHAAD et al., 2001). Esse gênero tem sido bastante estudado devido à sua utilização na área farmacológica e na fitopatologia. Na farmacologia, *Streptomyces* spp. é um dos principais organismos utilizados na

produção de antibióticos sendo, atualmente, intensamente estudado como alternativa para a produção de novos antibióticos em combate às bactérias que vêm apresentando resistência aos antibióticos tradicionais. Ainda, o gênero *Streptomyces* possui um papel ecológico bastante interessante, atuando na reciclagem natural de componentes da parede celular de plantas e fungos. Acredita-se que *Streptomyces* tenha se originado à 400 milhões de anos e que, devido a sua atuação na decomposição das plantas primitivas, a bactéria teve um papel bastante importante na formação dos solos (CHATER, 2016). Na fitopatologia, este gênero é considerado o principal patógeno da doença chamada Sarna Comum, ocasionada em tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*) e em outras culturas como cenoura e nabo (SCHAAD et al., 2001). A patogenicidade dessa bactéria está bastante relacionada a sua capacidade de produzir um metabólito secundário chamado taxomina, que auxilia na infecção da bactéria no vegetal (LORIA et al., 2006). A taxomina A é a classe de metabólito secundário produzido em grande abundância, principalmente por *Streptomyces scabies*, com fórmula molecular $C_{22}H_{22}N_4O_6$. Essa fitotoxina também vem sendo separadamente estudada por demonstrar potencial na ativação de mecanismos de defesa em plantas (LERAT et al., 2009). Adicionalmente Garcia et al. (2008) demonstrou que esta fitotoxina foi capaz de induzir resistência em plantas de sorgo contra o fitopatógeno *Colletotrichum lagenarium* (sin. *arbiculare*) e em fumo contra *Colletotrichum gloesporioides* (GARCIA et al., 2008), assim como em pepineiro contra TMV- Vírus do mosaico do tabaco (PINTO, 2014). Os resultados obtidos em 2008, por, Garcia&Pascholati, propiciaram o pedido de patente PI0802664-5 A2 junto ao Instituto Nacional da Propriedade Intelectual (INPI)- Ministério do Desenvolvimento, Indústria e do Comércio Exterior.

2.3 O Manejo de Plantas Daninhas

Assim como descrito no tópico anterior, o conceito de Plantas Daninhas também possui algumas divergências quanto a sua definição. As definições podem permear desde afirmações mais simples como “qualquer planta que não seja a cultura” (BRENCHLEY, 1920) até definições mais filosóficas, como “qualquer planta cujas virtudes não tenham sido ainda descobertas”, como dito pelo escritor filósofo Ralph Waldo Emerson (1978). Neste trabalho, a definição utilizada será a da “Weed Science Society of America” (WSSA), a qual estabelece que planta daninha “é

qualquer planta que esteja interferindo nas atividades ou bem estar do homem" (WSSA, 2020). Ainda, é comum que daninhas sejam caracterizadas pela sua facilidade de reprodução, dispersão e de estabelecimento no ambiente, sua capacidade de se desenvolver em condições adversas de clima, solo e de baixos níveis de nutrientes. Esses fatores contribuem para a dificuldade de manejo dessas plantas indesejadas.

Pode-se dizer que a sua origem se deu antes da domesticação de plantas silvestres de interesse humano. As plantas silvestres possuíam agressividade necessária para que a presença de uma não ocasionasse prejuízo no desenvolvimento da outra. No entanto, na tentativa de se melhorar a eficiência no desenvolvimento das plantas de interesse, o resultado da domesticação foi a seleção de plantas cultivadas menos agressivas quanto às modificações do ambiente, ocasionando assim prejuízos no seu desenvolvimento quando há a presença de daninhas (LORENZI, 2008).

É importante ressaltar que plantas daninhas podem ocorrer e interferir em diferentes ambientes e em diferentes localidades como áreas agrícolas, florestais, pecuárias, ornamentais, náuticas, áreas de produção de energia ou áreas urbanas, afetando assim a atividade humana neste local onde elas se encontram. De forma geral, as daninhas possuem um conceito exclusivamente negativo, porém, é de grande importância enfatizar que, assim como qualquer outra praga, ela só é prejudicial devido aos hábitos humanos de interesse prevalentes em determinado ambiente. A ocorrência elevada de pragas é um resultado dos desequilíbrios ocasionados pela ação do homem em um determinado ambiente, seja ele pela mudança do uso da terra ou pela introdução de espécies exóticas (OLIVEIRA et al., 2018).

2.4 Os danos na produção agrícola

Na agricultura, existem diversos fatores que contribuem negativamente na produtividade de culturas no campo e, dentre eles, pode-se citar a ocorrência de plantas daninhas como um fator de grandes preocupações econômicas. Ao se desenvolverem no mesmo espaço que as culturas de interesse, as plantas daninhas podem interferir de maneira negativa através da competição, alelopatia e hospedabilidade de fitopatógenos (VASCONCELOS et al., 2012). Na competição, a

daninhas podem disputar por recursos como água, luz, nutrientes e espaço, limitando a capacidade integral de desenvolvimento da cultura. Já com a alelopatia, algumas espécies de plantas são capazes de liberar substâncias químicas fitotóxicas que exercem efeitos de inibição de germinação de sementes, falta de vigor vegetativo, atrofamento de raízes, entre outros danos. Adicionalmente, plantas daninhas também podem ser hospedeiras alternativas de pragas e doenças e podem dificultar o manejo, a colheita e a qualidade da planta cultivada. Todos esses fatores acabam contribuindo para um aumento no custo de produção e diminuição do valor comercial do produto agrícola (VASCONCELOS et al., 2002).

Os métodos utilizados para o manejo de plantas daninhas podem variar de acordo com a necessidade do produtor, com a capacidade de resposta da espécie, com a associação entre a cultura plantada e a daninha de ocorrência, entre outros. Dentre as diferentes ferramentas utilizadas estão: manejo preventivo, controle cultural, controle mecânico, controle físico, controle biológico e controle químico, sendo que este último, é tido como o mais utilizado globalmente (OLIVEIRA et al., 2018). Os herbicidas ácidos, como é o caso do 2,4-D ou ácido 2,4-diclorofenoxyacético, são os herbicidas mais utilizados no mundo. A sua larga aplicação se deu após a guerra do Vietnã, quando foi usado como desfolhante pela força aérea dos EUA que, desde então, vem substituindo o manejo manual e mecânico (AMARANTE et al., 2003). Outro herbicida largamente utilizado é o glifosato, um herbicida não seletivo, efetivo em monocotiledôneas e dicotiledôneas (ROMAN et al., 2005).

No entanto, o uso massivo dos herbicidas químicos como uma moderna técnica de manejo, acarretou na seleção de plantas resistente aos produtos químicos. Isso se tornou um enorme desafio na Ciência das Plantas Daninhas, visto que um considerável número de plantas resistentes é encontrado hoje no campo. A resistência pode ocorrer devido às mudanças fisiológicas, morfológicas, fenológicas ou bioquímicas das plantas, sendo mais comum às modificações dos sítios de ação dos herbicidas (CHRISTOFFOLETI et al., 1994).

De acordo com os dados publicados pela Weed Science (WSSA), os primeiros relatos de resistência no mundo ocorreram na década de 50 no Canadá, Havaí e Estados Unidos, sendo as daninhas identificadas como resistentes ao herbicida 2,4-D. Desde então, os casos vêm aumentando显著mente, principalmente a

partir da década de 1980, conforme aponta o gráfico da Figura 1. Atualmente, existem 512 casos de resistência registrados no mundo, que diz respeito tanto as resistências às diferentes espécies quanto aos diferentes modos de ação. Mais especificamente, a resistência atinge 262 espécies diferentes, sendo 152 dicotiledôneas e 110 monocotiledôneas; atinge entre 23-26 sítios de ação e 167 diferentes herbicidas. Casos de resistência já foram registrados em 70 países e já foram reportados em 92 culturas. No Brasil, os primeiros relatos de resistência foram em 1993, com 50 casos registrados até o momento, em diversos sítios de ação, inclusive casos de múltipla resistência (HEAP, 2020).

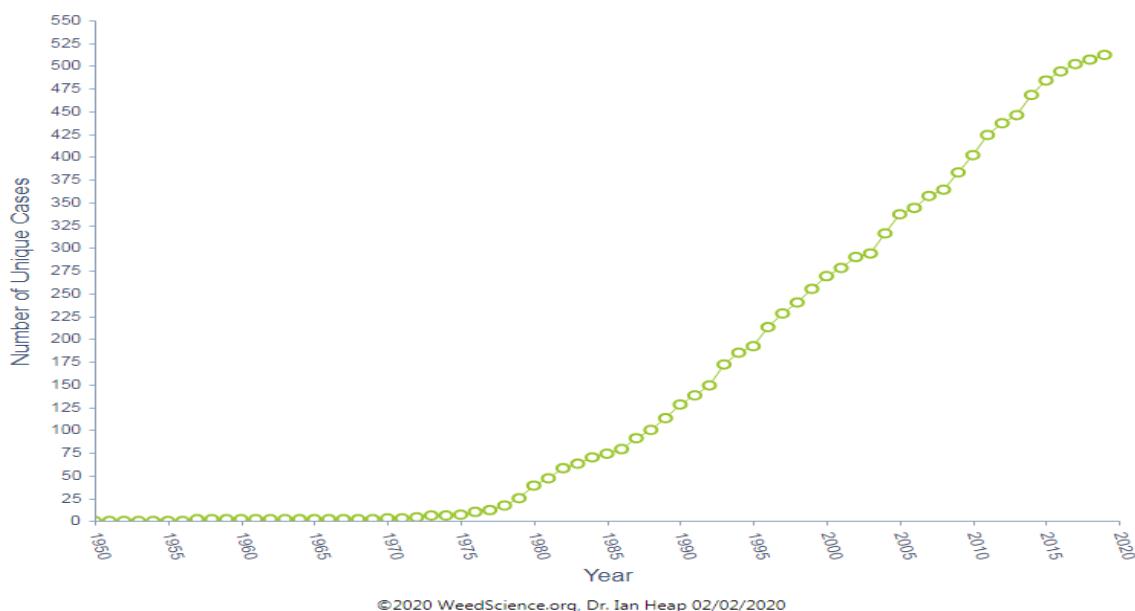


Figura 1 Número de casos registrados de daninhas resistentes ao longo do tempo (HEAP, 2020)

O aparecimento de resistência vem ocasionando grandes perdas econômicas, pois se torna necessária a utilização de medidas alternativas ao controle químico, gerando gastos adicionais. De acordo com dados da EMBRAPA SOJA, os custos com o manejo de daninhas em áreas de maior dificuldade de controle, decorrentes da resistência, podem aumentar em cerca de 125%, 148% e 290% com buva, azevém e capim-amargoso, respectivamente (Figura 2). Ainda, o estudo apontou que o aumento do custo médio de produção no Brasil, ocasionado pelo aparecimento de resistência no campo, apenas na cultura de soja é de quase R\$ 5

bilhões ao ano, podendo chegar a um valor de R\$ 9 bilhões dependendo das condições de mato competição (ADEGAS et al., 2017).

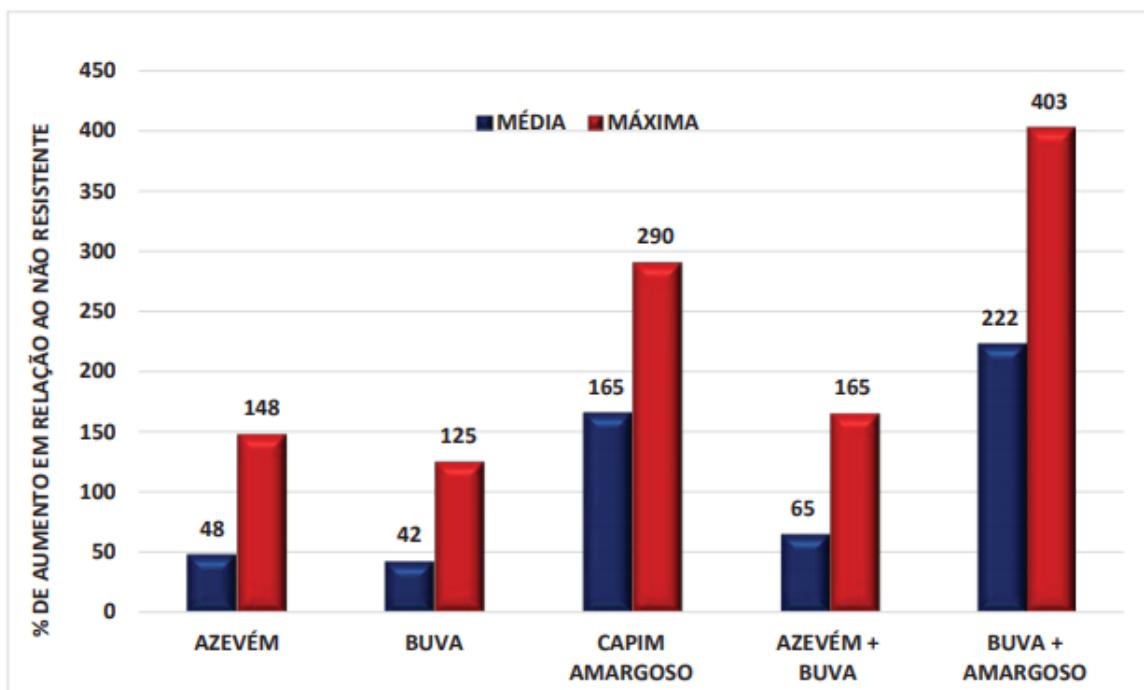


Figura 2 Estimativa do aumento percentual do custo de produção no controle de plantas daninhas (R\$/ha), em áreas de soja com presença de diferentes populações de plantas daninhas aos inibidores da EPSPs (glifosato), comparado a áreas sem resistência (ADEGAS, 2017)

Tendo em vista esse cenário, é de suma importância a busca por novas alternativas que não o controle químico, o qual já vem demonstrando falhas na efetividade. Não só o uso repetido do químico, mas também o manejo na cultura e a sua associação com a monocultura são fatores que ampliam as chances do estabelecimento de resistência (CHRISTOFFOLETI et al., 1994). Para tal, alternativas devem ser consideradas. Para tal, alternativas devem ser consideradas visando uma maior efetividade no controle. Sendo assim, é recomendado que sejam empregados os princípios do Manejo Integrado de Plantas Daninhas (MIPD), os quais visam a utilização de uma combinação de ferramentas de controle (GOMES JR.; CHRISTOFFOLETI, 2008). Essa combinação também permite que haja maior interação inter-espécies, resultando em um maior equilíbrio das populações das pragas, além de diminuir os resíduos químicos deixados no ambiente que podem prejudicar o ambiente, contaminar alimentos e ainda causar fitotoxicidade em espécies sensíveis, como soja e feijão (SANTOS et al., 2013). Também é importante salientar que o controle de daninhas no MIPD não necessariamente visa a

erradicação da praga por completo, mas sim a sua redução até valor abaixo do nível de dano econômico (NDE), ou seja, uma limiar proposta entre a estabilidade de produção e a perda de produção. Esse valor representa o número de pragas que causam custos superiores ou equivalentes aos custos do seu controle - o seu custo benefício (KALSING; VIDAL, 2010).

