
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NATÁLIA FERRAZ BERTACHINI SPELTRI

**REVELANDO O POTENCIAL DE
BIOCONTROLE DE FITOPATÓGENOS DA
SOJA (*Glycine max.* L) POR SEUS
ENDOFÍTICOS**



Rio Claro - SP

2021

NATÁLIA FERRAZ BERTACHINI SPELTRI

REVELANDO O POTENCIAL DE BIOCONTROLE DE FITOPATÓGENOS
DA SOJA (*Glycine max.* L) POR SEUS ENDOFÍTICOS

Orientadora: DERLENE ATTILI DE ANGELIS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de
Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau
de Licenciada e Bacharela em Ciências Biológicas

Rio Claro - SP

2021

S743r Speltri, Natália Ferraz Bertachini
Revelando o potencial de biocontrole de fitopatógenos da
soja (*Glycine max.* L) por seus endofíticos / Natália Ferraz
Bertachini Speltri. -- Rio Claro, 2021
56 p. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado e licenciatura -
Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Derlene Attili de Angelis

1. Microbiologia aplicada. 2. Controle biológico. 3.
Endofíticos do grão. 4. Holobiontes. 5. Bioeconomia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do
Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPe UNESP), pelo apoio financeiro que possibilitou que os objetivos desse projeto fossem atingidos, mesmo em meio ao caos da pandemia de Sars-Cov-2.

Agradeço à professora Derlene pela mentoria, você é mais que a orientadora desse projeto é a minha inspiração dessa arte maravilhosa de “produzir ciência”. Obrigada por me apoiar e proporcionar o melhor cenário para meu crescimento e desenvolvimento na pesquisa e estudo.

Agradeço à Caroline Jonas, amiga de laboratório, que me ensinou mais do que as técnicas de microbiologia, mas me deu suporte para caminhar com as minhas próprias pernas. Te dedico essa obra, pois ela não seria possível sem você.

Agradeço à equipe do LMA/Táxon Ambiental, Centro de Estudos Ambientais/ CEA Unesp Rio Claro e à equipe do CPQBA/ UNICAMP.

Agradeço ao sr. Thiago Samogin de Franceschi, da Fazenda Santa Cruz da Redenção, Santa Rita do Passa Quatro, SP, pela doação dos grãos de soja utilizadas nesse estudo. Nessa obra, obtivemos riquíssimas informações que contribuirão para o avanço científico.

Agradeço à Dr^a Alexandra Elbakyan (Criadora do SciHub) pelo acesso gratuito a milhões de artigos científicos e livros, que contribuíram significativamente para que esse trabalho pudesse acontecer.

A ciência pode ser difícil de entender. Pode desafiar opiniões que nutrimos. Quando seus produtos são colocados à disposição de políticos ou industrialistas, pode levar a armas de destruição em massa e a graves ameaças ao meio ambiente. Mas uma coisa é preciso reconhecer: ela cumpre a sua parte.

SAGAN, C. O mundo assombrado pelos demônios: A ciência vista como uma vela no escuro [tradução]. São Paulo: Companhia das letras, 2006.

RESUMO

Atualmente, a soja (*Glycine max*. L) é o cultivar mais rentável para o agronegócio nacional e internacional. Em 2020, o Brasil se tornou o maior produtor do mundo representando 36% da produção mundial. Apesar da alta produtividade, a soja é susceptível a diversas pragas e fitopatógenos que acometem os cultivares e ameaçam a produção e a rentabilidade. Esse contexto, coloca o mercado em alerta e incentiva pesquisas na área do biocontrole, como uma alternativa sustentável, rentável e ecologicamente assertiva à utilização de pesticidas. O controle biológico, investiga o uso de inimigos naturais para controlar os agentes causais das doenças. Os microrganismos endofíticos por sua vez, representam um promissor campo de investigação pois realizam associações mutualistas tão íntimas que evoluíram para uma unidade, os holobiontes. Sobretudo, os endofíticos de sementes que são indispensáveis nos estágios iniciais de desenvolvimento da planta. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi isolar, purificar e caracterizar os microrganismos endofíticos do grão de soja, banhados com fungicida sintético Coopermax TB, para revelar os potenciais antagonistas dos fitopatógenos *Phytophthora sojae*, *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum truncatum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Os microrganismos foram isolados em meio sólido BDA, MA2% e AA e recuperou-se o total de 62 microrganismos, sendo 38 fungos e 24 bactérias. Dentre os fungos, o gênero *Penicillium* foi o mais abundante (n=9), seguido dos Fungos Hialinos Não Esporulantes e Fungos Dematiáceos Não Esporulantes (n=8 e n=5, respectivamente). Dentre as bactérias, os Coco Gram+ e Bastonetes Gram+, foram os mais frequentes (n=7 e n=5, respectivamente). Os testes de antagonismo relevaram 3 fungos e 2 bactérias como antagonistas de todos os fitopatógenos testados: *Penicillium* sp. (FUN54), FHNE (FUN20), *Epicoccum* sp. (FUN7), Coco Gram+ (BAC4) e Bastonete Gram+ (BAC13). A partir desses resultados, ressaltamos que essa pesquisa contribuiu significativamente com potenciais candidatos para o desenvolvimento de um consórcio microbiano, visando um produto para manejo integrado, além da possibilidade de bioprospecção de biomoléculas, de interesse para o agronegócio.

Palavras-chave: Microbiologia aplicada; Controle Biológico; Endofíticos do grão; Holobiontes; Bioeconomia

ABSTRACT

Nowadays, soybean (*Glycine max.* L) is the most profitable commodity for national and international agribusiness. In 2020, Brazil become the largest producer of this crops, reaching for 36% of world production. Despite its high productivity, soybean is susceptible to several pests and phytopathogens that affect the cultivars, threatening production and profitability. This is an alert on the market and encourages research in the area of biocontrol as a sustainable, profitable and ecologically assertive alternative to the use of pesticides. Biocontrol, investigates the use of natural enemies to control the causal agents of diseases. Endophytic microbiome represents a promising field of investigation since microorganisms and plants perform intimate mutualistic associations that evolved into an unit, the holobionts. Given the background, the objective of this work was to isolated, purified and characterized endophytes from soybean, treated with the synthetic fungicide Coopermax TB, to reveal potential antagonists to the phytopathogens *Phytophthora sojae*, *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum truncatum*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia sclerotiorum*. The isolates grew on BDA, MA2% and AA media and a total of 62 microorganisms were recovered of which 38 fungi and 24 bacteria. Among the fungi, the genus *Penicillium* was the most abundant (n=9), followed by Non-Sporulating Hyaline Fungi and Non-Sporulating Dematiaceous Fungi (n=8 and n=5, respectively). Among the bacteria, Gram + Cocci and Gram + Bacilli were the most frequent (n=7 and n=5, respectively). The tests revealed 3 fungi and 2 bacteria as antagonists to all tested phytopathogens: *Penicillium* sp. (FUN54), FHNE (FUN20), *Epicoccum* sp. (FUN7), Cocci Gram + (BAC4) and Bacilli Gram + (BAC13). From these results, we emphasize that this research contributed significantly with potential candidates for the development of a microbial consortium, aiming at a product for integrated management, besides the possibility of bioprospecting biomolecules of interest to agribusiness.

Keywords: Applied microbiology; Biological control; Seed endophytes; Holobiont; Bioeconomy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1. Produção de soja no Brasil e no mundo	9
2.2. Controle Biológico	12
2.3 Microbioma mutualista.....	16
2.4 Fitopatógenos da soja	18
3. OBJETIVOS	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1. Isolamento de microrganismos endofíticos	21
4.2. Purificação	22
4.2.1. Purificação de fungos	23
4.2.2. Purificação de bactérias	24
4.3. Caracterização morfológica.....	26
4.3.1. Caracterização de Fungos	26
4.3.2. Caracterização de Bactérias.....	27
4.3.3. Caracterização dos Fitopatógenos	28
4.4. Preservação	29
4.5. Teste de Antagonismo	29
4.5.1. Teste de antagonismo: fungos	30
4.5.2 Teste de antagonismo: bactérias	31
5. RESULTADOS	32
5.1. Isolamento	32
5.2. Identificações de fungos filamentosos endofíticos.....	32
5.3. Identificações e classificações das bactérias	34
5.4. Caracterização dos fitopatógenos	35
5.5. Teste de Antagonismo	37
5.5.1. Antagonistas fúngicos.....	37
5.5.2. Antagonistas bacterianos	41
6. DISCUSSÕES	44
7. CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS	50

1. INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca como protagonista na produção de alimentos de amplo consumo mundial sendo sua principal fonte de receita. Dentre eles, podemos destacar a soja brasileira que representou 31% da produção mundial na safra 2018/2019 (EMBRAPA SOJA, 2019). O relatório de março de 2020 do monitoramento agrícola realizado pelo CONAB afirmou que o crescimento da safra 2019/2020 foi 2,6% maior que a última temporada, 124,2 milhões t. A safra 2020/21 despertou incertezas pelo atraso na chuva, contudo a produção foi de 133,6 milhões t, significando um aumento de 7% em relação à safra anterior (CONAB, 2020).