2.5 O controle biológico de plantas daninhas com o uso de microrganismos

Uma das ferramentas alternativas para o manejo de daninhas é o controle biológico. Os agentes de controle biológico podem atuar no controle das plantas daninhas através de danos causados em suas raízes ou folhas, de forma que comprometam o sistema de transporte e transformação de energia da planta (WSSA, [s.d.]). Um bioproduto destinado ao controle de plantas daninhas é também conhecido como bioherbicida e, para assim ser classificado, deve apresentar algumas características essenciais, como: 1. Produzir fitotóxico na daninha de interesse; 2. Deve ser seletivo para uma cultura, ou seja, apesar de ser fitotóxica para a daninha, não deve apresentar nenhum dano para a cultura de cultivo; 3. Deve ter considerável solubilidade em água; 4. 3. Deve causar baixos impactos ambientais; 5. Não deve contaminar alimentos (TREMACOLDI, 2006).

O início do uso de fungos no controle biológico de daninhas se deu em 1971, com a utilização do fungo *Puccinia chondrilla*, introduzido na Austrália para controlar *Condrilla juncea* (KLAIC et al., 2015). Desde então, diversos fungos têm sido utilizados para o controle biológico de plantas daninhas globalmente, destacando-se os fungos *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps*, *Alternaria*, *Phoma* e *Diplodia*. Além disso, atualmente, substâncias alelopáticas, derivadas tanto de plantas quanto de microrganismos, são utilizadas para a formulação de bioherbicidas e, dentre elas, pode-se citar àquelas pertencentes as classes de terpenos, alcalóides, fenóis, esteroides, cumarinas, entre outros. Alguns exemplos destes são: anisomycin (isolado de *Streptomyces* spp.)- cineole (isolado de plantas) e ácido quinolico (derivado de *Nicotiana tabacum*) (GALON et al., 2016).

Dentre todos os produtos de biocontrole registrados no mundo, somente 10% deles correspondem aos produtos com efeito herbicida (CORDEAU et al., 2016), sendo apenas treze bioherbicidas registrados, que não necessariamente continuam

disponíveis para comercialização nos dias atuais. A tabela abaixo (Tabela 1) demonstra com mais detalhes alguns dos bioherbicidas e também indica se eles estão ou não disponíveis no mercado atualmente:

Tabela 1 Exemplos de alguns produtos biológicos com efeito herbicida já desenvolvidos no mundo

Produto	País	Data	Organismo	Planta alvo
Devine Collego	USA	1986	<i>Phytophthora palmivora</i>	<i>Morrenia odorata</i>
BioMal	USA	1982	<i>Colletorichum gloeosporioides</i>	N.A
Woad Warrior	Canada	1992	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>f.sp malvae</i>	<i>Malva pusilla</i>
Mycotech	USA	2002	<i>Puccinia thlaspeos</i>	<i>Isatis tinctoria</i>
Smoulder	Canada e USA	2002 e 2005	<i>Chondrostereum purpureum</i>	<i>Prunus serotine e Populus euramericana</i>
Sarritor	USA	2005	<i>Alternaria destruens</i>	<i>Cuscuta spp.</i>
Phoma	Canada	2010	<i>Sclerotinia minor</i>	Dicotiledôneas
MBI-005 EP	Canada e USA	2011 e 2012	<i>Phoma macrostoma</i>	Dicotiledôneas
Comperico Organo-Sol (Kona and	N.A		<i>Streptomyces acidiscabies</i> (thaxomin A)	<i>Taraxacum officinale</i>
Beloukha	Japão	Não lançado	<i>Xanthomonas campestris</i>	<i>Poa annua</i>
Katoun	Canada	2010	<i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus</i>	<i>Trifolium repens e Trifolium oretense,</i>
	Europa		Rapessed oil (nonanoic acid and pelargonic acid)	Daninhas de batata
	N.A		<i>Pelargonic acid</i>	Terras não agro

(CORDEUAU et al., 2016)

Devido à grande diversidade e ao sucesso do uso de microrganismos como agentes de controle biológico, nos últimos anos, diversos trabalhos têm buscado investigar a potencialidade de produtos naturais com efeito herbicida oriundos de metabólitos secundários. De acordo com a revisão de BÉRDY (2012), cerca de 70.000 produtos derivados de microrganismos já foram descobertos para diversos fins do setor farmacêutico ou agropecuário. Dentre eles, desde 1990, as bactérias vêm sendo vistas como grande promissora para o controle de daninhas (JI et al., 2006), uma vez que os actinomicetos são vantajosos pelo seu potencial em produzir uma gama de diferentes compostos, incluindo àqueles com ação herbicida (MALLIK, 2001). Os metabólitos secundários encontrados nos actinomicetos com potencial herbicida são classificados em diversos grupos, tais como aminoácidos, peptídeos, amidos, aminas, nucleosídeos, entre outros (SHI et al., 2020). No estudo feito por SINGH et al.(2018), dentre os diversos actinomicetos endofíticos isolados que apresentaram efeito herbicida, o gênero *Streptomyces* foi predominante. Neste

mesmo estudo, experimentos com filtrados de *Streptomyces* spp. demonstram redução de 20-60% na germinação de *Ageratum conyzoides* (mentrasto) e de *Parthenium hysterophorus* (losna-branca). Também foi possível observar uma redução no tamanho das raízes após o tratamento com *Streptomyces* spp. Também há outros diversos relatos de metabólitos provenientes de *Streptomyces* spp. que possuem eficiente ação herbicida em diferentes espécies de daninhas (BO et al., 2019; IGARASHI et al., 1997; JIANG et al., 2018), como por exemplo hidantocidina, também derivado de *Streptomyces hygroscopicus* e resormycin, derivado de *Streptomyces platensis* (IGARASHI et al., 1997; NAKAJIMA et al., 1991). Resormycin demonstrou uma alta atividade herbicida em daninhas comuns no Brasil, como por exemplo, *Amaranthus viridis* (caruru), *Bidens pilosa* (picão preto), *Chenopodium album* (fedegosa), *Portulaca oleracea* (beldroega) e *Poa annua* (cabelo-de-cão) (DHANASEKARAN; THAJUDDIN; PANNEERSELVAM, 2010).

Adicionalmente, moléculas derivadas de metabólitos secundários também já foram comercializadas como bioherbicidas, como é o caso do Bilanaphos, comercializado em 1983, com constituintes derivados de *Streptomyces hygroscopicus* e herbicidina A e B, que é um antibiótico com atividade herbicida, derivado de *S. saganonensis* e *S. scopuliridis* (ARAI et al., 1976).

2.6 Daninhas de importância econômica em soja

A cultura de soja é uma das principais commodities do agronegócio brasileiro, sendo o Brasil o segundo maior produtor mundial com produção de 114,843 milhões de toneladas (safra 2018/2019) (EMBRAPA, 2019). Sendo assim, é de grande importância a condução de estudos voltados para o manejo de daninhas nesta cultura. Sabe-se que, dentre os custos de produção da soja, por exemplo, os gastos com herbicidas e fungicidas representaram 20% do custo total de produção no ano de 2019 (BAPTISTELLA, 2019). Dentre as daninhas com maiores dificuldades de controle na cultura de soja, para o presente trabalho de pesquisa foram selecionadas três espécies. Dentre elas estão *Lolium multiflorum*, *Eleusine indica* e *Spermacoce verticillata*. Abaixo, algumas considerações importantes sobre cada espécie selecionada:

Lolium multiflorum é uma planta anual de inverno, também conhecida pelos nomes comuns de azevém, azevém anual, azevém italiano e jôio. Ela

pertence à família botânica Poaceae, possui folhas com bainhas abertas, sobrepostas e um pouco achatadas. A planta cresce em forma de touceiras e pode medir, em média, 40 cm de comprimento e 5-12 mm de largura. Em relação à sua reprodução, *L. multiflorum* é uma planta que se reproduz por sementes, com inflorescência do tipo dística, ereta, com 0,15 a 0,20 m de comprimento (FONTANELI; DOS SANTOS, 2012). O azevém é bastante utilizado para pastejo e cobertura de solo para o sistema de plantio direto, porém, por ter fácil dispersão e ser encontrada em diversas culturas de inverno, *L. multiflorum* é também considerada como uma importante planta daninha no Brasil. Devido à utilização intensa e continuada de herbicidas para o seu controle, como exemplo o glifosato, houve uma intensificação na seleção de biótipos resistentes. Tal resistência não ocorreu somente devido a um mecanismo de ação, mas sim a diversos mecanismos, ocasionando assim uma resistência múltipla, o que vem dificultando ainda mais o controle dessa daninha no campo (VARGAS et al., 2015). O primeiro registro de resistência de *L. multiflorum* aos herbicidas químicos foi em 1987 nos Estados Unidos e em 2003, no Brasil (HEAP, 2020).

Eleusine indica, também conhecida pelo nome popular de capim-pé-de-galinha, pertencente à família botânica Poaceae, possui uma inflorescência terminal digitada, com espigas longas e estreitas e colmo ereto, podendo apresentar 30-50 cm de altura. É uma herbácea anual, com reprodução por semente e que se desenvolve bem em qualquer tipo de solo e em locais que apresentam alta umidade e altas temperaturas. Ela pode ocasionar sérios problemas na produção agrícola, visto que, uma vez instituída no campo, o seu controle se torna bastante custoso. Essa espécie afeta grandes culturas no Brasil, como a soja, milho, algodão e sorgo. Nos últimos anos, essa espécie tem se propagado abundantemente no campo e é considerada uma das cinco mais problemáticas no mundo, devido a sua presença em grande parte dos continentes. Recentemente, vem apresentando casos de resistência aos herbicidas químicos em diversos sítios de ação (HEAP, 2020). O primeiro relato de resistência dessa espécie foi em 1973 na cultura de algodão nos Estados Unidos e, no Brasil, o primeiro registro foi no Rio Grande do Sul em 2003, na cultura de soja (HEAP, 2020). O primeiro caso de resistência ao glifosato no Brasil foi em 2016, no estado do Paraná (CORREIA; REZENDE, 2002).

Spermacoce verticillata é uma daninha herbácea da família Rubiácea, também conhecida pelos nomes populares cordão-de-frade, erva-botão, falsa-poaia, poaia-falsa, poaia-preta, vassoura-botão, vassourinha, entre outros. É uma planta perene, capaz de se desenvolver em todas as regiões do Brasil. Possui folhas simples e glabras dispostas de forma verticilada e a sua reprodução ocorre através de sementes. A ocorrência desta planta vem aumentando significativamente nos campos de produção agrícola do Brasil, principalmente na cultura de soja. Essa planta ainda não possui nenhum registro oficial de resistência aos herbicidas químicos, no entanto, por ser uma espécie que não é facilmente controlada pelo glifosato, é considerada bastante problemática, gerando assim grande preocupação entre os produtores (GIRARDELI, 2019).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica e em casa de vegetação, ambos localizados no Departamento de Fitopatologia e Nematologia da Universidade de São Paulo, campus “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP).

3.1 Obtenção dos isolados

Os isolados de *Streptomyces spp.* foram obtidos de tubérculos de batata, variedade Orquestra, com procedência do Estado da Bahia (BA), cedidos pela Associação Brasileira da Batata (ABBA). Todos os tubérculos utilizados apresentavam sintomas da doença Sarna Comum, uma doença de importância econômica para a cultura, cujo agentes causadores são bactérias do gênero *Streptomyces*. O isolamento foi feito utilizando-se a metodologia descrita por SCHAAD, N.W., JONES, J.B., CHUN (2001). Pequenas amostras foram retiradas das lesões superficiais dos tubérculos doentes com o auxílio de uma lâmina e, posteriormente, mergulhadas em tubos com água destilada esterilizada. Para a prévia seleção da bactéria, as amostras foram submetidas à banho-Maria por 30 min à 60°C. Uma alíquota da preparação juntamente com os fragmentos das lesões foram plaqueadas, com o auxílio de uma alça bacteriológica, por estriamento em placas de Petri com meio de cultura Ágar Água. As placas foram incubadas à 28 C° por 10 dias. As colônias isoladas desejáveis foram selecionadas e transferidas para um novo meio de cultura de Ágar Água. Após duas repicagens, uma terceira foi efetuada em meio de Aveia Ágar. A preparação do meio de cultivo Aveia foi feita de acordo com a metodologia sugerida por GARCIA 2008), com adaptação (PAULA, 2019). Foram utilizados 40g de farelo de aveia para 1L de água destilada, deixados em agitação e cocção por 20 min. Ao meio foi adicionado 15g/L de ágar e, posteriormente, submetido a filtragem em peneira e gaze e ao reajuste do pH para 7,0 com a utilização de NaOH 1 M. O meio foi autoclavado à 120 °C, 1 atm durante 20 min. Para meio líquido, o mesmo procedimento foi seguido, sem a adição do ágar. Os isolados foram caracterizados conforme sua coloração, produção de pigmentos e tipo de cadeia de esporos, as quais foram observadas com o auxílio de um microscópio de luz.

3.2 Coleção dos isolados bacterianos

Após crescimento em meio Aveia, por aproximadamente 12 dias, esporos foram coletados com auxílio de uma alça bacteriológica e imersos em suspensão de glicerol 20%. A coleção de bactérias (Bacterioteca) foi devidamente nomeada quanto aos diferentes isolados e encontra-se armazenada à -80°C no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica, localizado na ESALQ/USP, sob supervisão do Prof. Dr. Sérgio F. Pascholati.

3.3 Obtenção do inoculo de bacteriano

O isolado IBSBF2507 de *Streptomyces scabies*, já utilizado no laboratório em pesquisas anteriores e, mais 14 isolados recém obtidos da coleção do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica foram crescidos em meio de cultura aveia líquido para a obtenção do inoculo.

Para a reativação dos isolados, o repique foi efetuado diretamente da suspensão de glicerol para o meio de cultura de aveia sólido, contido em placas de Petri e deixados crescer por aproximadamente 12 dias em câmara incubadora do tipo B.O.D. à 25 °C no escuro. Após o crescimento, um novo repique foi conduzido em 100 mL meio aveia líquido acondicionado em frascos Erlernmeyer de 250 mL. Para tal, 3 discos de 3mm de diâmetro de cada isolado foram retirados do meio sólido, adicionados ao meio líquido e incubados em agitação por 12 dias à 225 rpm, 25C no escuro. Os repiques seguintes, de meio líquido para meio líquido, foram feitos através da adição de 400 uL de inóculo, previamente crescidos em meio líquido, para frascos com meio de cultura novo. A incubação foi efetuada em câmara de agitação a 225 rpm no escuro a 25°C por 5--7 dias.

3.4 Teste de verificação do potencial da ação herbicida

As sementes de três espécies de daninhas, *Lolium multiflorum* (azevém), *Spermacoce verticillata* (pé-de-galinha) e *Eleusine indica* (vassourinha-de-botão), foram obtidas da empresa Cosmos Agrícola Produção e Serviços Rurais Ltda.

3.4.1 Potencial da ação herbicida na germinação - *in vitro*

Para o ensaio, foram utilizadas 50 sementes de cada espécie dispostas uniformemente em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, previamente forradas com

duas folhas de papel de germinação. De cada inoculo, obtido do meio líquido, foi retirada uma alíquota de 5 mL do sobrenadante de suspensão de células para umedecer as folhas de germinação. O experimento teve um total de 18 tratamentos, sendo 14 isolados e 3 controles: isolados IBSBF2507, LFBF1901, LFBF1902, LFBF1903, LFBF1905, LFBF1906, LFBF1909, LFBF1910, LFBF1912, LFBF1913, LFBF1919, LFBF1923, LFBF1925, LFBF1926 e LFBF1928. Como controle negativo, utilizou-se água deionizada esterilizada e meio de aveia líquido, e como controle positivo o produto comercial Roundup Original da Monsanto, na concentração de 16,7ml/L.

O material foi incubado em câmara B.O.D a 25ºC, com fotoperíodo de 16h luz. Foram feitas avaliações diárias da germinação, sendo qualquer protuberância observada na semente considerada como indício de início de germinação. A avaliação foi finalizada quando se observou uma estabilidade nos números de sementes germinadas. Cada tratamento continha 3 repetições e o experimento foi realizado em duplicata. Os dados foram expressos em porcentagem de germinação em relação ao controle e submetidos à análise estatística de variância (ANOVA) e Scott-Knott ($p > 0,05$).

3.4.2 Potencial ação herbicida pós emergente em casa de vegetação- *in vivo*

O experimento foi conduzido em casa de vegetação localizada no Campo Experimental do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, ESALQ/USPP. A semeadura de *S. verticillata* e *L. multiflorum* foi conduzida em potes de plástico, com 10,5 cm de diâmetro, preenchidos com substrato na proporção 3:1 (v/v) solo: vermiculita, sendo semeadas aproximadamente 5 sementes por pote. Com 10-15 dias de desenvolvimento, foi feito o desbaste das plantas antes da inoculação. A inoculação foi feita através de dois métodos: no primeiro diretamente no solo, vertendo-se 50 mL de inoculo, e no segundo por aspersão na folha, com inoculação feita através de aspersão manual até o ponto de escorrimento. Os controles utilizados foram água deionizada esterilizada, meio Aveia Líquido e o produto comercial Roundup, na concentração de 16,7ml/L. As suspensões utilizadas corresponderam aos isolados IBSBF2507, LFBF1901, LFBF1909 e LFBF1926, todos testados em condições de suspensões autoclavadas e suspensões não

autoclavadas. Sete dias após a inoculação (DAI), amostras das plantas foram coletadas para a mensuração de massa fresca e massa seca. Cada tratamento constou de 10 repetições. Os resultados foram expressos em gramas (g) e os dados submetidos à análise de variância (ANOVA) e Scott-knott ($p > 0,05$).

3.5 Verificação da seletividade na germinação de sementes de soja

Os testes para seletividade foram conduzidos para se verificar a viabilidade das preparações bacterianas em campos de cultivo de soja, visando o manejo das daninhas comuns nessas áreas, sem que ocorram prejuízos à cultura de interesse.

Os testes de germinação foram conduzidos com a utilização de duzentas sementes, seguindo a metodologia sugerida pelas Regras de Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009). Como substrato para o ensaio *in vitro* foram utilizadas 3 folhas de papel de germinação, devidamente umedecidas com água deionizada, na proporção em mL de 2,5 vezes o peso das folhas. Os tratamentos foram feitos utilizando-se inoculo a 1,5% do peso das sementes de cada tratamento. A homogeneização do tratamento foi realizada utilizando-se sacos plásticos em agitação manual por 30 segundos. As sementes de cada tratamento foram separadas em 8 rolos com 25 sementes cada e incubadas em câmara de germinação a 25°C. A avaliação foi feita com 5 dias e com 8 dias após a inoculação, anotando-se a quantidade de sementes germinadas, anormais e não-germinadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Coleção Bacteriológica

As amostras extraídas dos sete tubérculos sintomáticos utilizados estão preservadas em coleção bacteriológica, a qual se encontra depositada no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica da ESALQ/USP (LFBF). Ao total foram obtidos vinte e nove isolados bacterianos. Todos foram caracterizados visualmente quanto a sua coloração e produção de pigmentos, bem como por microscopia de luz, quanto ao tipo de cadeia de esporos que apresentavam. Majoritariamente, os tipos de cadeia de esporos observadas foram: do tipo espiral (23 isolados), dois isolados caracterizados como de cadeia do tipo flexuosa e dois isolados de cadeia mista, com formatos tanto espiral quanto flexuosa. Dois isolados não foram caracterizados devido à dificuldade de visualização. A coloração da colônia e a pigmentação produzida foram avaliadas após aproximadamente 12 dias de crescimento em placa de Petri com meio de cultura aveia. As colorações variaram entre branco (4), marrom (3) e tonalidades de cinza (22). Somente 9 dos isolados demonstraram a produção de pigmentação no meio de cultura sólido, sendo 5 isolados de pigmentação amarelada e 4 isolados de pigmentação amarronzada. A Tabela 2 ilustra detalhadamente a caracterização de todos os isolados, enquanto que a Figura 3 mostra o crescimento de alguns dos isolados em meio sólido com 12 dias de crescimento. De acordo com SCHAAD et al. (2001), essas caracterizações auxiliam na classificação quanto às espécies do gênero *Streptomyces* e, apesar de não ter sido realizada a classificação por análises moleculares, pode-se estimar que os isolados possam ser exemplares de *Streptomyces tugiscabies*, que apresentam coloração cinza, cadeia de esporos flexuosa e não produção de pigmentos, e *Streptomyces scabies*, que em geral apresentam coloração cinza, cadeia de esporos espiral e produção de pigmentos. Por sua vez, o isolado IBSBF2507 oriundo da Seção de Bacteriologia Vegetal do Instituto Biológico de São Paulo e previamente existente no LFBF, já havia sido classificado como pertencente a espécie *Streptomyces scabies*. Devido à utilização em experimentos anteriores, o isolado LFBF1901 foi submetido à análise molecular, sendo classificado como *Streptomyces griseorubiginosus*.

Tabela 2 Dados gerais dos isolados da coleção bacteriológica LFBF. Caracterização dos isolados bacterianos feita com a utilização de microscopia de luz e observação do crescimento em meio de cultura sólido*

ID	Cadeia de esporos	Coloração micélio na placa	Produção de pigmentos
IBSBF2507	Espiral	Branco esverdeado	Sim/ amarelo
LFBF1903	Espiral	Branco	sim/ marrom
LFBF1904	Espiral	Cinza	não
LFBF1909	Espiral	Cinza	não
LFBF1910	Espiral	Cinza	não
LFBF1911	Espiral	Marrom	sim/amarelo
LFBF1905	Espiral	Cinza	sim/ marrom
LFBF1912	Espiral	Cinza	sim/ amarelo
LFBF1913	Espiral	Cinza	não
LFBF1914	Espiral	Cinza	sim/marrom
LFBF1915	Espiral	Cinza	não
LFBF1901	Flexuosa	Cinza	sim/ amarelo
LFBF1916	Espiral	Cinza	não
LFBF1902	Espiral	Cinza	sim/ amarelo
LFBF1917	Espiral	Cinza	não
LFBF1918	Espiral	Marrom	não
LFBF1919	Espiral	Marrom	não
LFBF1920	Espiral	Branco	sim/ amarelo
LFBF1921	Espiral/ Flexuosa	Cinza	não
LFBF1922	Espiral	Cinza	não
LFBF1923	Espiral	Cinza	não
LFBF1924	N.A	Cinza	não
LFBF1925	Flexuosa	Branco	não
LFBF1906	Espiral/ flexuosa	Marrom	sim/marrom
LFBF1926	Espiral	Cinza	não
LFBF1927	Espiral	Cinza	não
LFBF1928	Espiral	Cinza	não
LFBF1929	Espiral	Cinza	não
LFBF1907	N.A	Branco	não
LFBF1908	Espiral	Cinza	não

*NA= não foi possível realizar a avaliação

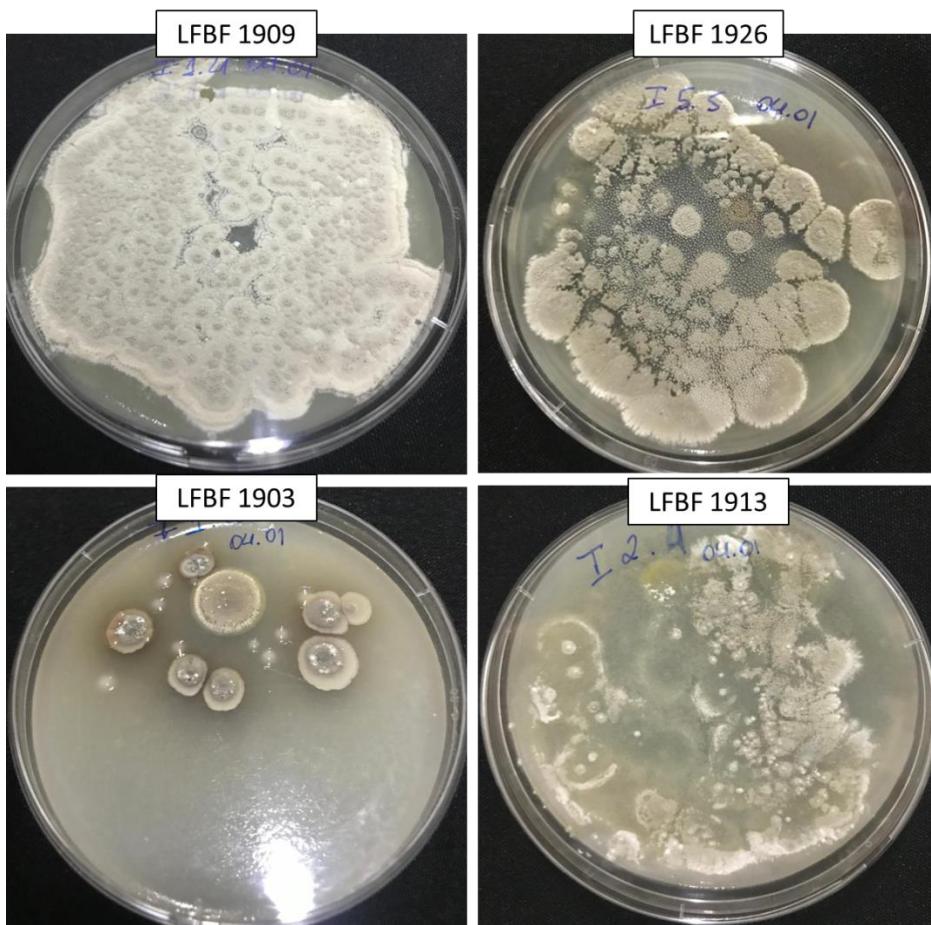


Figura 3 Quatro isolados da coleção bacteriológica LFBF com 12 dias de crescimento em meio aveia sólido.

4.2 Teste de germinação de sementes de daninhas *in vitro*

Os testes de germinação *in vitro* foram realizados com três espécies de daninhas, *S. verticillata*, *L. multiflorum* e *E. indica*. As mensurações de germinação foram feitas entre 5-10 dias, variando de acordo com a espécie de planta, até o momento de estabilização da germinação. Todos os experimentos foram analisados estatisticamente com o uso do Teste Scott-Knott, $p \geq 0,05$ com comparações múltiplas baseadas em análise de agrupamento univariada no R Studio. Os dados gerais da avaliação de cada repetição estão devidamente descritos na Tabela 1 do apêndice deste trabalho. As médias e as porcentagens de inibição de germinação estão detalhadas na Tabela 3 e Tabela 5, respectivamente.

A espécie *S. verticillata* estabilizou a germinação entre 5-6 dias, enquanto *L. multiflorum* e *E. indica* tiveram a estabilização de germinação entre 10-12 dias. No

ensaio 1 com a espécie *S. verticillata*, os tratamentos Aveia, LFBF1902 e LFBF1925, se igualaram estatisticamente ao controle Água, não demonstrando efeito considerável na inibição de germinação. Os isolados IBSBF2507, LFBF1905, LFBF1913, LFBF1919 e LFBF1926 foram estatisticamente diferentes do controle água, porém ainda apresentaram algum efeito de inibição, abaixo de 50%. Já os tratamentos com os isolados LFBF1909, LFBF1910, LFBF1912 e LFBF1923 apresentaram inibição maior de 50%. Os isolados LFBF1903, LFBF1901 e LFBF1928 apresentaram alto efeito de inibição de germinação, sendo estatisticamente semelhantes ao herbicida químico Roundup. No ensaio 2 de *S. verticillata*, os isolados LFBF1905, LFBF1901, LFBF1923 LFBF1906 e LFBF1925 aveia e IBSBF2507 demonstraram-se estatisticamente relacionados ao controle água e os isolados LFBF1903, LFBF1909, LFBF1910, LFBF1912, LFBF1913, LFBF1902, LFBF1919, LFBF1926 e LFBF1928 foram estatisticamente iguais ao Roundup, todos com inibição acima de 50%.

Para a espécie *E. indica*, no ensaio 1 os tratamentos aveia, IBSBF2507, LFBF1910, LFBF1925 e LFBF1928 foram estatisticamente semelhantes ao controle água, não demonstrando efeito inibitório significativo. Já os isolados LFBF1903, LFBF1909, LFBF1913, LFBF1901, F1919, LFBF1906 e LFBF1926 apresentaram alto efeito inibitório com inibição estatisticamente semelhante ao Roundup. No ensaio 2, os isolados LFBF1909, LFBF1912, LFBF1913 e LFBF1926 exibiram 100% inibição da germinação, não apresentando diferença estatística em relação ao Roundup. Os demais isolados ou apresentaram pouco efeito de inibição, abaixo de 30% ou induziram a germinação das sementes.

Por sua vez, nos ensaios com a daninha *L. multiflorum*, no Ensaio 1 e Ensaio 2 os tratamentos LFBF1926, LFBF1909, apresentaram alto efeito de inibição de germinação das sementes, acima de 70% sendo consideradas estatisticamente semelhantes Roundup. As porcentagens de germinação estão descritas na Tabela 4 e as porcentagens de inibição na Tabela 5. Nenhum dos isolados se mostrou excelente nas três espécies concomitantemente, porém, alguns isolados se mostraram eficientes em duas espécies. As comparações estatísticas estão demonstradas nas tabelas desta seção.