Cabe ressaltar que a soja proporciona também alta empregabilidade para a população. Em 2006 o setor contava com cerca de 1,9 milhões de funcionários e em 10 anos (2016) aumentou para aproximadamente 2,9 milhões de empregados no Centro-Oeste Brasileiro, segundo Soares (2019).

Apesar do promissor cenário econômico da soja no Brasil, encontramos uma preocupante instabilidade econômica no setor, uma vez que os cultivares são alvos de patógenos, geralmente muito agressivos. O produtor, frente às adversidades da perda de produção, acaba utilizando agrotóxicos, fertilizantes ou qualquer produto que prometa proteger a cultura de danos. Por vezes compra-se os grãos tratados com esses produtos, mas nem sempre as expectativas são atingidas.

No mercado, uma gama de pesticidas e fertilizantes sintéticos estão disponíveis para comercialização, visando fornecer nutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento da planta e proteger os cultivares. Contudo, esses produtos químicos são vias importantes que promovem o acúmulo e aumento da concentração de metais pesados no solo (QIN *et al.*, 2021). O uso prolongado desses agentes, acarretam ao efeito reverso ao desejado, reduzem a fertilidade do solo resultando em menor crescimento e produtividade (ALENGEBAWY *et al.*, 2021). Há grande preocupação em relação ao acúmulo dos metais pesados nas lavouras porque não são biodegradáveis e podem entrar na cadeia alimentar representando alto risco para a sociedade e meio ambiente, as pesquisas na área de biorremediação representam uma fonte promissora de descontaminação do solo (NAILA *et al.*, 2019).

Em 2018, o pesquisador da Embrapa Soja, Drº Rafael Soares alertou sobre uma perda de US\$2 bilhões, no Brasil, causado pelo fitopatógeno da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*). Esse custo, além de englobar os prejuízos com os cultivares contaminados - que pode chegar a 90% dos vegetais - considera principalmente os fungicidas sintéticos que possuem valor considerável ao produtor (SOARES, 2018).

Desta forma, é desejável a substituição urgente de agroquímicos que são responsáveis por alto custo ao produtor, agredem o meio ambiente e afetam a saúde da população por biomoléculas não recalcitrantes. Assim, o controle biológico é destaque por proporcionar uma alternativa eficiente, menos agressiva e economicamente viável.

O sucesso de produtos biocontroladores depende de linhagens microbianas purificadas, viáveis, identificadas e caracterizadas, o que torna o trabalho desenvolvido em coleções de culturas fundamental para a preservação de recursos genéticos confiáveis. Os objetivos das coleções englobam preservar e distribuir culturas de microrganismos autenticadas, fornecendo a base para a pesquisa científica, ensino e biotecnologia (MAHILUM-TAPAY, 2009).

Neste contexto, os isolados de bactérias e fungos endofíticos foram preservados no acervo do Laboratório de Microbiologia “Táxon Ambiental”, localizado no Centro de Estudos Ambientais – CEA, UNESP Rio Claro e foram bioprospectados com o objetivo de obter potenciais antagonistas a alguns fitopatógenos de soja. As linhagens que obtiveram êxito no teste foram também preservadas na Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI-UNICAMP), que possui acreditação na ISO NBR 17.025-17.

A literatura menciona que os grãos possuem um microbioma endofítico, assim como outros órgãos das plantas, com funções vitais para a germinação da semente como proteção, dispersão e recrutamento de outros mutualistas (ASSUMPÇÃO *et al.*, 2009; MANIAS; VERMA; SONI, 2020; SEGARAN; SATHIAVELU, 2019). Partindo de linhagens endofíticas purificadas, este trabalho revelou potenciais antagonistas para os fitopatógenos *Phytophthora sojae*, *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum truncatum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*, com a possibilidade de atuarem de forma preventiva contra as doenças que causam.

Considerando-se o exposto acima, esse estudo pretende responder duas questões principais:

1. Quais microrganismos endofíticos são encontrados no microbioma do grão da soja (*Glycine max. L*) tratado com o fungicida *Coopermax TB*, utilizando-se técnica dependente de cultivo?
2. Quais isolados endofíticos são potenciais antagonistas contra os fitopatógenos *Phytophthora sojae*, *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum truncatum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*?

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Produção de soja no Brasil e no mundo

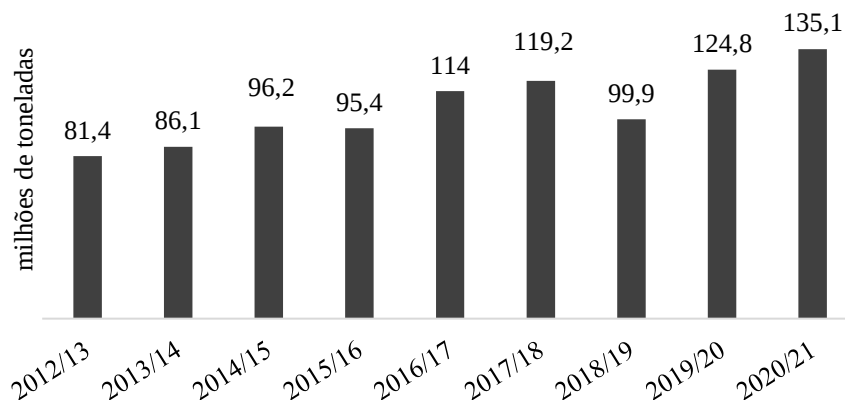
Relatos sugerem que a soja (*Glycine max* L.) se originou na Ásia, provavelmente na China, sendo o cultivar atual resultante de cruzamentos naturais domesticados por cientistas da antiga China há 4.500-4.000 anos atrás (MUNDSTOCK; THOMAS, 2005).

No início do século XX nos Estados Unidos, a planta ganhou visibilidade na alimentação de bovinos, tornando-se a principal forrageira e entrando em ascensão para obtenção de óleo vegetal e pelo alto valor proteico. Em 1941, iniciou-se a exploração comercial do cultivar e além dos EUA, o Brasil e a Argentina aumentaram a área cultivada para produção do grão. Nos anos 80 a comercialização da soja brasileira teve um “boom” econômico aumentando em 10 vezes sua produtividade quando comparado à década anterior ($1,5 \cdot 10^6$ t e $1,5 \cdot 10^7$ t, respectivamente) (DALL’AGNOL *et al.*, 2020).

A CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), realiza registros anuais sobre a produção, estimativa e áreas plantadas de diversos grãos. A função desse órgão é divulgar informações para auxiliar produtores e estimular discussões em políticas públicas referente à agropecuária (Os boletins podem ser encontrados em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos?start=90>)

O primeiro registro do monitoramento de soja é referente à safra 2012/13, e neste ano o Brasil produziu mais de 81 mi toneladas de soja. Em contrapartida, a estimativa para a safra 2020/21 é mais de 135 mi t. A Figura 1, resume os resultados da produção e podemos observar um significativo aumento de 54 mi toneladas em 9 anos.

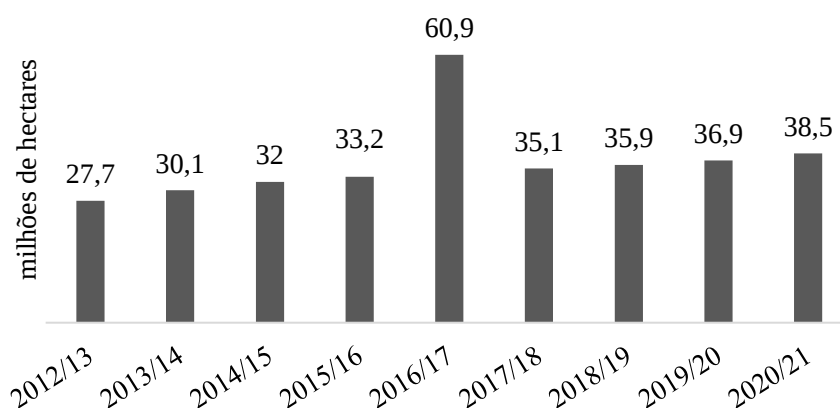
Figura 1 – Produção de soja da safra 2012/13 até a safra 2020/21 no Brasil.