Nas três espécies de daninhas, o tratamento *in vitro* com meio aveia puro apresentaram uma média de germinação bastante semelhante com o controle água,

sem diferença estatística significativa, demonstrando assim que os compostos que compõem o meio de cultura utilizado não têm efeito sobre as sementes utilizadas nos experimentos. O produto comercial Roundup apresentou resultados de alta inibição de germinação, o qual condiz com o efeito de controle já bem estabelecido para *E. indica* e *L. multiflorum* (AGROFIT, 2020; AGROLINK, 2020). Para *S. verticillata*, apesar de não haver registro no sistema oficial de Cadastro de Agroquímicos do Governo Federal (AGROFIT) para o seu controle, foi possível observar um excelente nível de inibição da germinação das sementes dessa daninha.

Tabela 3 Número médio de sementes germinadas in vitro após tratamento com diferentes isolados de actinomicetos. Repetições dos experimentos, foram nomeadas como E1 e E2 = ensaio 1 e ensaio 2, respectivamente*

Tratamento	<i>S. verticillata</i>		<i>E. indica</i>		<i>L. multiflorum</i>	
	E1	E2	E1	E2	E1	E2
Água	17,3 a	24,7 a	10,7 a	9,3 b	21,7 a	18,3 a
Aveia	21,7 a	18,7 a	9,7 a	10,7 b	25,0 a	23,0 a
Roundup	3,0 d	7,3 b	0,0 c	0,0 c	0,0 b	0,0 b
LFBF1903	1,0 d	8,3 b	1,0 c	6,7 b	11,7 a	16,3 a
IBSBF2507	12,7 b	12,7 a	12,0 a	12,0 a	15,3 a	15,3 a
LFBF1909	8,3 c	9,3 b	0,0 c	0,0 c	0,0 b	0,0 b
LFBF1910	6,3 c	8,7 b	13,0 a	13,0 a	18,3 a	19,0 a
LFBF1905	11,3 b	13,0 a	6,3 b	15,7 a	27,3 a	15,3 a
LFBF1912	8,7 c	10,0 b	7,0 b	0,0 c	22,0 a	14,7 a
LFBF1913	11,0 b	6,3 b	0,3 c	0,0 c	18,3 a	15,7 a
LFBF1901	3,7 d	15,3 a	2,3 c	13,3 a	24,7 a	19,7 a
LFBF1902	19,3 a	8,7 b	7,0 b	12,7 a	19,0 a	13,7 a
LFBF1919	15,0 b	9,0 b	3,7 c	9,7 b	22,0 a	17,7 a
LFBF1923	8,0 c	18,7 a	9,0 b	15,0 a	20,3 a	19,3 a
LFBF1925	16,7 a	15,7 a	11,3 a	8,3 b	24,3 a	17,0 a
LFBF1906	3,7 d	14,0 a	2,7 c	12,0 a	19,3 a	14,3 a
LFBF1926	15,0 b	3,0 b	0,0 c	0,0 c	0,3 b	5,0 b
LFBF1928	0,3 d	11,3 b	10,7 a	11,3 a	17,0 a	16,0 a

*50 sementes por repetição. Análise estatística: ANOVA e Scott-knott ($p>0,05$)

Tabela 4 Percentagem média de germinação de sementes de daninhas in vitro (com base na Tabela 3) após tratamento com diferentes isolados de actinomicetos. Repetições dos experimentos nomeadas como E1 e E2 = ensaio 1 e ensaio 2, respectivamente*

Tratamento	<i>S. verticillata</i>		<i>E. indica</i>		<i>L. multiflorum</i>	
	E1	E2	E1	E2	E1	E2
Água	35% a	49% a	21% a	19% b	43% a	31% a
Aveia	43% a	37% a	19% a	21% b	50% a	42% a
Roundup	6% d	15% b	0% c	0% c	0% b	0% b
LFBF1903	2% d	17% b	2% c	13% b	23% a	23% a
IBSBF2507	25% b	25% a	24% a	24% a	31% a	31% a
LFBF1909	17% c	19% b	0% c	0% c	0% b	0% b
LFBF1910	13% c	17% b	26% a	26% a	37% a	37% a
LFBF1905	23% b	26% a	13% b	31% a	55% a	31% a
LFBF1912	17% c	20% b	14% b	0% c	44% a	25% a
LFBF1913	22% b	13% b	1% c	0% c	37% a	29% a
LFBF1901	7% d	31% a	5% c	27% a	49% a	38% a
LFBF1902	39% a	17% b	14% b	25% a	38% a	32% a
LFBF1919	30% b	18% b	7% c	19% b	44% a	33% a
LFBF1923	16% c	37% a	18% b	30% a	41% a	34% a
LFBF1925	33% a	31% a	23% a	17% b	49% a	28% a
LFBF1906	7% d	28% a	5% c	24% a	39% a	27% a
LFBF1926	30% b	6% b	0% c	0% c	1% b	9% b
LFBF1928	1% d	23% b	21% a	23% a	34% a	27% a

*Total de 50 sementes por repetição. Análise estatística: ANOVA e Scott-knott ($p>0,05$)

Tabela 5 Percentual de inibição de germinação de sementes de daninhas em relação ao controle água in vitro (com base nos dados das Tabelas 3 e 4) após tratamento com diferentes isolados de actinomicetos. Repetições dos experimentos nomeadas como E1 e E2 = ensaio 1 e ensaio 2, respectivamente*

Tratamento	<i>S. verticillata</i>		<i>E. indica</i>		<i>L. multiflorum</i>	
	E1	E2	E1	E2	E1	E2
Aveia	24% a	-24% a	-9% a	14% b	15% a	34% a
Roundup	-83% d	-70% b	-100% c	-100% c	-100% b	-100% b
LFBF1903	-94% d	-66% b	-91% c	-29% b	-46% a	-28% a
IBSBF2507	-27% b	-49% a	13% a	29% a	-29% a	-2% a
LFBF1909	-52% c	-62% b	-100% c	-100% c	-100% b	-100% b
LFBF1910	-63% c	-65% b	22% a	39% a	-15% a	17% a
LFBF1905	-35% b	-47% a	-41% b	68% a	26% a	-2% a
LFBF1912	-50% c	-59% b	-34% b	-100% c	2% a	-19% a
LFBF1913	-37% b	-74% b	-97% c	-100% c	-15% a	-6% a
LFBF1901	-79% d	-38% a	-78% c	43% a	14% a	21% a
LFBF1902	12% a	-65% b	-34% b	36% a	-12% a	2% a
LFBF1919	-13% b	-64% b	-66% c	4% b	2% a	4% a
LFBF1923	-54% c	-24% a	-16% b	61% a	-6% a	9% a
LFBF1925	-4% a	-36% a	6% a	-11% b	12% a	-11% a
LFBF1906	-79% d	-43% a	-75% c	29% a	-11% a	-15% a
LFBF1926	-13% b	-88% b	-100% c	-100% c	-98% b	-70% b
LFBF1928	-98% d	-54% b	0% a	21% a	-22% a	-15% a

*Controle H₂O considerado como 100% de germinação. Valores negativos são referentes à inibição e positivos são indução de germinação.

Na tabela abaixo (Tabela 6) é possível comparar os experimentos de acordo com os intervalos de inibição, sendo que as Figuras 4, 5 e 6 ilustram alguns dos resultados. A frequência de maior inibição (em roxo, acima de 75%) ocorreu nos ensaios com os tratamentos LFBF1903, LFBF1909, LFBF12, LFBF13, LFBF1901, LFBF1906, LFBF1926 e LFBF1928, sendo que o isolado LFBF1909 se mostrou muito eficiente em relação ao efeito sobre *E. indica* e *L. multiflorum* nas duas repetições. Tais isolados possuem as mesmas características morfológicas observadas na Tabela 2 (coloração cinza, cadeia de esporo espiral e sem pigmentação no meio). O experimento E2 de *S. verticillata* se apresentou bastante destoante em relação à E1, que pode ter ocorrido devido à variação das condições dentro da câmara incubadora, ocasionada pelas diferentes posições de prateleiras.

Ao longo do experimento foi feita a alternância de posições das placas de Petri para amenização de tal diferença.

Tabela 6 Percentagem de inibição da germinação in vitro de sementes de daninhas expressa em escala de cores. E1 e E2 correspondem aos ensaios 1 e 2, respectivamente*

Tratamento	<i>S. verticillata</i>		<i>E. indica</i>		<i>L. multiflorum</i>	
	E1	E2	E1	E2	E1	E2
Aveia						
Roundup	■	■	■	■	■	■
LFBF1903	■		■	■	■	■
IBSBF2507	■	■			■	■
LFBF1909	■	■	■	■	■	■
LFBF1910	■	■			■	
LFBF1905	■	■	■	■		■
LFBF1912	■	■		■		
LFBF1913	■	■	■	■	■	■
LFBF1901	■	■	■			
LFBF1902		■	■		■	
LFBF1919	■	■	■			
LFBF1923	■	■	■	■	■	
LFBF1925	■	■		■		■
LFBF1906	■		■		■	
LFBF1926	■	■	■	■	■	■
LFBF1928	■	■			■	■

*Roxo= inibição >75%; amarelo= inibição 50-75%; azul claro= inibição <50;

cinza: sem inibição ou com indução de germinação

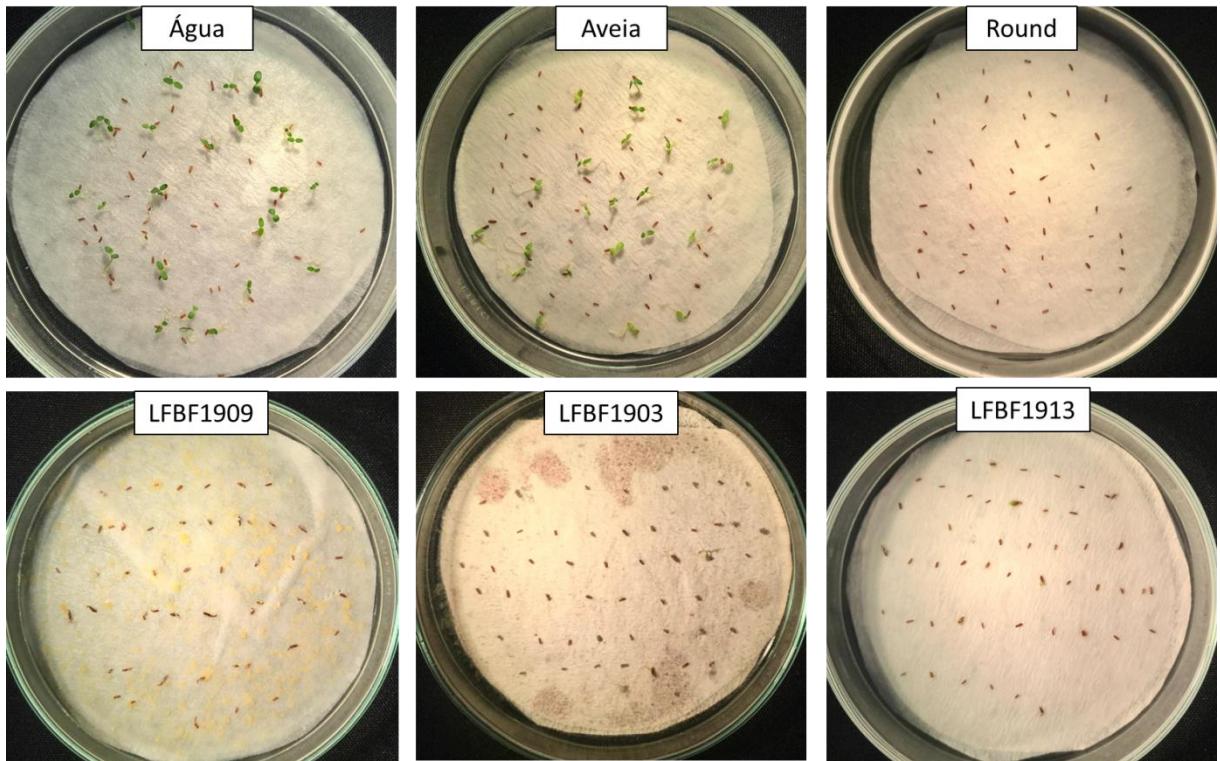


Figura 4 Germinação de *S. verticillata* in vitro após tratamento com diferentes isolados. Foto tirada após 5 dias da inoculação

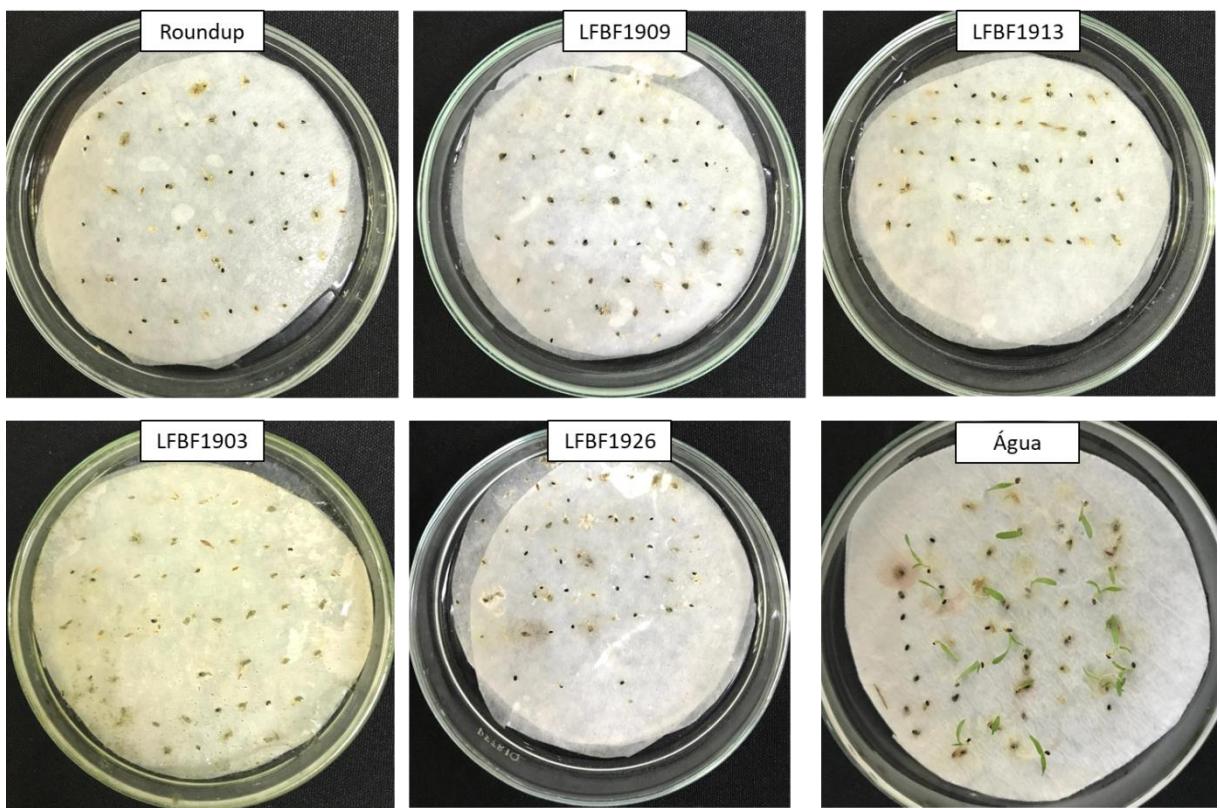


Figura 5 Germinação de *E. indica* in vitro após tratamento com diferentes isolados. Foto tirada 10 dias após inoculação

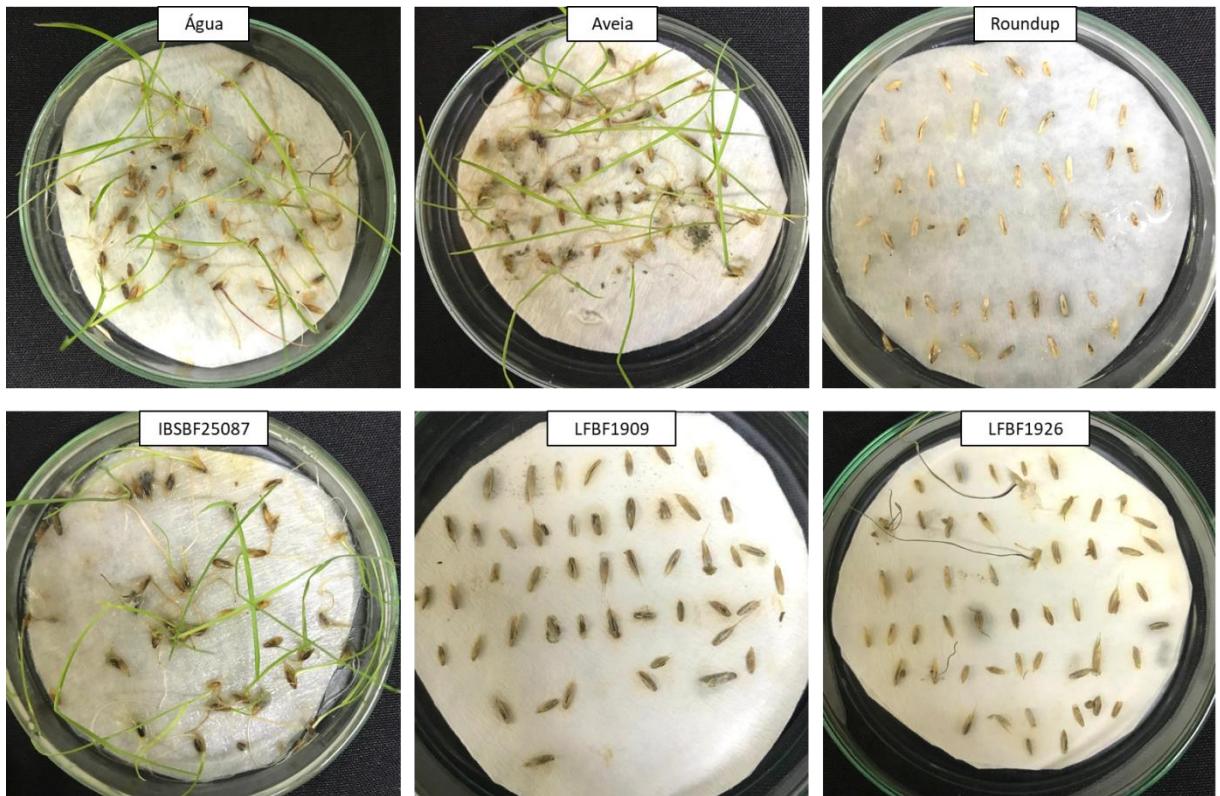


Figura 6 Germinação de *L. multiflorum* in vitro após tratamento com diferentes isolados. Foto tirada 10 dias após inoculação

4.3 Influência das preparações no desenvolvimento das daninhas em condições de casa de vegetação

As daninhas foram avaliadas quanto a sua massa fresca e massa seca de amostras de plantas, após o tratamento com as suspensões de células de isolados previamente selecionados. Os valores gerais de cada repetição dos experimentos em casa de vegetação encontram-se descritos nas Tabelas 2, 3 e 4 do apêndice deste trabalho.

Na Tabela 7 está descrito detalhadamente as médias de pesos mensurados referentes ao ensaio com *S. verticillata*, sendo que nas Figuras 7 e 8, pode-se observar o aspecto das plantas. Os dados referentes à massa fresca e massa seca tiveram uma correlação estatística alta, com coeficiente de 0,97 no ensaio com IBSBF2507 e LFBF1901. Nenhum dos tratamentos exibiu diferença significativa em relação ao controle H_2O , expressando assim que, não houve efeito de controle pós-emergência com esses isolados. A diferença estatística se deu apenas no tratamento com o produto comercial Roundup. Apesar de apresentarem resultados

de inibição em ao menos 2 ensaios *in vitro*, os tratamentos IBSBF2507 e LFBF1901 não demonstraram efeito de controle nos tratamentos *in vivo* sobre *S. verticillata*.

Tabela 7 Média massa fresca e seca da parte aérea de *S. verticillata* após 7 dias da inoculação no solo e na folha. S= suspensão não autoclavada e A= suspensão autoclavada

	Tratamento solo		Tratamento folha	
	Massa fresca Folha (g)	Massa Seca Folha (g)	Massa fresca Solo (g)	Massa Seca Solo (g)
Água	1,73 a	0,17 a	1,94 a	0,19 a
Aveia	1,13 a	0,11 a	1,75 a	0,17 a
Roundup	0,19 b	0,04 a	0,10 b	0,03 b
IBSBF2507	1,33 a	0,15 a	1,50 a	0,14 a
IBSBF2507A	1,73 a	0,17 a	1,15 a	0,10 a
LFBF1909	1,92 a	0,17 a	1,81 a	0,19 a
LFBF1909A	1,39 a	0,13 a	1,87 a	0,20 a



Figura 7 Plantas de *S. verticillata* após 7 dias de inoculação de 50 mL de suspensão no solo

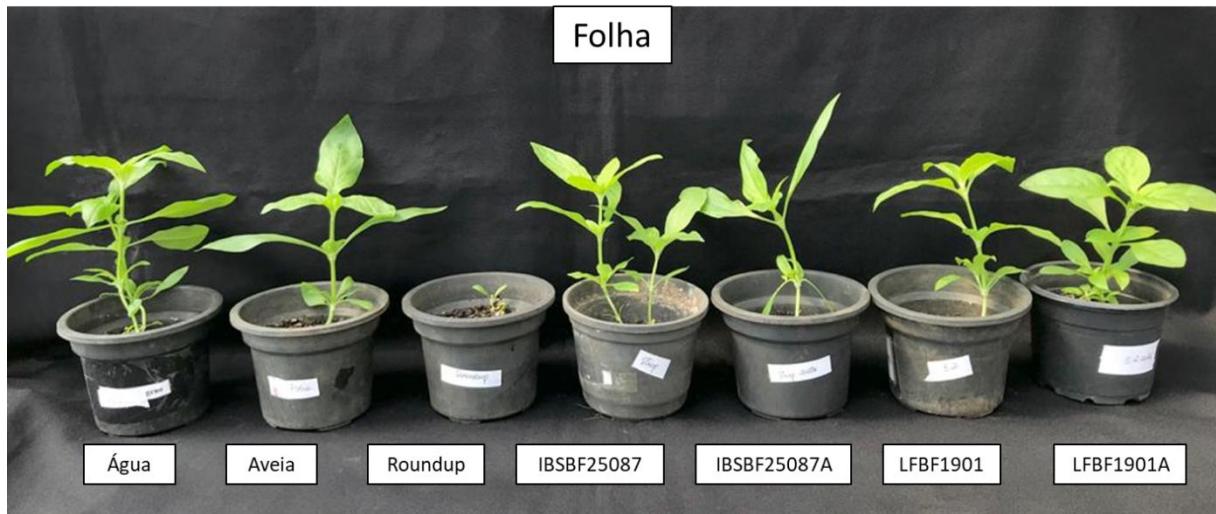


Figura 8 Plantas de *S. verticillata* após 7 dias da inoculação por aspersão na folha

Para a espécie *L. multiflorum*, a avaliação com 7 dias foi feita após aplicação dos tratamentos IBSBF2507, LFBF1909 e LFBF1926. Os tratamentos foram conduzidos com a utilização de suspensão de células autoclavadas ou não autoclavadas. Após sete dias da inoculação não foi observado nenhum efeito visual e estatístico do tratamento IBSBF2507 em relação ao controle água (Tabela 8), tanto na observação dos tratamentos inoculados em solo quanto nos tratamentos inoculados em folha. Os dados de massa fresca e massa seca também foram altamente correlacionados. A única diferença estatística encontrada foi em relação ao tratamento com o herbicida químico Roundup. Tais dados correspondem aos resultados encontrados *in vitro* em que esse isolado também não demonstrou efeito de inibição da germinação.

Tabela 8 Média massa) fresca e seca da parte aérea de *L. multiflorum* após 7 dias de inoculação no solo e na folha com o isolado IBSBF2507*

	Tratamento solo		Tratamento folha	
	Massa fresca Folha (g)	Massa Seca Folha (g)	Massa fresca Solo (g)	Massa Seca Solo (g)
Água	0,47 a	0,07 a	0,19 a	0,03 a
Aveia	0,34 a	0,05 a	0,24 a	0,04 a
Roundup	0,02 b	0,01 b	0,01 b	0,00 b
IBSBF2507S	0,31 a	0,04 a	0,27 a	0,06 a
IBSBF2507A	0,28 a	0,05 a	0,30 a	0,05 a

* IBSBF2507S= suspensão não-autoclavada e IBSBF2507A= suspensão autoclavada.

No ensaio conduzido com os isolados LFBF1909 e LFBF1926 foi observado uma diferença entre os dados de massa seca em relação à massa fresca e também entre inoculação em solo e inoculação na folha.

De forma geral, visualmente o herbicida químico demonstrou menor efeito herbicida, quando comparado ao ensaio anterior com IBSBF2507, no entanto, ainda foi possível observar diferença estatística em relação ao controle água. No tratamento em folha, a análise da massa fresca demonstrou que os isolados LFBF1909 e LFBF1926, tanto autoclavado quanto não autoclavado, foram estatisticamente semelhantes ao Roundup, apresentando, então, uma ação herbicida na folha. Em análise da massa seca, todos os tratamentos, inclusive o meio aveia, se diferenciaram do controle água. De modo geral, com inoculação em folha, observou-se que os tratamentos utilizados foram estatisticamente semelhantes ao controle químico, sugerindo algum efeito de inibição ou retardamento de desenvolvimento da planta em relação à sua massa.

Em inoculação no solo, os dados da massa fresca foram estatisticamente iguais e, os dados da massa seca demonstraram que os tratamentos com meio aveia e LFBF1909A (autoclavado) apresentaram maiores valores de massa de matéria seca, não demonstrando nenhum efeito de inibição ou controle pós-emergente.

*Tabela 9 Média massa fresca e seca da parte aérea de *L. multiflorum* com 7 dias após inoculação com LFBF1909* e LFBF1926**

	Massa fresca Folha (g)	Massa Seca Folha (g)	Massa fresca Solo (g)	Massa Seca Solo (g)
Água	0,345 a	0,05 a	0,242 a	0,022 a
Aveia	0,281 a	0,028 b	0,237 a	0,034 b
Roundup	0,142 b	0,02 b	0,174 a	0,027 a
LFBF1909	0,217 b	0,028 b	0,21 a	0,023 a
LFBF1909A	0,2 b	0,024 b	0,233 a	0,032 b
LFBF1926	0,198 b	0,021 b	0,198 a	0,022 a
LFBF1926A	0,194 b	0,03 b	0,194 a	0,027 a

*LFBF1909= suspensão não autoclavada, LFBF1909A= suspensão autoclavada; LFBF1926= suspensão não autoclavada, LFBF1926A= suspensão autoclavada

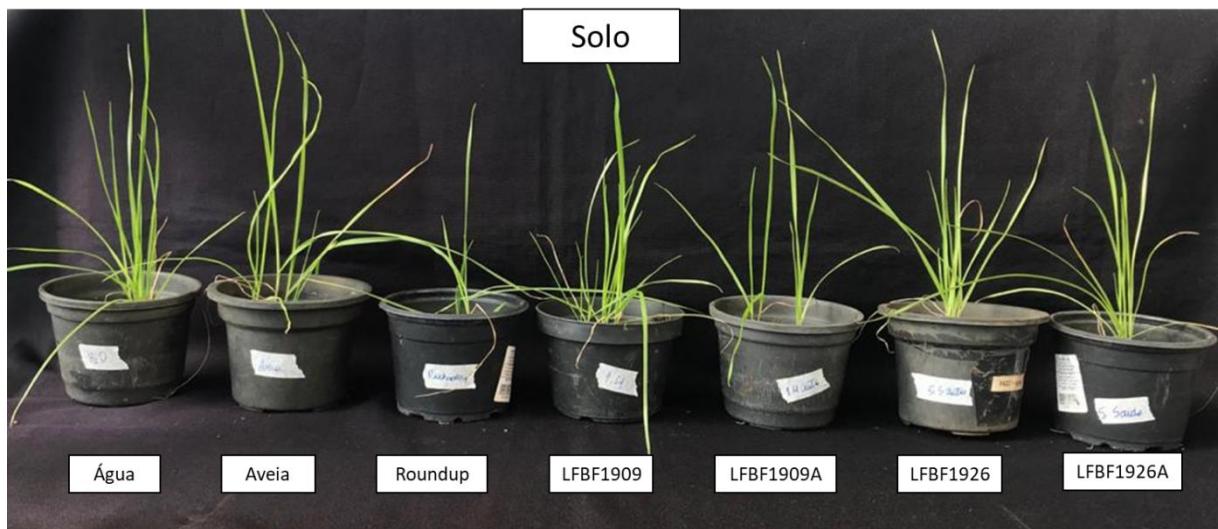


Figura 9 Plantas de *L. multiflorum* após inoculação no solo com LFBF1909 e LFBF1926. Foto tirada após 7 dias da inoculação no solo. A= suspensão autoclavada