Fonte: Levantamento de safras realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento. Adaptado pela autora. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos?start=90>

A CONAB também realiza levantamentos sobre a área plantada dos grãos, em hectares, evidenciando o aumento da área plantada em decorrer das safras. Na safra 2012/13 a área cultivada era de mais de 27 mi hectares e 9 anos depois essa área ultrapassou 38 milhões de hectares, significando um aumento de 9 mi h, valor equivalente a 38 mil estádios de futebol (Figura 2).

Figura 2 – Área plantada de soja da safra 2012/13 até safra 2020/21 no Brasil.

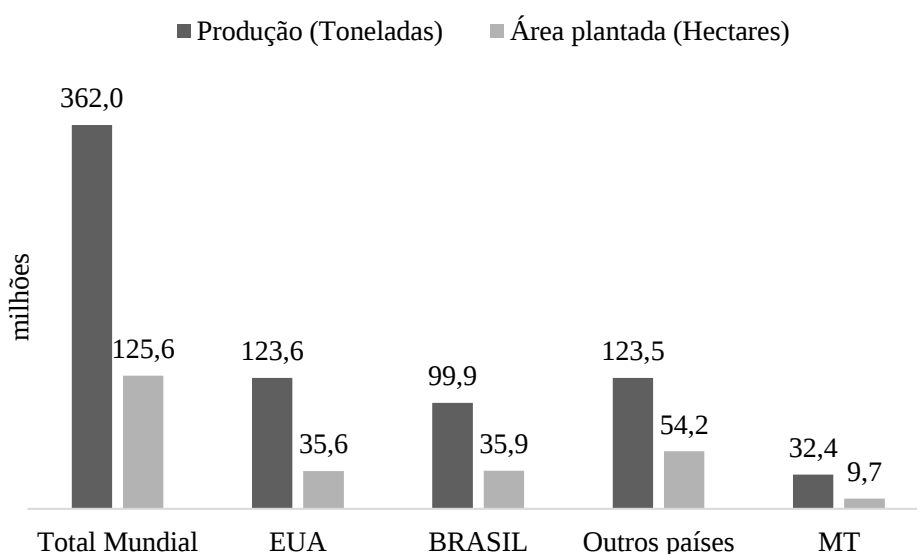


Fonte: Levantamento de safras realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento. Adaptado pela autora. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos?start=90>

Na safra 2018/19, a produção mundial de soja correspondeu a 362.075 milhões t. O Brasil foi o segundo produtor mundial do grão (114.842 milhões t), perdendo o primeiro lugar

no *ranking* de produção para os Estados Unidos com 123.664 milhões t. (CONAB, 2020). Dos estados brasileiros, o Mato Grosso se destacou com uma produção de 32.455 milhões t. Os EUA destinaram 35.657 milhões de hectares para o plantio, enquanto o Brasil reservou 35.822 milhões h, o que sugere que embora o EUA tenha produzido mais que o Brasil, a área cultivada foi menor, como demonstra a Figura 3.

Figura 3 – Produção de soja e área plantada de soja com ênfase para os maiores produtores: Estados Unidos e Brasil, na safra 2018/19.



Fonte: EMBRAPA SOJA (2019). Soja em números (Safr 2018/2019). Adaptado.

Na safra 2019/20, o Brasil se torna o novo líder mundial de produção de soja com 124,8 milhões t, seguido pelos EUA com 96,6 milhões t da produção.

O 6º levantamento da safra 2020/21, realizado em março, prevê a produção da safra brasileira de 135,13 milhões t, significando um aumento de aproximadamente 8% em relação à safra anterior. Os EUA, por sua vez, estipulam uma produção de 123,16 milhões t, indicando produção menor que a safra 2019/20 (CONAB, 2021).

Embora o Brasil venha aumentando sua produção, há oscilação nas regiões produtoras causada por fatores ambientais que geram incertezas quanto ao futuro da safra. No Paraná, o período de excesso de chuva ocasionou doenças como ferrugem e mofo-branco enquanto que o período de estiagem degradou os cultivares e em períodos de menor incidência solar resultou em interrupção do crescimento das vagens (CONAB, 2021).

2.2. Controle Biológico

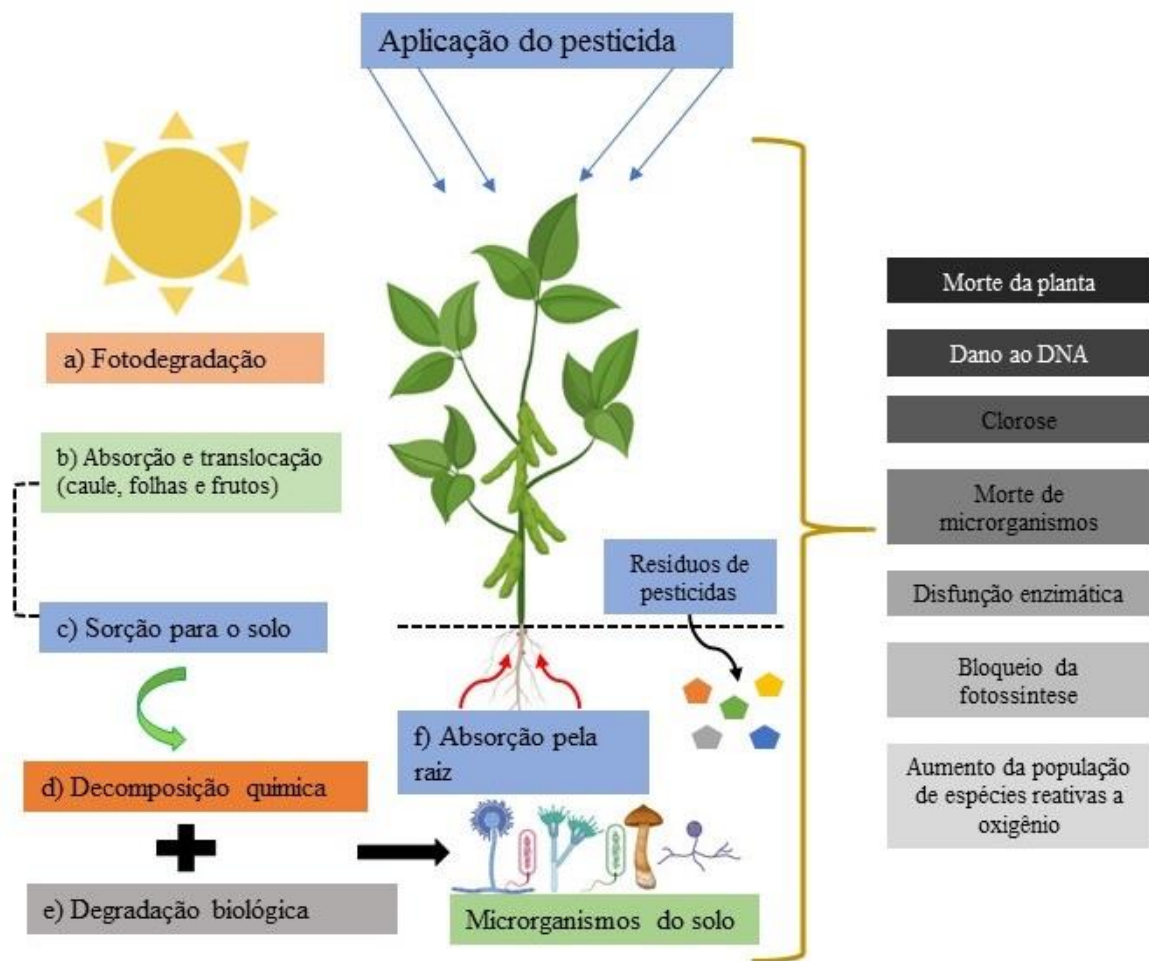
O aumento da produtividade agrícola, ao longo dos anos, foi possível devido às tecnologias que foram adicionadas ao sistema de produção, dentre elas o uso de agroquímicos para controle de ervas daninhas, pragas e doenças que causam riscos e desequilíbrios ambientais. A utilização intensiva de fertilizantes possibilita maior oferta de macro e micronutrientes para a planta, contudo favorece a instabilidade do pH e aumento de alguns nutrientes em detrimento a outros.

No Brasil, a utilização dos agrotóxicos se iniciou em meados dos anos 60 para combater fitopatógenos e pragas que ameaçavam o campo. Em 2006, o consumo superou 20 milhões de toneladas de fertilizantes no país e o estado do Mato Grosso, maior produtor de soja e consumidor de agrotóxico, respondeu a 40% da demanda brasileira (SPADOTTO; GOMES, 2012). Em 2016, após 10 anos, nos tornamos destaque como o maior consumidor da América Latina (RIBEIRO; PEREIRA, 2016).

Embora os fertilizantes e pesticidas sintéticos possibilitaram aumentar a produção agrícola, esses compostos podem render resultados adversos como afetar a biota não-alvo, abelhas, pássaros, plantas e mamíferos além de desequilibrar todo o sistema ecológico.

O processo de aplicação até a incorporação do agroquímico no interior da planta, pode ser compreendido através de uma via de toxicidade (Figura 4). Após a aplicação do produto, inicia-se o processo de degradação, decomposição química e degradação biológica. Os resíduos e os subprodutos da degradação, são absorvidos pela raiz e distribuídos pela planta. Os efeitos colaterais da intoxicação incluem: estresse oxidativo, danos ao DNA, bloqueio fotossintético, necrose, clorose, morte do vegetal e desbiose na comunidade de bactérias nitrificantes e fixadoras de nitrogênio aeróbicas, entre outros (ALENGEBAWY *et al.*, 2021).

Figura 4 – Via de toxicidade dos pesticidas no solo e na planta.



Fonte: Adaptado de Alengebawy *et al.* (2021, tradução nossa).

Alengebawy *et al.*, (2021), listou os efeitos tóxicos no solo e nas plantas dos três grupos de agroquímicos: inseticidas, herbicidas e fungicidas. Os fungicidas atuam negativamente em estruturas essenciais para a planta como cloroplastos, estômatos e na cadeia transportadora de elétrons. Os inseticidas são particularmente importantes para o grão de soja, uma vez que estão associados à redução proteica do grão (Quadro 1).

Quadro 1 – Efeitos tóxicos dos três grupos de pesticidas no solo e na planta.

Tipo de pesticida	Efeitos tóxicos		Referência
	Solo	Planta	
Inseticida	Destruição de proteínas estruturais	Redução da quantidade de proteínas do grão;	Ahemad; Khan (2011)
	microbianas; Redução de simbiose; Alteração química do solo;	Bloqueio da condutância estomática;	Ahemad; Khan (2010)
	Alteração na atividade enzimática dos microrganismos.	Alterações no processo fotossintético.	
Herbicidas	Redução da disponibilidade de nutrientes do solo;	Alteração da eficiência fisiológica e bioquímica;	Sannino; Gianfreda (2001)
	Supressão das atividades da fosfatase e nitrogenase.	Aumento a suscetibilidade a doenças.	Saladin; Clément (2005)
Fungicidas	Interrupção das atividades da fosfatase, urease e desidrogenase;	Redução das concentrações de clorofila e carotenoides;	Petit <i>et al.</i> , (2012)
	Inibição do crescimento de bactérias nitrificantes.	Destruição dos cloroplastos; Fechamento dos estômatos; Supressão da transferência de elétrons.	Sáez <i>et al.</i> , (2006)
			Kanissery <i>et al.</i> , (2019)

Fonte: Alengebawy *et al.* (2021, tradução nossa).

Em busca de minimizar os efeitos colaterais causados pelos pesticidas e fertilizantes, os produtos biocontroladores tem por objetivo diminuir/erradicar o inóculo patogênico a partir dos seus inimigos naturais. A íntima interação entre plantas e mutualistas, possibilita criar uma rede de proteção para o vegetal de forma que patógenos e mutualistas competem pelo sítio de infecção do hospedeiro. Em desequilíbrio, favorecendo o aumento da infecção pelo fitopatógeno, é necessário que um agente ambiental (antagonista) restabeleça o equilíbrio do microbioma da planta (BETTIOL, 1991). Desta forma, o controle biológico visa a otimização e a eficiência do combate aos fitopatógenos (CHET; INBAR, 1994; RASHAD; MOUSSA, 2020).

Com objetivo de sanar os problemas fitossanitários das plantações e oferecer melhores condições de cultivo, o biocontrole se incorpora ao campo e à pesquisa se tornando uma alternativa sustentável e potencialmente mais rentável ao produtor, quando comparado à utilização dos agroquímicos (RASHAD; MOUSSA, 2020).

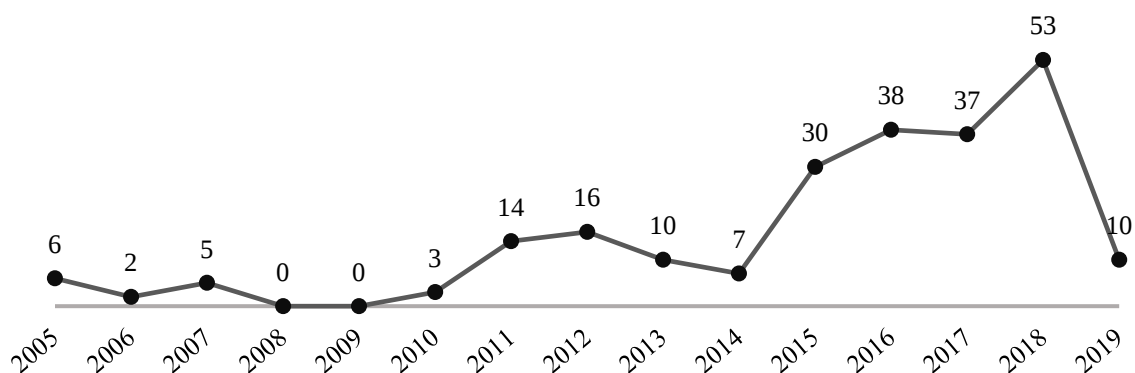
O uso de inimigos naturais para controle de pragas existe há séculos, mas o controle biológico se tornou alvo do campo científico no século XIX com o desenvolvimento da entomologia e o conhecimento sobre parasitas-predadores-patógenos e as interações na cadeia alimentar. Em 1880, na Califórnia, o sucesso do experimento de controle da cochonilha australiana (*Icerva purchasi*) pelo predador *Rodolia cardinalis* em Citrus, marcou o início das investigações na área (NARANJO; ELLSWORTH; FRISVOLD, 2015).

Harry S. Smith (1919), cunhou o termo controle biológico para designar a inserção de predadores para controle de insetos-pragas das plantações, ou seja, adicionou um predador aos níveis tróficos da cadeia alimentar (SMITH, 1919). Posteriormente, o termo foi ampliado para também contemplar outros grupos de organismos fitopatogênicos e seus inimigos naturais, os antagonistas. Naranjo, Ellsworth e Frisvold (2015), entendem o controle biológico como a chave para diminuir os custos dos problemas fitossanitários da lavoura e paralelamente proteger os recursos naturais.

Dentre os agentes antagonistas, os microrganismos representam fontes importantes para investigações por atuarem na proteção, promoção de crescimento vegetal e os principais mecanismos de ação são: parasitismo, hiperparasitismo e micoparasitismo, competição, antibiose e indução de resistência contra fitopatógenos (MACHADO *et al.*, 2012).

Segundo a ABCBio (Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico, 2020), os produtos biocontroladores estão em plena ascensão no mercado, como mostra a Figura 5, com um aumento significativo em dez anos. Espera-se que esse número aumente de forma exponencial com a perspectiva de que os produtores substituam gradualmente os agroquímicos por produtos biocontroladores.

Figura 5 - Registro de produtos biocontroladores na Associação Brasileira de Controle Biológico (ABCBio) no Brasil de 2005 a 2019.