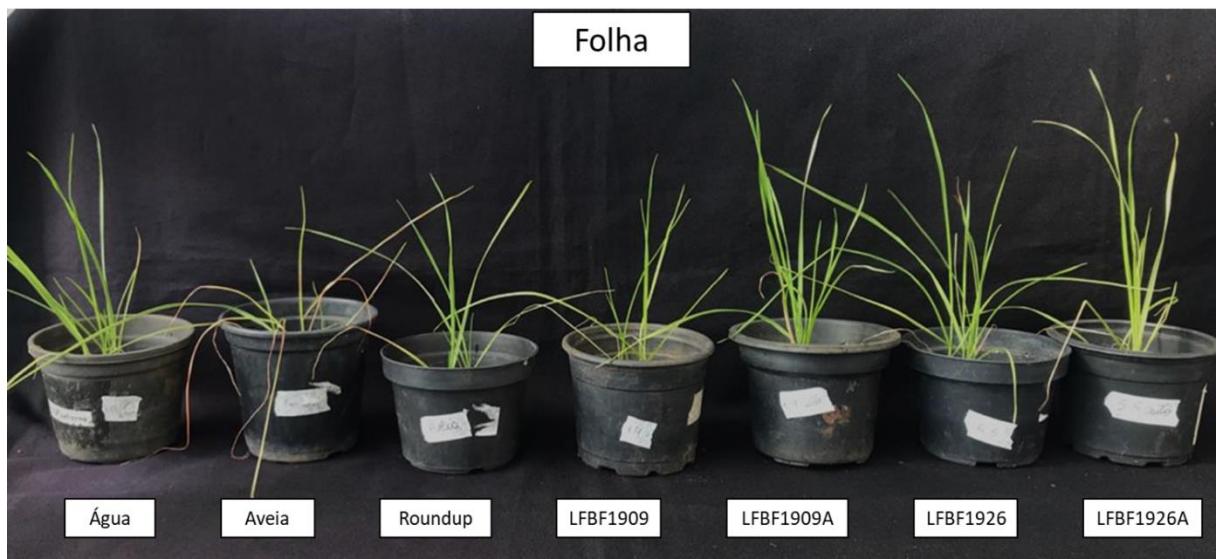


Figura 10 Plantas de *L. multiflorum* após inoculação em folha com LFBF1909 e LFBF1926. Foto tirada 7 dias após inoculação na folha. A= suspensão autoclavada

A Tabela 10 ilustra o comportamento observado no desenvolvimento de cada espécie de daninha ao longo dos experimentos realizados. Em geral, observou-se que a espécie *S. verticillata* apresentou uma germinação *in vitro* bem rápida, com sementes germinadas observadas já no segundo dia após o tratamento. Em casa de vegetação, essa espécie também demonstrou rápido desenvolvimento, sendo que entre 10-15 dias a planta já estava bem desenvolvida. A espécie *E. indica*, por sua vez, apresentou uma germinação *in vitro* um pouco mais lenta, sendo que o início da germinação foi observado apenas após o 3º dia de tratamento. Em condições de

casa de vegetação, o desenvolvimento dessa espécie foi bastante lento e instável, o que resultou na dificuldade da obtenção suficiente de plantas para a realização do experimento *in vivo*. Por fim, a espécie *L. multiflorum* apresentou germinação *in vitro* semelhante à *E. indica*, com início da germinação após o 3º dia do tratamento. Em casa de vegetação essa espécie demonstrou um rápido desenvolvimento, com cerca de 10 dias.

*Tabela 10 Comportamento observado em cada espécie de daninha em relação ao seu desenvolvimento *in vitro* e *in vivo**

	<i>In vitro</i>		<i>In vivo</i>	
	Germinação	Estabilização germinação	Germinação	Desenvolvimento
<i>Spermacoce verticillata</i>	2º dia	5 dias	rápida	10-15 dias
<i>Eleusine indica</i>	3º dia	10 dias	lenta	>25 dias
<i>Lolium multiflorum</i>	3º-4º dia	10 dias	rápida	10-15 dias

4.4 Seletividade para a cultura de soja

Quatro isolados foram utilizados como inoculo para se verificar a influência na germinação em plantas de soja, sendo os isolados LFBF1903, LFBF1913, LFBF1909 e LFBF1926. Todos esses isolados apresentaram inibição de germinação em ao menos uma espécie de daninhas *in vitro* superior a 75%. Os tratamentos não apresentaram efeito negativo na germinação de sementes de soja, mantendo a germinação estatisticamente semelhante ao controle água ou superior à média de germinação em água (Vide tabela 11; Figura 11). Os tratamentos LFBF1909 e Roundup tiveram germinação superior a água, com média de 92% e 94%, respectivamente (Tabela 11). A cultivar de soja utilizada para o teste, TMG 7062 IPRO, é resistente ao herbicida Roundup devido à sua capacidade de produzir altos níveis a enzima 5-enolpiruvilshiquimato 3-fosfato sintase (EPSP), uma enzima responsável pela produção de aminoácidos essenciais para o crescimento da planta (TMG, 2020). Possivelmente, por essa maior produção enzimática, não se observou um efeito danoso na semente, e sim, uma melhor germinação. Ainda, pode-se dizer que o isolado LFBF1909 se torna ainda mais promissor para utilização em estudos

posteiros com potencial bio-herbicida. Ainda, na Tabela 11 também é possível se observar a média de sementes germinadas, não germinadas e anormais.

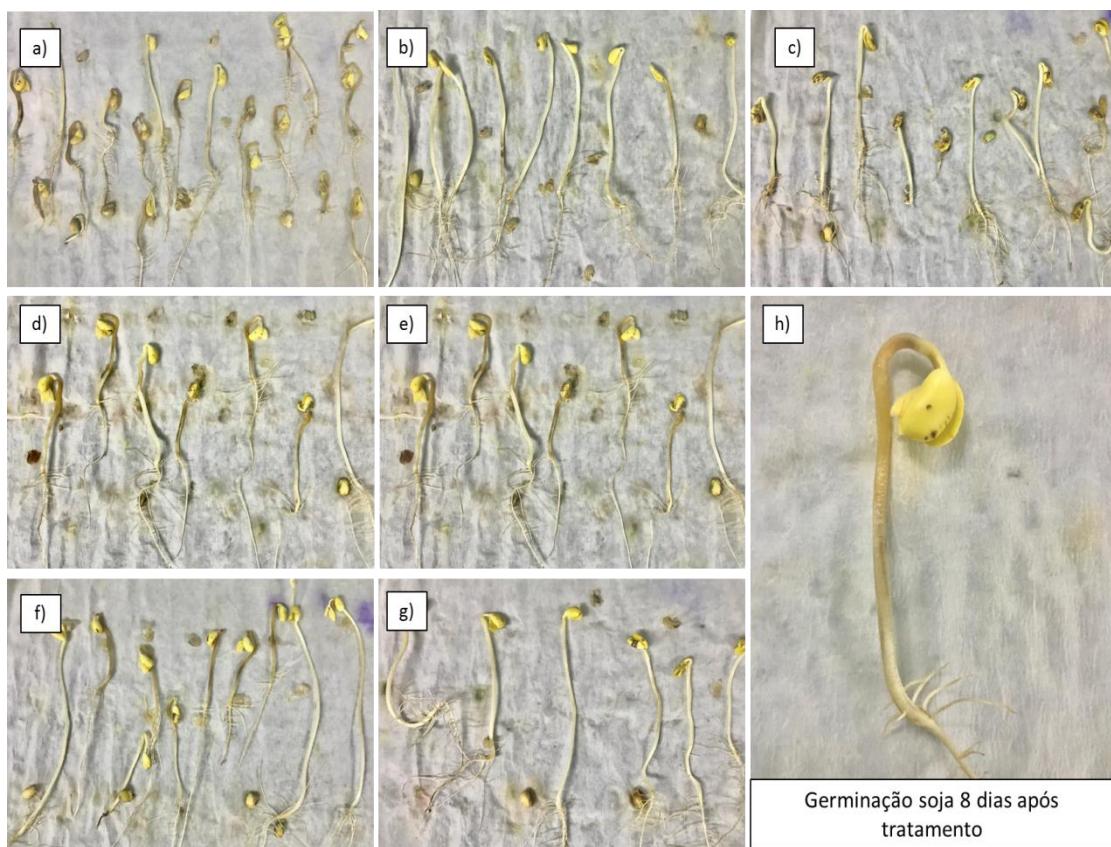


Figura 11 Teste de germinação *in vitro* com sementes de soja com 8 dias após o tratamento com a) água, b) meio de aveia líquido, c) Roundup, d) LFBF1909, e) LFBF1913, f) LFBF 1926 e g) LFBF1909. H) Foto aproximada de uma semente germinada tratada com água (a).

Tabela 11 Média de germinação e anormalidades* de sementes de soja de um total de 25 sementes após 7 dias da inoculação com os isolados de *Streptomyces* LFBF 1903, LFBF1913, LFBF1926 e LFBF1909

Tratamento	Total de Germinadas		Germ. Anormais		Não germinadas	
	Média	%	Média	%	Média	%
AGUA	22,13 a	88,5%	0,00	0,0%	2,88	11,5%
AVEIA	21,63 a	83,5%	0,75	3,0%	3,38	13,5%
ROUNDUP	23,50 b	94,0%	0,00	0,0%	1,50	6,0%
LFBF1903	21,63 a	84,5%	0,50	2,0%	3,38	13,5%
LFBF1913	21,63 a	85,0%	0,38	1,5%	3,38	13,5%
LFBF1926	21,63 a	84,0%	0,63	2,5%	3,38	13,5%
LFBF1909	23,13 b	92,0%	0,13	0,5%	1,88	7,5%

*Anormais foram consideradas como germinadas, porém não se desenvolveram bem ou apresentaram algum tipo de podridão

Os resultados nesse ensaio demonstraram que os quatro isolados testados poderiam ser utilizados no campo de soja nem nenhum efeito prejudicial na germinação da cultura de interesse.

4.5 Considerações finais

Os resultados estão em concordância com DHANASEKARAN et al. (2010) que mostraram o potencial de diversos actinomicetos com efeito herbicida. Os actinomicetos são considerados os principais produtores de enzimas, vitaminas e metabólitos secundários e o gênero *Streptomyces* se destaca como produtor de uma diversidade de metabólitos (NASCIMENTO et al., 2014). Além disso, já é documentado que a ação herbicida por agentes biológicos pode ocorrer por diversos motivos, dentre eles a ação dos componentes presentes nos metabólitos secundários que visam a inibição de biossínteses nas plantas (SHI et al., 2020). A fitotoxicidade dos metabólitos pode variar nos sítios de ação específicos, assim como podem variar em espécies diferentes de daninhas (TODERO et al., 2018) o que pode ser uma vantagem, pois a diversidade previne a ocorrência de resistências futuras. Estudos anteriores também demonstram o potencial de *Streptomyces* na inibição da germinação de *Phelipanche aegyptiaca* em tomateiro (CHEN et al., 2020). A utilização de microrganismos que já estão presentes no solo, como agentes biológicos de daninhas pode ser benéfico, pois os mesmos já possuem uma importante função no controle do fitopatógenos devido às suas atividades antimicrobianas (ZHANG et al., 2013).

Ainda, é importante ressaltar que, apesar apenas oito isolados apresentarem redução maior 75% na inibição, outros isolados com inibição 50-75%, ainda podem ser explorados como possíveis agentes biológicos para a redução da população. Como citado em tópicos anteriores, um manejo de daninhas mais eficiente é aquele que utiliza o Manejo Integrado de Plantas Daninhas (MIPD), ou seja, o uso da combinação de ferramentas para contenção, redução e, se necessário, a erradicação somente das daninhas que apresentam alta nocividade (VICTORIA, 2019).

Visto que no Brasil ainda não há nenhum produto biológico para o controle de daninhas disponível no mercado, pesquisas nessa área são promissores e

importantes para o desenvolvimento de novas tecnologias para a agricultura. A microbiota do solo é bastante vasta e a triagem de potenciais microrganismos com atividades benéficas é de grande importância para o aprimoramento de pesquisas e futuro desenvolvimento de novos produtos. Pesquisas adicionais ainda são necessárias para se avaliar a eficiência de todos os isolados em campo, assim como a determinação de doses mais eficazes.

5. CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste trabalho demonstraram que oito, dentre os isolados utilizados, apresentaram eficiência como agentes herbicidas, com inibição de germinação acima de 50% em 3 diferentes espécies daninhas quando testados *in vitro*, sendo eles LFBF1901, LFBF1906, LFBF1912, LFBF1928, LFBF1903, LFBF1909 LFBF1913, e LFBF1926. Em experimentos *in vivo*, dentre os quatro isolados testados, IBFBF2507, LFBF1901, LFBF1909 e LFBF1926, os dois últimos exibiram algum potencial herbicida em tratamento foliar. Sabendo-se que os resultados que demonstraram maior potencial herbicida foram àqueles conduzidos em sementes de daninhas *in vitro*, sugere-se que a ação dos microrganismos pode ser mais eficaz se utilizados como produtos pré-emergência na agricultura.

Finalmente, mais pesquisas são necessárias para o aprimoramento de métodos e doses mais eficazes na inibição de germinação.

6. PESQUISAS FUTURAS

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, pesquisas futuras deverão ser realizadas com a utilização dos oito isolados que demonstraram melhor eficiência como agentes bioherbicida (isolados em roxo na Tabela 6). Para isso, sugere-se a repetição dos experimentos de germinação *in vitro*, assim como a condução de novos experimentos de germinação *in vivo*, com tratamento do solo revolvido ou tratamento na superfície do solo. Adicionalmente, experimentos de verificação de controle em pós-emergência poderiam ser conduzidos com os demais isolados que demonstraram ação herbicida *in vitro* porém não foram testados *in vivo*.

7. REFERÊNCIAS

- ABCBIO. **Produtos biológicos de controle registrados no Brasil desde 2005.** Disponível em: <<https://www.abcbio.org.br/biodefensivos-registrados/>>. Acesso em: 17 abr. 2020.
- ADEGAS, F. S.; VARGAS, L.; GAZZIERO, D. L. P.; KARAM, D.; SILVA, A. F. DA; AGOSTINETTO, D. Impacto econômico da resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil. **Embrapa Soja. Circular técnica, 132**, v. 132, p. 11 p., 2017.
- AGROFIT. **AGROFIT Consulta Aberta.** Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 30 abr. 2020.
- AGROLINK. **Bula Roundup Original DI.** Disponível em: <https://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/produto/roundup-original-di_8749.html>. Acesso em: 30 abr. 2020.
- AMARANTE, O. P de. et al. Breve revisão de métodos de determinação de resíduos do herbicida ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D). **Quimica Nova**, v. 26, n. 2, p. 223–229, 2003.
- ANVISA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA).** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-de-agrotoxicos-para>>. Acesso em: 26 abr. 2020.
- ARAI, M. et al. Herbicidins A and B, two new antibiotics with herbicidal activity. I. Producing organism and biological activities. **The Journal of antibiotics**, v. 29, n. 9, p. 863–869, 1976.
- BAPTISTELLA, J. L. C. **CUSTO DE PRODUÇÃO DE SOJA 2019/20.** Disponível em: <<https://blog.aegro.com.br/custo-de-producao-de-soja-2019-20/>>. Acesso em: 18 abr. 2020.
- BÉRDY, J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. **Journal of Antibiotics**, v. 65, n. 8, p. 385–395, 2012.
- BO, A. B. et al. Isolation, identification and characterization of *Streptomyces* metabolites as a potential bioherbicide. **PLoS ONE**, v. 14, n. 9, p. 1–18, 2019.