Fonte: Associação Brasileira de Empresas do Controle Biológico - ABCBio (2020). Produtos biológicos de controle registrados no Brasil desde 2005 (adaptado). Disponível em: <https://www.abcbio.org.br/biodefensivos-registrados/>

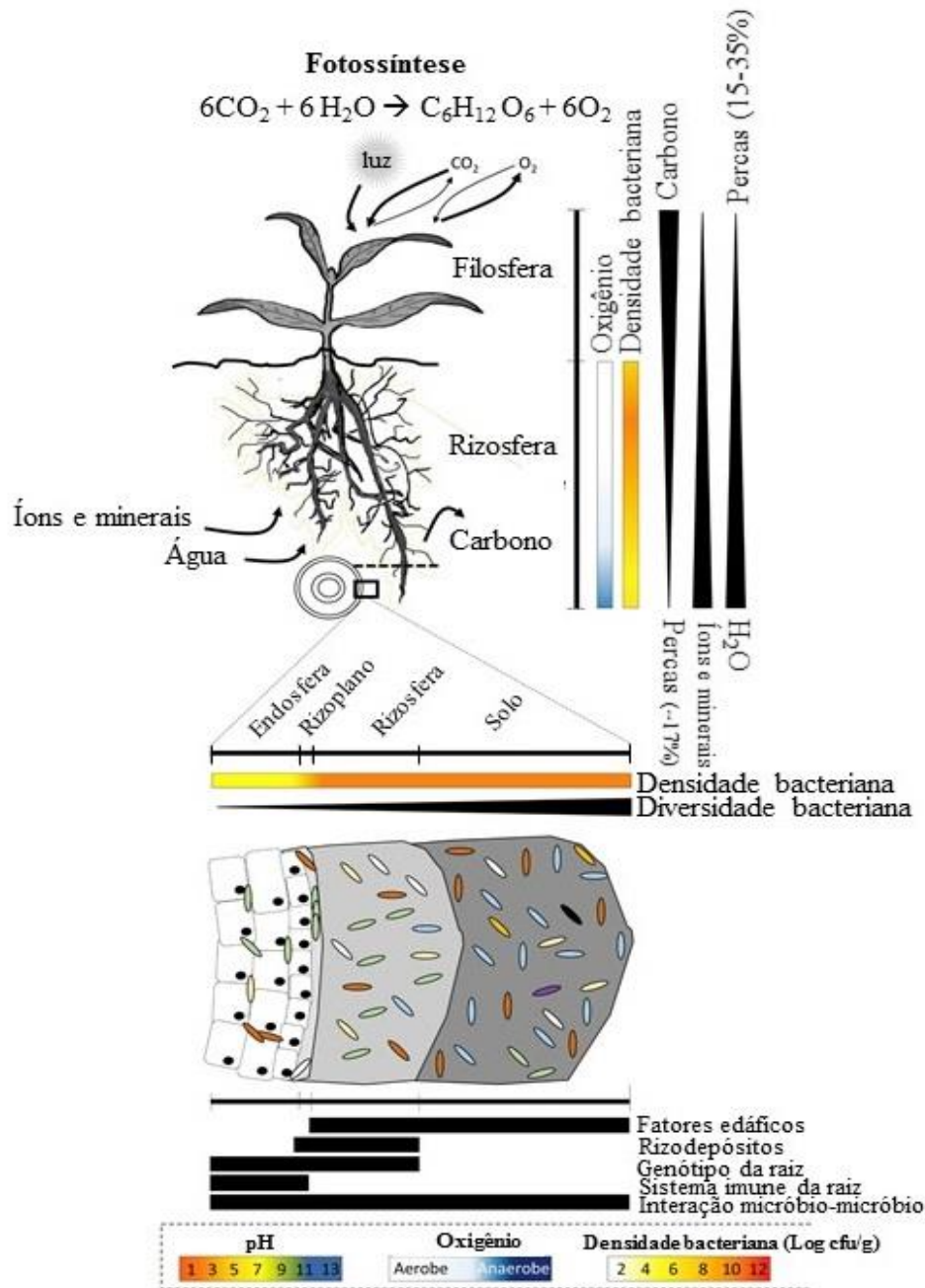
2.3 Microbioma mutualista

Em 1991, Lynn Margulis e René Fester cunharam o termo “holobionte” na literatura para designar uma associação simples de um hospedeiro que interagia com um microrganismo (SIMON *et al.*, 2019). Anos após, esse termo foi adaptado para contemplar as associações cooperativas e mutualísticas com as comunidades microbianas que co-evoluem em direção a uma unidade ecológica ou “superorganismo” (ROSENBERG; ZILBER-ROSENBERG, 2018).

As plantas estabelecem associações vitais com o microbioma, são modulados a partir da exsudação das raízes que recrutam rapidamente os microrganismos probióticos formando o sistema imunológico do vegetal (LIU *et al.*, 2020). Em situações de estresse, o hospedeiro libera outros metabólitos secundários que impulsionam novas associações com os microrganismos do solo rizosférico, o mecanismo “Cry for Help” (TRIVEDI *et al.*, 2020).

As comunidades microbianas das plantas não são estáticas uma vez que os órgãos respondem a diferentes necessidades, acarretando a compartimentalização microbiana guiado por um gradiente de diversidade e densidade. Segundo Hacquard *et al.*, (2015), a densidade e diversidade microbiana são mais altas no solo e o gradiente diminui no sentido rizosfera-endosfera. O microbioma da endosfera também respeita um gradiente de densidade e diversidade, sendo maior na raiz e menor nos grãos. A endosfera pode ser compreendida como o interior dos tecidos vegetais e os endofíticos como os microrganismos que colonizam a endosfera. A figura 6, ilustra a diferença do gradiente de diversidade e densidade do solo-rizosfera.

Figura 6 – Gradiente de diversidade e densidade de bactérias do solo, rizosfera, rizoplano e endofítico.



Fonte: Adaptado de Hacquard *et al.*, (2015), tradução nossa.

Os endofíticos através da quimiotaxia percebem o estímulo da planta, pela liberação de exsudatos, penetram a raiz através de um mecanismo complexo para burlar as respostas imunológicas e conquistar o interior da planta, a endosfera (LIU *et al.*, 2020).

Os microrganismos endofíticos do grão são modulados a partir do ambiente (MORALES MOREIRA; HELGASON; GERMIDA, 2021) e desempenham funções essenciais para germinação pois atuam na proteção, dispersão, nutrição e recrutamento de probióticos do

solo (FORT *et al.*, 2021; U'REN; ZIMMERMAN, 2021; WHITE *et al.*, 2019). Verma *et al.*, (2017), confirmou a importância dos endofíticos do grão removendo bactérias da semente de arroz, por meio de NaCl e sulfato de estreptomicina, e compararam o desenvolvimento do grão estéril com um grupo controle. O grão estéril mostrou comprometimento do crescimento da parte aérea e da raiz, causado pela ausência dos endofíticos. As bactérias identificadas no grupo controle, produziram auxinas e inibiram o fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. Essas observações, reiteram a importância de estudos envolvendo o endobioma como um importante agente na agricultura.

A comunidade endofítica do grão é transferido da planta-mãe através da transmissão vertical e engloba principalmente os microrganismos da endosfera e os associados a estruturas de reprodução das plantas (HARTLEY; GANGE, 2009). Aly, Debbab e Proksch (2011), sugerem que os microrganismos que crescem dentro da semente têm maior chance de serem mutualistas. Desta forma, é crescente o número de pesquisas que envolvem o isolamento de microrganismos endofíticos de grãos para produção de biomoléculas capazes de antagonizar fitopatógenos e pragas.

2.4 Fitopatógenos da soja

Naturalmente, os microrganismos realizam associações com os seres vivos para completar seus ciclos de vida. De Silva *et al* (2016), sistematizaram as interações fúngicas em biotrofismo, hemitrofismo, necrotrofismo, saprofitismo e endofitismo. Os biotróficos, dependem das células hospedeiras para nutrição e produção dos haustórios para captar nutrientes, contudo possuem sintomas não aparentes ao hospedeiro. Os necrotróficos causam a morte da planta através da secreção de enzimas e toxinas para obtenção de nutrientes. Os hemibiotróficos, como *Phytophthora infestans*, vivem parte do seu ciclo de vida latente e posteriormente necrofítica, exterminando o cultivar (TRINDADE, 2021).

Os microrganismos fitopatogênicos podem ser muito agressivos e exterminar hectares de plantios em pouco tempo, como por exemplo o fungo filamentoso *Rhizoctonia solani*, causador da podridão radicular. Esse fitopatógeno afeta diversas culturas de importância econômica como cereais, algodão, bulbo de flores, sementes, plantas ornamentais, batata, arroz, milho, entre outros (VERMA *et al.*, 1995).