BRASIL. Teste de germinação. In: Regras para Análise de Sementes. 1 edição. **MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária.** Brasília, pg 147-224, 2009.

BRENCHLEY, W. E. **Weeds of farm land.** New York: Longmans, Green and co., 1920.

BRUNDTLAND, G. H. Our Common Future, From One Earth to One World. **World Commission on Environment and Development.** Oslo: 1987.

CARVALHO, R., ROSSI, C., DEMANT L. R. S. Manejo da resistência. **Comitê de Ação a Resistencia aos Herbicidas**, 2019. Disponível em: <<https://www.hrac-br.org/>>. Acesso em: 17 mai 2020.

CHATER, K. F. Recent advances in understanding *Streptomyces*. **F1000Research**, v. 5, p. 2795, 30 nov. 2016.

CHEN, J. et al. *Streptomyces pactum* may control *Phelipanche aegyptiaca* in tomato. **Applied Soil Ecology**, v. 146, n. 26, p. 103369, 2020.

CHRISTOFFOLETI, P. J. Aspectos de Resistência de Plantas Daninhas a Herbicidas. 4. ed. Piracicaba, SP: HRAC-BR, **Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas Daninhas a Herbicidas**, 2016. v. 4

CHRISTOFFOLETI, P. J.; VICTORIA FILHO, R.; SILVA, C. B. DA. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Planta Daninha**, v. 12, n. 1, p. 13–20, 1994.

CORDEAU, S. et al. Bioherbicides: Dead in the water? A review of the existing products for integrated weed management. **Crop Protection**, v. 87, p. 44–49, 2016.

CORREIA, N. M.; REZENDE, P. M. DE. Resistência de plantas daninhas a herbicidas. **Ainfo-EMBRAPA**. Lavras: Editora UFLA, 2002.

CROPLIFE. O Brasil se destaca no mercado de Controle Biológico. **Croplife Brasil**. Disponível em: <<https://croplifebrasil.org/noticias/brasil-se-destaca-no-mercado-de-controle-biologico/>>. Acesso em: 26 abr. 2020.

DHANASEKARAN, D.; THAJUDDIN, N.; PANNEERSELVAM, A. Herbicidal agents from actinomycetes against selected crop plants and weeds. **Natural Product Research**, v. 24, n. 6, p. 521–529, 2010.

EMBRAPA. Soja em números (safra 2018/19). **EMBRAPA Soja**. Disponível em:

<<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acesso em: 18 abr. 2020.

EMERSON, R. W. Fortune of the republic. Boston, Houghton, Osgood and company, 1978.

FAO. FAOSTAT Compare Data. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#compare>>. Acesso em: 26 abr. 2020.

FIOCRUZ. Casos de Intoxicação por Agrotóxicos de Uso Agrícola por Unidade Federada. **Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas**. Disponível em: <https://sinitox.icict.fiocruz.br/sites/sinitox.icict.fiocruz.br/files//2-AgrotoxicosUsoAgricola-1_1.pdf>. Acesso em: 26 abr. 2020.

FONTANELI, R. S.; SANTOS, H. P.; FONTANELI, R.S.; OLIVEIRA, J. T. de; LEHMEN, R. I.; DREON, G. Gamíneas forrageiras anuais de inverno. In: FONTANELI, R. S.; SANTOS, H.P. dos; FONTANELI, R. S. Forrageiras para integração lavoura-pecuária-floresta na região sul-brasileira. Passo Fundo: **Embrapa Trigo**, p. 139–143, 2012.

GALON, L. et al. Biological weed management – A short review. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 15, p. 116–125, 2016.

GARCIA, E. O. Resistência de cultivares de batata (*Solanum tuberosum*) à sarna comum (*Streptomyces* spp.) e mecanismo de ação da fitotoxina taxomina A em sorgo (*Sorghum bicolor*): aspectos bioquímicos e ultraestruturais. **Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo. Pós-graduação em fitopatologia ESALQ/USP**, p. 1- 93, 2008.

GIRARDELI, A. L. O que você deveria saber sobre a vassourinha-de-botão. **Mais Soja, 02 ago 2019**. Disponível em <<https://maissoja.com.br/o-que-voce-deveria-saber-sobre-a-vassourinha-de-botao/>>. Acesso em. 26 abr. 2020.

GOMES JR., F. G.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Biologia e manejo de plantas daninhas em áreas de plantio direto. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 26, n 4, p. 789-798, 2008. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-83582008000400010&lng=en&nrm=iso>. access on 17 May 2020.

HARRIS, P. Invitation paper (CP Alexander fund): classical biocontrol of weeds: its

definition, selection of effective agents, and administrative-political problems. **The Canadian Entomologist**, v. 123, n. 4, p. 827–849, 1991.

HEAP, I. **The International Herbicide-Resistant Weed Database**. Disponível em: <<http://www.weedscience.org/Home.aspx>>. Acesso em: 20 maio. 2020.

IGARASHI, M. et al. Resormycin, a novel herbicidal and antifungal antibiotic produced by a strain of *Streptomyces platensis*. II. Structure elucidation of resormycin. **Journal of Antibiotics**, v. 50, n. 12, p. 1026–1031, 1997.

JI, Y. G. et al. The status and potential using of bacterial herbicides. **Biotechnol**, v. 16, p. 88–90, 2006.

JIANG, G. et al. High-Yield Production of Herbicidal Thaxtomins and Thaxtomin Analogs in a Nonpathogenic *Streptomyces* Strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 11, 1 jun. 2018.

JUNIOR, P. F. Uma visão estratégica. **Agroanalysis ABCBio**, p. 34–43, set. 2015.

KALSING, A.; VIDAL, R. A. Nível de dano econômico aplicado à herbologia: Revisão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, [s.i.], v.20, dec. 2010 Disponível em: <<https://revistas.ufpr.br/pesticidas/article/view/20476>>. Acesso em: 17 mai 2020.

KLAIC, R. et al. An overview regarding bioherbicide and their production methods by fermentation **Fungal Biomolecules**: Wiley Online Books., 25 fev. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/9781118958308.ch14>>. Acesso em: 17 mai 2020.

LERAT, S. et al. *Streptomyces scabiei* and its toxin thaxtomin A induce scopoletin biosynthesis in tobacco and *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Reports**, v. 28, n. 12, p. 1895–1903, 2009.

LORENZI, H. Plantas Daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 4. ed. Nova Odessa, SP: **Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, 2008.

LORIA, R.; KERS, J.; JOSHI, M. Evolution of Plant Pathogenicity in *Streptomyces*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, n. 1, p. 469–487, 8 ago. 2006.

MALLIK, M. A. B. Selective isolation and screening of soil microorganisms for metabolites with herbicidal potential. **Journal of crop production**, v. 4, n. 2, p. 219–236, 2001.

MARRONE, P. Three New Bio-herbicides. MARRONE Bio Inovation-Company Presentation. Disponível em:

<https://www.abim.ch/fileadmin/abim/documents/presentations2012/ABIM_2012_3_Marrone_Pam.pdf>. Acesso em: 20. mai. 2020

MEDEIROS, F. H. V. DE; SILVA, J. C. P. DA; PASCHOLATI, S. F. Controle biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia princípios e conceitos**. 5. ed., p. 261–272. Ouro Fino- MG: Agronômica Ceres, 2018.

NAKAJIMA, M. et al. Hydantocidin: a new compound with herbicidal activity from *Streptomyces hygroscopicus*. **The Journal of antibiotics**, v. 44, n. 3, p. 293–300, 1991.

NASCIMENTO, T. P. et al. Produção de biocompostos com atividade antimicrobiana de *Streptomyces* spp. ante isolados de mastite caprina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 66, n. 1, p. 101–108, 2014.

OLIVEIRA, M. F. DE; BRIGHENTI, A. M. Controle de plantas daninhas: métodos físico, mecânico, cultural, biológico e alelopatia. 1^a ed. Brasília, DF: **Embrapa Milho e Sorgo**, 2018.

PAULA, S. DE. Taxtamina parcialmente purificada e preparações de *Streptomyces scabies* na indução de resistência em soja à *Phakopsora pachyrhizi*. **Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.

PINTO, L. R. Taxtamina A no controle dos vírus do mosaico do pepino e do mosaico amarelo em abobrinha de moita e da podridão mole (*Rhizopus stolonifer*) em uva. **Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

ROMAN, E. S. et al. Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação. Passo Fundo: Gráfica Editora Berthier p. 1–152, 2005.

SANTOS, D. P. DOS et al. Determinação de espécies bioindicadoras de resíduos de herbicidas auxílicos. **Revista Ceres**, v. 60, n. 3, p. 354-362, 2013.

SCHAAD, N.W., JONES, J.B., CHUN, W. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3. ed. St Paul, USA: **American Phytopathology Society Press**, 2001.

SHI, L. et al. Herbicidal Secondary Metabolites from Actinomycetes: Structure Diversity, Modes of Action, and Their Roles in the Development of Herbicides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 1, p. 17–32, 2020.

SINGH, H. et al. Screening of endophytic actinomycetes for their herbicidal activity. **Annals of Agrarian Science**, v. 16, n. 2, p. 101–107, 2018.

SMITH, H. S. On Some Phases of Insect Control by the Biological Method. **Journal of Economic Entomology**, v. 12, n. 4, p. 288–292, 1 ago. 1919.

STEFFEN, G. P. K.; STEFFEN, R. B.; ANTONIOLLI, Z. I. Contaminação do solo e da água pelo uso de agrotóxicos. **Tecno-logica**, v. 15, n. 1, p. 15–21, 2011.

TREMACOLDI, C. R.; FILHO, A. P. S. S. Toxinas Produzidas por Fungos Fitopatógenos: Possibilidades de Uso no Controle de Plantas Daninhas. **EMBRAPA Amazônia Oriental**. Belém, 2006

TE BEEST, D. O.; YANG, X. B.; CISAR, C. R. The status of biological control of weeds with fungal pathogens. **Annual review of phytopathology**. Vol. 30, n. 1, p. 637–657, 1992.

TMG. **Intacta RR2 PRO**. Disponível em: <<http://www.intactarr2pro.com.br/intacta-rr2-pro/>>. Acesso em: 9 maio. 2020.

TODERO, I. et al. Formulation of a bioherbicide with metabolites from *Phoma* spp. **Scientia horticulturae**, v. 241, p. 285–292, 2018.

VAN DEN BOSCH, R.; MESSENGER, P. S.; GUTIERREZ, A. P. **An introduction to biological control**. New York: Plenum Press, 1982.

VARGAS, L. et al. Azevém resistente: manejo e controle. In: **Embrapa Trigo-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: **COLÓQUIO INTERNACIONAL SOBRE PLANTAS DANINHAS RESISTENTES A HERBICIDAS**, 2., 2015, Jaboticabal: Unesp, 2015. Palestras, p. 13-17, 2015

VASCONCELOS, MARIA DA CONCEIÇÃO COSTA DE; SILVA, A. F. A. DA; LIMA, R. DA SI. Interferência de plantas daninhas sobre plantas cultivadas. **Agropecuária**

científica no semiárido, v. 8, n. 1, p. 1–6, 2012.

VICTORIA, R. Estratégias de Manejo de Plantas Daninhas. In: ZAMBOLIM, L., CONCEIÇÃO, M. Z., SANTIAGO, T. O que os engenheiros agrônomos devem saber para orientar o uso de produtos fitossanitários. Cap 9. 3^a Ed. UFV, 2008.

WSSA. Biological Control of Weeds - It's a Natural!. Biological Weed Control Committee of the Weed Science Society of America., [s.d.].

WSSA. **WSSA GLOSSARY TERMS AND DEFINITIONS**. Disponível em: <<http://wssa.net/wssa/wssa-glossary/>>. Acesso em: 17 abr. 2020.

ZHANG, H. Y. et al. Effects of actinomycetes agent on ginseng growth and rhizosphere soil microflora. **Ying yong sheng tai xue bao= The journal of applied ecology**, v. 24, n. 8, p. 2287–2293, 2013.

APÊNDICES

Tabela 1. Dados com números gerais da germinação de daninhas dos ensaios *in vitro* de todas as repetições.

Tratamento	<i>S. verticillata</i>		<i>E. indica</i>		<i>L. multiflorum</i>		<i>S. verticillata</i>		<i>E. indica</i>		<i>L. multiflorum</i>	
	E1	E2	E1	E2	E1	E2	E1	E2	E1	E2	E1	E2
Agua	19	22	12	10	23	21	19	21	3	1	0	24
Agua	15	16	10	11	21	15	7	0	0	0	0	12
Agua	18	36	10	7	21	18	9	3	17	22	22	18
Aveia	17	13	11	8	25	26	12	1	13	32	20	26
Aveia	26	29	4	15	29	26	12	4	9	12	13	15
Aveia	22	14	14	9	21	25	10	8	18	21	17	16
Roundup	1	10	0	0	0	0	0	0	8	24	8	25
Roundup	3	2	0	0	0	0	0	0	4	8	24	8
Roundup	5	10	0	0	0	0	0	0	7	6	12	26
LFBF1903	1	23	1	4	9	20	13	9	1	11	15	15
LFBF1903	1	1	1	9	17	14	14	11	4	6	25	13
LFBF1903	1	1	1	1	7	9	15	15	23	8	15	24
IBSBF25087	14	14	14	14	21	21	19	7	13	19	16	17
IBSBF25087	15	15	11	11	11	11	11	14	12	17	18	25
IBSBF25087	9	9	11	11	14	14	14	11	9	11	27	22
LFBF1909	9	5	0	0	0	0	0	0	21	12	8	23
LFBF1909	11	12	0	0	0	0	0	0	14	15	6	23
LFBF1909	5	11	0	0	0	0	0	0	9	2	15	13
LFBF1910	2	10	10	10	20	20	19	19	12	1	10	16
LFBF1910	9	7	17	17	19	19	19	19	3	5	11	29
LFBF1910	8	9	12	12	16	18	13	13	21	0	0	4
LFBF1910	11	16	5	19	24	13	19	3	0	0	0	6
LFBF1905	16	10	9	10	26	19	19	14	4	0	0	1
LFBF1905	7	13	5	18	32	14	14	11	0	0	0	5
LFBF1912	8	8	9	0	26	14	13	11	11	17	17	14
LFBF1912	5	10	4	0	26	17	12	12	12	12	19	15
LFBF1912	13	12	8	0	14	13	9	11	9	11	22	15

Tabela 2. Dados gerais de massa seca e massa fresca de todas as repetições do ensaio conduzido em casa de vegetação com *S. verticillata*. Tratamentos feitos no solo e na folha com a utilização dos isolados IBSBF2507 e LFBF1901, ambos com suspensão autoclavada (A) e não autoclavada (S)