O controle biológico utiliza-se de microrganismos benéficos para suprimir os mecanismos de ação de microrganismos patogênicos, como a *Rhizoctonia solani*. Para se esquivar de microrganismos patogênicos, as plantas realizam associações bem estabelecidas

com microrganismos biotróficos que assumem posição de defesa em troca de nutrientes, sendo essa relação benéfica para ambos. A biotecnologia, se aproxima dessas interações mutualistas para propor formas de combate aos fitopatógenos de forma menos agressiva e mais sustentável.

Segundo Harper, Wannders e Keeling (2005), *Phytophthora sojae* (Peronosporaceae, Peronosporales), é um representante do filo Oomycota que compartilha semelhanças com o Reino Fungi, contudo várias diferenças fazem com que sejam agrupados no Reino Stramenopiles. Os oomycetes necróticos são um desafio para a fitopatologia, pois são extremamente adaptáveis, contornam rapidamente a resistência da planta infectando os cultivares próximos e se espalham rapidamente (WANG; TYLER; WANG, 2019). A técnica de manejo, envolve o tratamento com fungicidas químicos, porém, uma vez que não são fungos, demonstram alta resistência.

O fungo filamentoso *Macrophomina phaseolina* (Botryosphaeriaceae, Botryosphaeriales), possui o micélio dematiáceo e forma picnídios (estruturas conidiogênica para reprodução assexuada). O fitopatógeno é ultra resistente a fungicida sintético e o fungo pode viver no solo por 15 anos em estado de latência, desta forma o controle biológico é o mais indicado. Esse fungo causa doenças em mais de 500 plantas, entre elas feijão, milho, soja, girassol, grão de bico e algodão, (Dave *et al.* 2021). Reznikov *et al.* (2019), relataram desastres severos em plantações mundiais de soja, como no ano de 2006 que o fitopatógeno foi responsável por um prejuízo de 4% do total mundial de soja e em 2008 no Paraguai, em que a contaminação foi 100% da safra.

Colletotrichum truncatum (Glomerellaceae, Glomerellales) é o causador da antracnose, que causa lesões em todas as partes da planta. É através das sementes que a antracnose é transmitida, dessa forma é responsável por prejuízos que variam de 16% a 26% nos EUA, 30-50% na Tailândia e até 100% na Índia, que é o maior produtor de soja da Ásia (DIAS *et al.*, 2019).

Rhizoctonia solani (Ceratobasidiaceae, Cantharellales) é um fungo filamentoso transmitido através do solo e infecta o vegetal através de hifas especializadas ou apressórios. As hifas penetram o tecido do hospedeiro e secretam enzimas que degradam a parede celular (celobiose desidrogenase, β -xilanase, β -glucanase, β -glucosidase, entre outros), colonizam rapidamente o interior da planta e se espalham por todos os órgãos vegetais, causando necrose (RAZALI *et al.*, 2021).

Sclerotinia sclerotiorum (Sclerotiniaceae, Leotiomyces) é um fitopatógeno de difícil erradicação pois os escleródios sobrevivem anos no solo. Essa espécie de fungo é capaz de colonizar mais de 400 espécies de plantas, entre elas várias de importância econômica, como

cebola, soja e milho. Em 1999, os prejuízos relacionados à infecção ultrapassaram US\$ 200 milhões de dólares, ocasionado por uma pandemia (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

3. OBJETIVOS

- Isolar microrganismos endofíticos do grão de soja (*Glycine max* L.).
- Realizar a caracterização morfológica dos isolados.
- Testar as linhagens quanto ao antagonismo aos fitopatógenos *Phytophthora sojae*, *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum truncatum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*.
- Preservar e depositar as linhagens no acervo do Laboratório de Microbiologia “Táxon Ambiental” – LMA/ CEA, UNESP.
- Depositar as linhagens que obtiveram êxito no teste de antagonismo na Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI/UNICAMP).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os grãos investigados neste trabalho foram cedidos pelo agricultor Nelson Henrique Reatto da fazenda Santo Antônio localizado em Santa Rita do Passo a Quatro - SP. A produção dos grãos é de responsabilidade da empresa “Sementes Estrela”, o local da produção foi São Miguel das Missões (RS), os grãos são da categoria C2 (semente certificada de 2ª geração). O código do cultivar para rastreamento é M6410IPRO; lote S18TP22520; Safra 2018/2019. A probabilidade de germinação é de 95%, vigor 92%, pureza 99,9%. O rastreamento pode ser obtido pelo site: <https://www.sementesestrela.com.br/>.

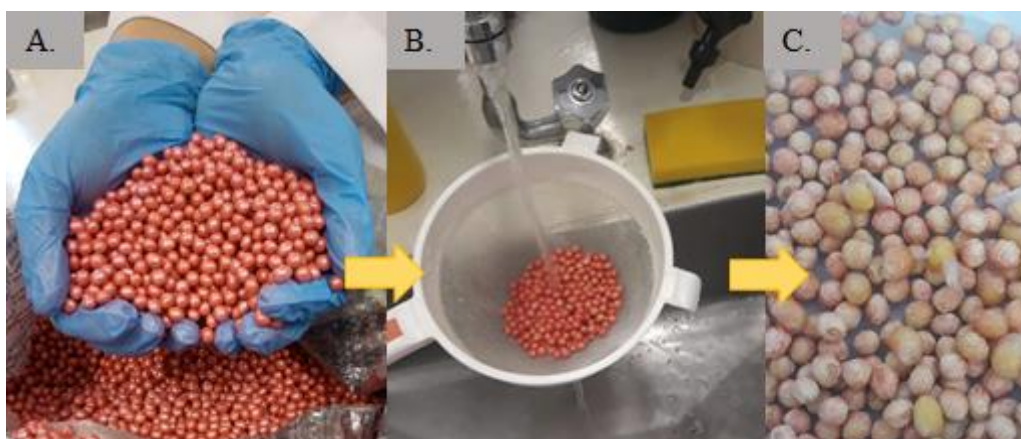
Os grãos foram submetidos ao tratamento *Coopermax* TB, realizados pela empresa Syngenta. As informações referentes a esse tratamento não foram encontradas na literatura, no entanto o rótulo do produto descreve que a composição consiste em (dose 100 kg de semente): 1) Fertilizante: Booster MO (Zn 4,6% e Molibdênio 7%), 100 mL; 2) Inseticida: Cropstar (Imidacloprido 15% + Tiodicarbe 45%), 300 mL; 3) Fungicida: Derosal Plus (Carbendazim 15% + Tiram 35%), 200mL; 4) Polímero (Piridiam 306 Azul), que reveste o grão e 5) Pó secante (*Talkum Gloss*), na cor rosa bordo.

4.1. Isolamento de microrganismos endofíticos

Para isolar os endofíticos, foi utilizado a metodologia de Stone, Polishook, White (2004), que envolve a desinfecção superficial para excluir os microrganismos epifíticos.

Primeiramente, os grãos foram lavados em água corrente para remoção de impurezas e secadas em papel toalha (Figura 7).

Figura 7 – Aspecto dos grãos estudados antes e depois da lavagem em água corrente.

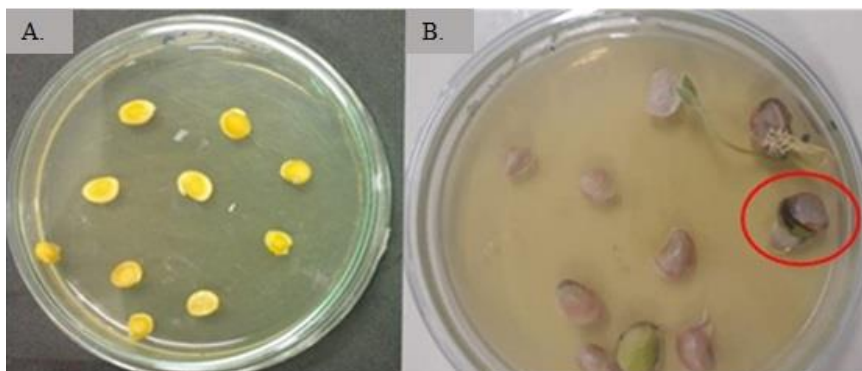


Fonte: Arquivo pessoal (2020)

Após a secagem, os grãos foram imersos em etanol (70%) por 1 minuto; hipoclorito de sódio (3%) por 3 minutos; etanol 70% por 30 segundos e por último três lavagens em água deionizada. Como controle do processo de desinfecção, uma fração da última lavagem foi plaqueada nos meios de cultura e incubada a 28°C.

Após a desinfecção, os grãos foram cortadas no plano sagital mediano com lâmina bisturi estéril e distribuídas igualmente nas placas contendo os meios de cultura BDA (Batata-Dextrose-Agar), MA 2% (Malte 2%) e AA (Agar Aveia) suplementados com sulfato de estreptomicina (20 mL/L), (Figura 8). O meio de cultura AA foi preparado a partir da fervura, por 30 minutos de 30g de aveia em 1000 mL de água destilada. O líquido foi filtrado e acrescentou-se água destilada afim de completar 1000 mL, posteriormente foi adicionado 35g de ágar e a mistura foi autoclavada a 121°C por 20 minutos.

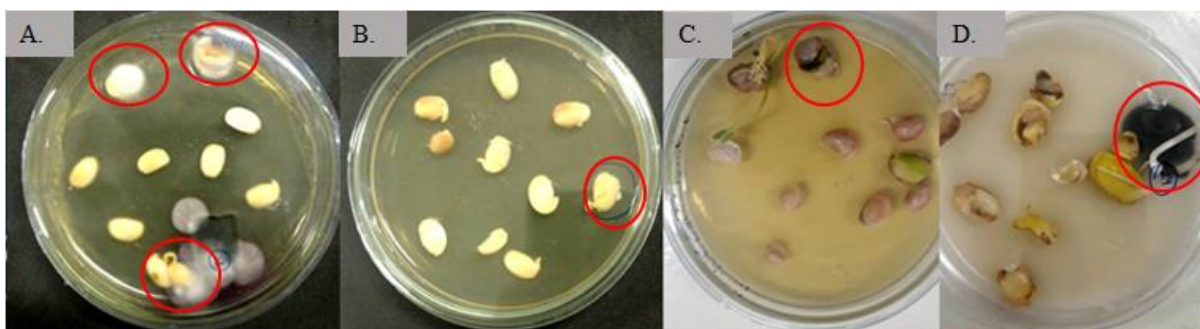
Figura 8 – Isolamento de fungos e bactérias endofíticas do grão de soja. A) Grãos de soja desinfetados e inoculados no meio de cultura para bioprospecção dos microrganismos. B) Placa de isolamento após 72h, com germinação de alguns grãos e o círculo vermelho indicando crescimento de um fungo dematiáceo.



Fonte: Arquivo pessoal (2020)

Foram realizados 30 plaqueamentos (10 placas para cada meio de cultura), totalizando 150 grãos analisados (5 por placa), incubados a 28°C e o crescimento foi acompanhado diariamente. Posteriormente, os isolados foram transferidos para novas placas, para purificação, caracterização morfológica e preservação (DE CAPRILES; MATA; MIDDELVEEN, 1989; KUMAR *et al.*, 2013). A figura 9 apresenta o crescimento dos microrganismos nas placas do isolamento.

Figura 9 – Crescimento microbiano dos endofíticos do grão de soja. A. B. C. Meio de cultura BDA e D. Meio de cultura AA.



Fonte: Arquivo Pessoal (2020)

4.2. Purificação

A purificação e a confirmação da viabilidade são etapas importantes e devem ser realizadas com máxima assepsia para evitar contaminações. Assim, todos os materiais

utilizados foram autoclavados a 121°C por 20 minutos e esterilizados com luz ultravioleta (UV) por 15 min, pois a preservação depende do sucesso desses procedimentos.

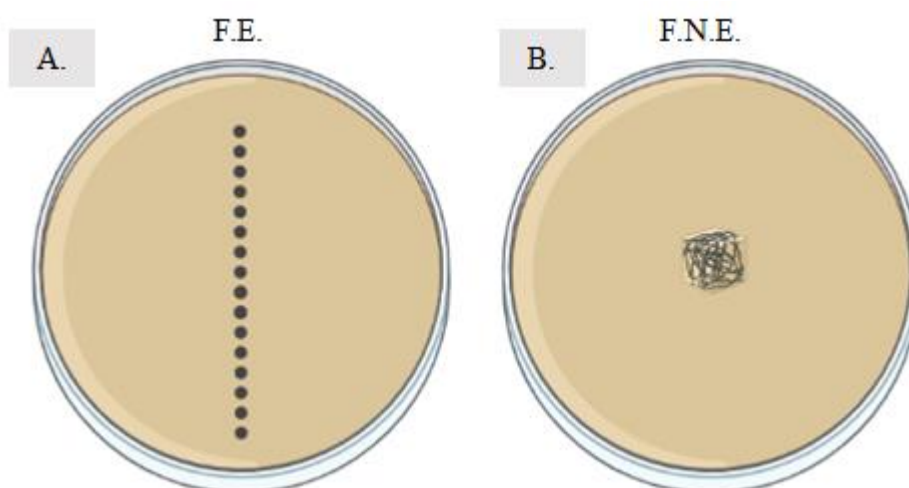
Após a visualização dos microrganismos na placa do isolamento, o ágar circundante à colônia foi cortado e transferido para outra placa BDA. Os fungos foram submetidos à técnica de repique contínuo e diluição seriada e as bactérias à técnica de semeadura por esgotamento.

4.2.1. Purificação de fungos

Os fungos seguiram a metodologia adaptada de repique contínuo (JOHNSON, 1946) e quando foi ineficiente para purificar os isolados que apresentaram íntima associação, foi utilizada a cultura monospórica (BEN-DAVID; DAVIDSON, 2014).

No repique contínuo, para fungos esporulantes utilizou-se uma alça agulha para tocar a colônia e posteriormente delinear uma linha reta no centro da placa. Fungos não esporulantes, foi retirado um cubo da colônia seguida de inoculação no centro da outra placa (Figura 10).

Figura 10 - Técnica de repique contínuo para fungos filamentosos. A. FE: Fungos Esporulantes; B. FNE: Fungos Não Esporulantes

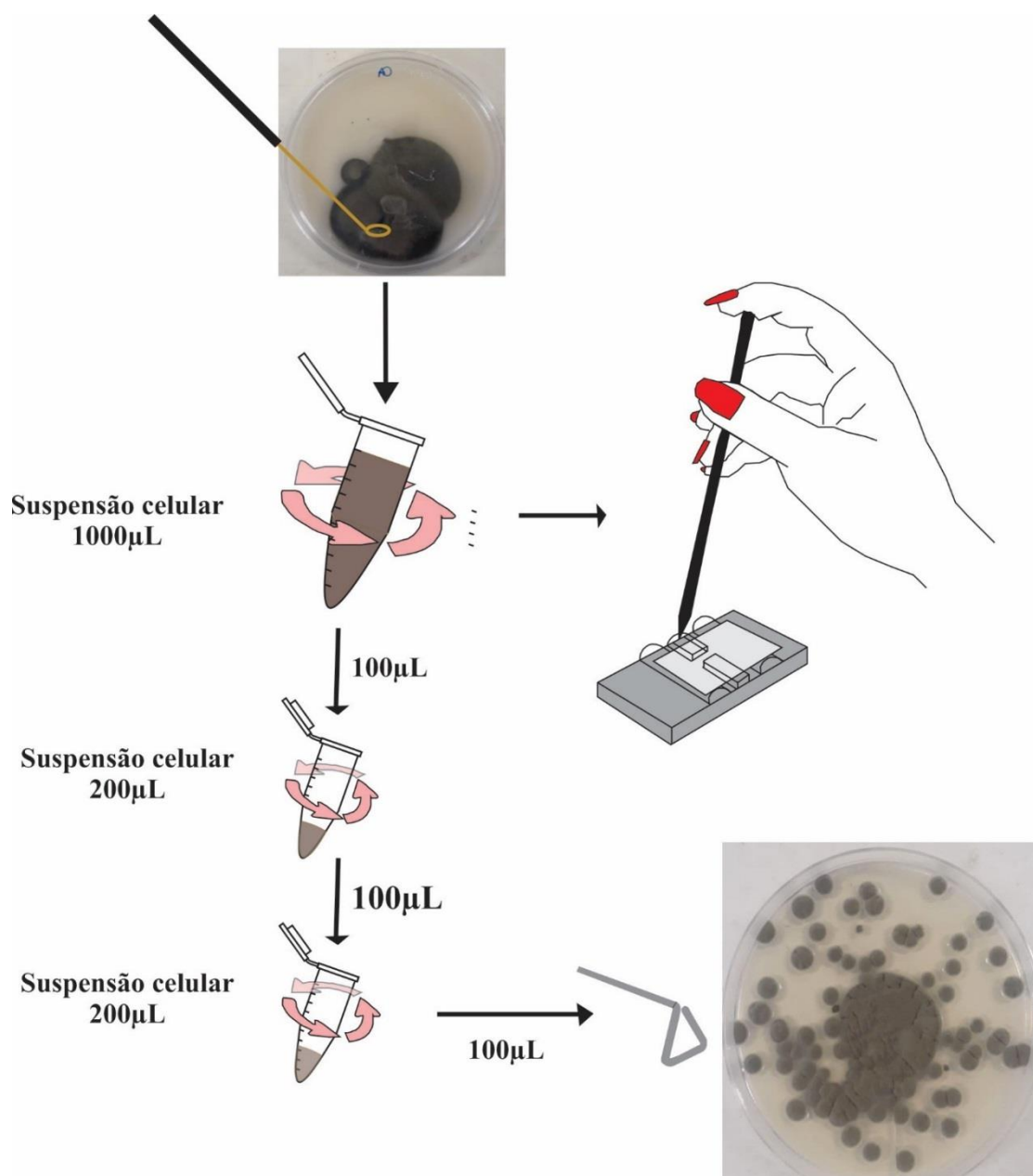


Fonte: Elaborado no BioRendeer.com, pela autora (2021)