Tratamento	Solo			Folha			Solo			Folha		
	Peso Fresco	Peso seco	Peso seco	Peso fresco	Peso seco	Peso seco	Peso Fresco	Peso seco	Peso seco	Peso fresco	Peso seco	Peso seco
Água	3,84	0,37	2,06	0,17	IBSBF25087 S	1,63	0,14	1,8	0,14	0,14	0,14	0,14
Água	2,63	0,26	1,22	0,12	IBSBF25087 S	1,08	0,13	1,13	0,13	0,13	0,15	0,15
Água	0,51	0,08	0,87	0,09	IBSBF25087 S	1,11	0,1	1,31	0,1	0,1	0,11	0,11
Água	2,5	0,21	0,82	0,07	IBSBF25087 S	0,93	0,13	1,89	0,13	0,13	0,18	0,18
Água	1,58	0,17	3,11	0,32	IBSBF25087 S	1,36	0,15	2,03	0,15	0,15	0,21	0,21
Água	1,25	0,11	2,31	0,17	IBSBF25087 A	1,23	0,13	0,32	0,13	0,13	0,02	0,02
Água	0,54	0,05	2,3	0,24	IBSBF25087 A	0,86	0,1	1,3	0,1	0,1	0,12	0,12
Água	1,08	0,08	1,88	0,2	IBSBF25087 A	1,34	0,16	0,94	0,16	0,16	0,08	0,08
Água	1,1	0,09	1,93	0,22	IBSBF25087 A	2,04	0,19	0,61	0,19	0,19	0,05	0,05
Água	2,3	0,23	2,91	0,29	IBSBF25087 A	0,54	0,04	0,42	0,04	0,04	0,03	0,03
Aveia	2,58	0,24	3,51	0,33	IBSBF25087 A	2,09	0,2	2,14	0,2	0,2	0,18	0,18
Aveia	0,93	0,08	0,63	0,09	IBSBF25087 A	4,42	0,38	1,93	0,38	0,38	0,17	0,17
Aveia	0,64	0,06	2,04	0,16	IBSBF25087 A	1,77	0,17	3,03	0,17	0,17	0,28	0,28
Aveia	0,37	0,04	3,03	0,26	IBSBF25087 A	1,95	0,17	0,29	0,17	0,17	0,02	0,02
Aveia	0,71	0,07	0,57	0,07	IBSBF25087 A	1,06	0,14	0,54	0,14	0,14	0,06	0,06
Aveia	0,59	0,06	1,6	0,15	LFBF1901 S	1,78	0,17	0,01	0,17	0,17	0,01	0,01
Aveia	2,52	0,25	1,2	0,14	LFBF1901 S	1,23	0,08	1,87	0,08	0,08	0,21	0,21
Aveia	1,91	0,2	2,22	0,22	LFBF1901 S	2,44	0,23	2,95	0,23	0,23	0,31	0,31
Aveia	0,47	0,04	1,24	0,15	LFBF1901 S	0,73	0,06	2,35	0,06	0,06	0,25	0,25
Aveia	0,55	0,06	1,45	0,14	LFBF1901 S	0,64	0,05	0,99	0,05	0,05	0,1	0,1
Roundup	0,08	0,01	0,07	0,02	LFBF1901 S	2,42	0,23	0,85	0,23	0,23	0,09	0,09
Roundup	0,18	0,03	0,09	0,04	LFBF1901 S	1,88	0,2	1,1	0,2	0,2	0,1	0,1
Roundup	0,3	0,06	0,07	0,01	LFBF1901 S	3,13	0,26	2,24	0,26	0,26	0,24	0,24
Roundup	0,13	0,05	0,1	0,03	LFBF1901 S	2,85	0,26	1,91	0,26	0,26	0,22	0,22
Roundup	0,19	0,04	0,28	0,07	LFBF1901 S	2,13	0,2	3,83	0,2	0,2	0,37	0,37
Roundup	0,3	0,04	0,1	0,05	LFBF1901 A	1,64	0,17	2,78	0,17	0,17	0,25	0,25
Roundup	0,17	0,05	0,17	0,07	LFBF1901 A	0,37	0,03	0,48	0,03	0,03	0,04	0,04
Roundup	0,54	0,13	0,08	0,01	LFBF1901 A	0,89	0,07	1,07	0,07	0,07	0,1	0,1
Roundup	0	0	0	0	LFBF1901 A	1,98	0,19	1,86	0,19	0,19	0,27	0,27
Roundup	0	0	0	0	LFBF1901 A	1,56	0,13	1,66	0,13	0,13	0,17	0,17
IBSBF25087 S	2,63	0,23	1,68	0,15	LFBF1901 A	3,47	0,3	2,84	0,3	0,3	0,31	0,31
IBSBF25087 S	1,09	0,16	2,4	0,23	LFBF1901 A	0,85	0,1	2,27	0,1	0,1	0,19	0,19
IBSBF25087 S	0,79	0,12	1,61	0,14	LFBF1901 A	1,28	0,14	0,08	0,14	0,14	0,02	0,02
IBSBF25087 S	1,4	0,16	0,36	0,02	LFBF1901 A	0,95	0,1	1,86	0,1	0,1	0,22	0,22
IBSBF25087 S	1,24	0,16	0,82	0,08	LFBF1901 A	0,94	0,1	3,75	0,1	0,1	0,42	0,42

Tabela 3. Dados gerais de massa seca e massa fresca de todas as repetições do ensaio conduzido em casa de vegetação com *L. multiflorum*. Tratamentos feitos no solo e na folha com a utilização do isolado IBSBF2507, com suspensão autoclavada (A) e não autoclavada (S).

Tratamento	Solo fresco	Solo seco	Folha fresca	Folha seca
Agua	0,43	0,06	0,20	0,03
Agua	0,45	0,06	0,19	0,03
Agua	0,30	0,03	0,10	0,02
Agua	0,34	0,06	0,20	0,03
Agua	0,30	0,05	0,21	0,03
Agua	0,61	0,07	0,10	0,04
Agua	0,35	0,04	0,29	0,02
Agua	0,22	0,04	0,20	0,03
Agua	1,19	0,26	0,33	0,06
Agua	0,52	0,07	0,15	0,02
Aveia	0,24	0,04	0,16	0,02
Aveia	0,34	0,08	0,33	0,04
Aveia	0,28	0,04	0,28	0,05
Aveia	0,18	0,04	0,17	0,03
Aveia	0,32	0,05	0,26	0,04
Aveia	0,52	0,08	0,31	0,06
Aveia	0,54	0,08	0,21	0,03
Aveia	0,35	0,03	0,30	0,05
Aveia	0,23	0,05	0,29	0,04
Aveia	0,42	0,06	0,08	0,04
Roundup	0,03	0,01	0,01	0,01
Roundup	0,03	0,02	0,00	0,00
Roundup	0,01	0,01	0,01	0,00
Roundup	0,01	0,00	0,01	0,00
Roundup	0,01	0,01	0,02	0,01
Roundup	0,02	0,00	0,02	0,01
Roundup	0,01	0,00	0,01	0,00
Roundup	0,03	0,02	0,01	0,01
Roundup	0,03	0,02	0,01	0,00
Roundup	0,05	0,02	0,02	0,01
IBSBF25087 S	0,24	0,03	0,39	0,04
IBSBF25087 S	0,23	0,06	0,34	0,17
IBSBF25087 S	0,41	0,01	0,11	0,02
IBSBF25087 S	0,54	0,07	0,04	0,05
IBSBF25087 S	0,36	0,05	0,14	0,04
IBSBF25087 S	0,34	0,05	0,45	0,07
IBSBF25087 S	0,26	0,07	0,30	0,05
IBSBF25087 S	0,21	0,02	0,29	0,04
IBSBF25087 S	0,28	0,04	0,34	0,05
IBSBF25087 S	0,27	0,04	0,36	0,06
IBSBF25087 A	0,46	0,07	0,32	0,05
IBSBF25087 A	0,28	0,03	0,22	0,05
IBSBF25087 A	0,50	0,06	0,24	0,07
IBSBF25087 A	0,21	0,05	0,27	0,04
IBSBF25087 A	0,21	0,05	0,29	0,04
IBSBF25087 A	0,19	0,04	0,37	0,07
IBSBF25087 A	0,23	0,05	0,28	0,03
IBSBF25087 A	0,29	0,04	0,14	0,03
IBSBF25087 A	0,30	0,04	0,56	0,09
IBSBF25087 A	0,14	0,03	0,32	0,05

Tabela 4. Dados gerais de **massa seca** e **massa fresca** de todas as repetições do ensaio conduzido em casa de vegetação com *L. multiflorum*. Tratamentos feitos no solo e na folha com a utilização dos isolados LFBF1909 e LFBF1926, ambos com suspensão autoclavada (A) e não autoclavada (S).

Tratamento	Peso Fresco Folha	Peso Seco Folha	Peso Fresco Solo	Peso Seco Solo	Tratamento	Peso Fresco Folha	Peso Seco Folha	Peso Fresco Solo	Peso Seco Solo
H2O	0,17	0,04	0,25	0,02	LFBF1909	0,32	0,04	0,17	0,02
H2O	0,17	0,05	0,43	0,04	LFBF1909	0,21	0,02	0,22	0,01
H2O	0,7	0,07	0,18	0,02	LFBF1909	0,2	0,04	0,2	0,03
H2O	0,4	0,06	0,17	0,01	LFBF1909	0,19	0,01	0,26	0,03
H2O	0,21	0,05	0,27	0,02	LFBF1909	0,27	0,06	0,16	0,02
H2O	0,37	0,04	0,21	0,02	LFBF1909A	0,2	0,02	0,22	0,02
H2O	0,42	0,04	0,23	0,03	LFBF1909A	0,18	0,03	0,26	0,03
H2O	0,4	0,05	0,17	0,01	LFBF1909A	0,17	0,04	0,24	0,03
H2O	0,36	0,06	0,25	0,02	LFBF1909A	0,23	0,02	0,24	0,03
H2O	0,25	0,04	0,26	0,03	LFBF1909A	0,24	0,02	0,12	0,02
Aveia	0,27	0,03	0,32	0,05	LFBF1909A	0,14	0,01	0,31	0,05
Aveia	0,21	0,03	0,16	0,03	LFBF1909A	0,15	0,02	0,29	0,03
Aveia	0,16	0,02	0,22	0,04	LFBF1909A	0,24	0,03	0,25	0,03
Aveia	0,22	0,05	0,12	0,01	LFBF1909A	0,23	0,03	0,22	0,05
Aveia	0,3	0,04	0,16	0,02	LFBF1909A	0,22	0,02	0,18	0,03
Aveia	0,25	0,02	0,2	0,03	LFBF1926	0,3	0,03	0,30	0,03
Aveia	0,34	0,02	0,25	0,03	LFBF1926	0,2	0,02	0,20	0,02
Aveia	0,47	0,05	0,29	0,03	LFBF1926	0,14	0,01	0,14	0,03
Aveia	0,39	0,01	0,33	0,04	LFBF1926	0,19	0,02	0,19	0,02
Aveia	0,2	0,01	0,32	0,06	LFBF1926	0,24	0,02	0,24	0,01
Roundup	0,13	0,02	0,32	0,04	LFBF1926	0,14	0,01	0,14	0,03
Roundup	0,22	0,06	0,2	0,03	LFBF1926	0,17	0,01	0,17	0,02
Roundup	0,18	0,02	0,19	0,03	LFBF1926	0,25	0,03	0,25	0,01
Roundup	0,14	0,01	0,16	0,02	LFBF1926	0,19	0,03	0,19	0,02
Roundup	0,13	0,02	0,14	0,03	LFBF1926	0,16	0,03	0,16	0,03
Roundup	0,12	0,01	0,18	0,03	LFBF1926A	0,23	0,03	0,23	0,02
Roundup	0,13	0,03	0,17	0,02	LFBF1926A	0,24	0,03	0,24	0,02
Roundup	0,13	0,01	0,14	0,03	LFBF1926A	0,11	0,01	0,11	0,03
Roundup	0,12	0,01	0,17	0,03	LFBF1926A	0,14	0,02	0,14	0,03
Roundup	0,12	0,01	0,07	0,01	LFBF1926A	0,11	0,01	0,11	0,03
LFBF1909	0,17	0,02	0,3	0,02	LFBF1926A	0,14	0,02	0,14	0,04
LFBF1909	0,13	0,01	0,23	0,03	LFBF1926A	0,3	0,04	0,30	0,02
LFBF1909	0,25	0,03	0,2	0,02	LFBF1926A	0,22	0,06	0,22	0,03
LFBF1909	0,17	0,02	0,16	0,03	LFBF1926A	0,28	0,05	0,28	0,02
LFBF1909	0,26	0,03	0,2	0,02	LFBF1926A	0,17	0,03	0,17	0,03

Tabela 5. Dados de germinação de sementes de soja tratadas com os isolados LFBF1903, LFBF1913, LFBF1926, LFBF1909. Avaliação 8 DAI e cada repetição continha 25 sementes

Tratamento	Germinadas	Anormais	Não germinadas
H2O	21	0	4
H2O	23	0	2
H2O	22	0	3
H2O	21	0	4
H2O	22	0	3
H2O	22	0	3
H2O	23	0	2
H2O	23	0	2
AVEIA	20	3	2
AVEIA	21	0	4
AVEIA	22	2	1
AVEIA	22	0	3
AVEIA	21	0	4
AVEIA	21	1	3
AVEIA	20	0	5
AVEIA	20	0	5
ROUNDUP	24	0	1
ROUNDUP	23	0	2
ROUNDUP	24	0	1
ROUNDUP	23	0	2
ROUNDUP	23	0	2
ROUNDUP	24	0	1
ROUNDUP	23	0	2
ROUNDUP	24	0	1
LFBF1903	22	0	3
LFBF1903	22	1	2
LFBF1903	21	0	4
LFBF1903	23	0	2
LFBF1903	22	1	2
LFBF1903	22	0	3
LFBF1903	18	2	5
LFBF1903	19	0	6
LFBF1913	24	0	1
LFBF1913	20	1	4
LFBF1913	20	1	4
LFBF1913	20	1	4
LFBF1913	22	0	3
LFBF1913	23	0	2
LFBF1913	23	0	2
LFBF1913	18	0	7
LFBF1926	23	0	2
LFBF1926	22	0	3
LFBF1926	18	2	5
LFBF1926	21	2	2
LFBF1926	21	0	4
LFBF1926	22	0	3
LFBF1926	23	0	2
LFBF1926	18	1	6
LFBF1909	22	0	3
LFBF1909	22	0	3
LFBF1909	22	0	3
LFBF1909	25	0	0
LFBF1909	23	0	2
LFBF1909	23	1	1
LFBF1909	24	0	1
LFBF1909	23	0	2