Na técnica de cultivo monospórico, foi possível obter culturas axênicas. Para tanto o procedimento seguiu os seguintes passos: 1) Uma alçada do inóculo foi transferida para 1 mL de água destilada em microtubos Eppendorf, seguido de agitação por 60 segundos; 2) Com a pipeta, 100 µL foi transferido para a Câmara de Neubauer para contagem das unidades formadoras de colônia (UFC); 3) Diluição da suspensão até que cada 100 µL contenha até 5

esporos. 4) Espalhamento (Spread-Plate) de 100 μL sob o meio sólido BDA. 5) Incubação à 28°C. 6) Após 24h, as colônias foram transferidas para outras placas e incubadas a 27°C. Na figura 11, é possível observar o esquema simplificado da técnica de cultivo monospórico.

Figura 11 – Esquema simplificado da técnica de cultivo monospórico para purificação de fungos



Fonte: Elaborado no CorelDraw 2020 pela autora (2021)

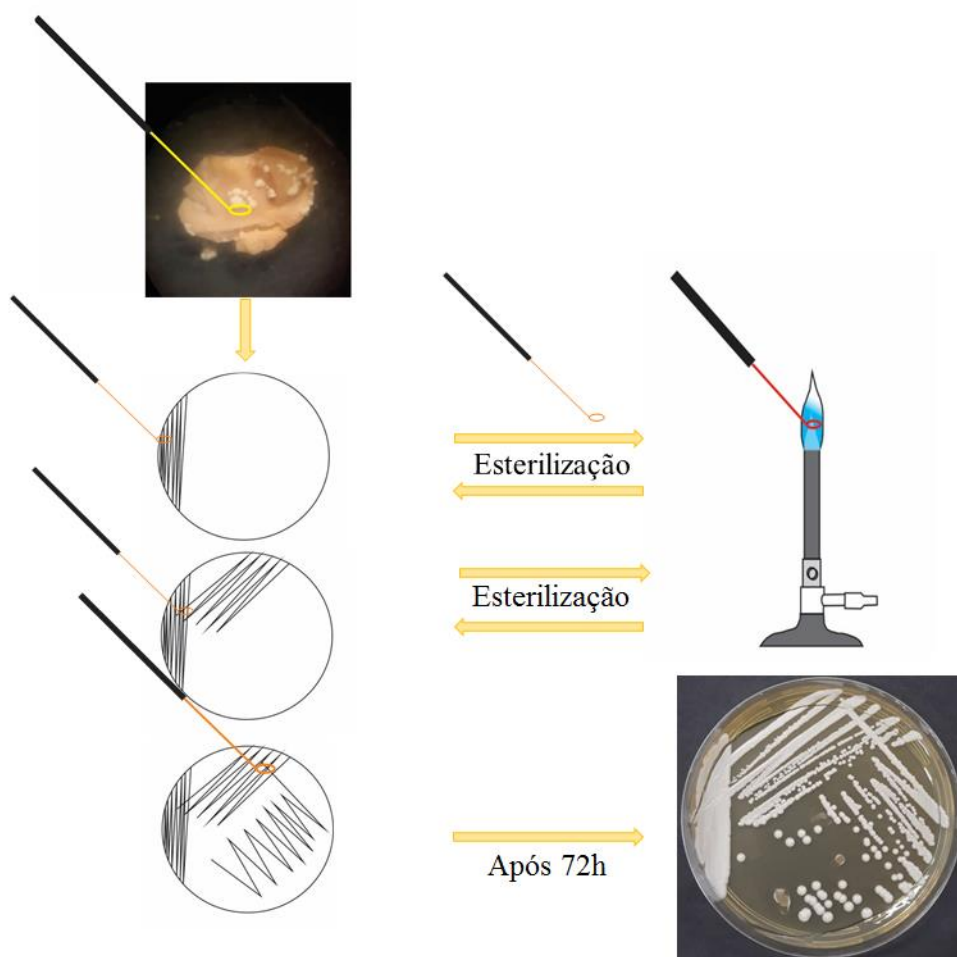
4.2.2. Purificação de bactérias

Após crescimento das colônias bacterianas no isolamento, os microrganismos foram transferidos para o meio sólido BDA. Após 48h, foram transferidas para os meios YMA (Yeast

Meal Agar), NA (Nutrient Agar) e ISP2. O meio de cultura ISP2 foi composto por extrato de levedura (4,0 g), extrato de malte (10,0 g), glicose (4,0 g) e água destilada (1000 mL), seguido de autoclavagem (BEM-DAVID; DAVIDSON, 2014). Posteriormente, os microrganismos foram purificados através da técnica de semeadura por esgotamento.

Na técnica por semeadura, uma alçada da colônia foi transferida para o meio sólido através de estria de esgotamento. Após 48h, as colônias isoladas foram transferidas para outras placas. A Figura 12, esquematiza simplificada a técnica.

Figura 12 – Esquema da técnica de semeadura por esgotamento realizado nas bactérias endofíticas. A imagem refere-se ao isolamento e purificação do Coco Gram + (BAC11).



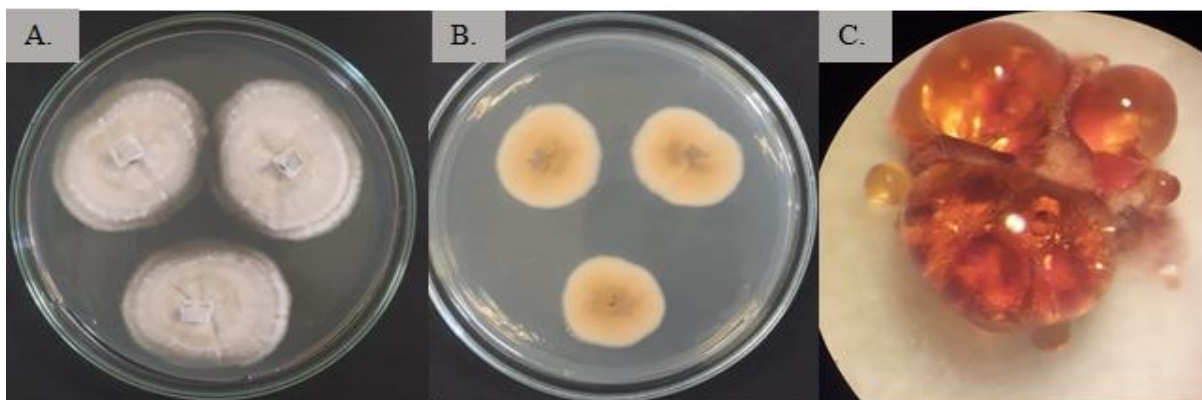
Fonte: Elaborado no CorelDraw 2020, pela autora (2021).

4.3. Caracterização morfológica

4.3.1. Caracterização de Fungos

Na caracterização macroscópica foi analisado produção de pigmentos/exsudatos, hifas hialino/dematiáceos, tempo de crescimento, estruturas reprodutivas (quando possível), e fotodocumentação da frente e reverso da placa de Petri, por exemplo a Figura 13.

Figura 13 – Fotodocumentação do Fungo Hialino Não Esporulante (FUN12,1). A. Frente; B. Reverso; C. Exsudatos produzidos pela colônia, observação com amplificação de 40x.



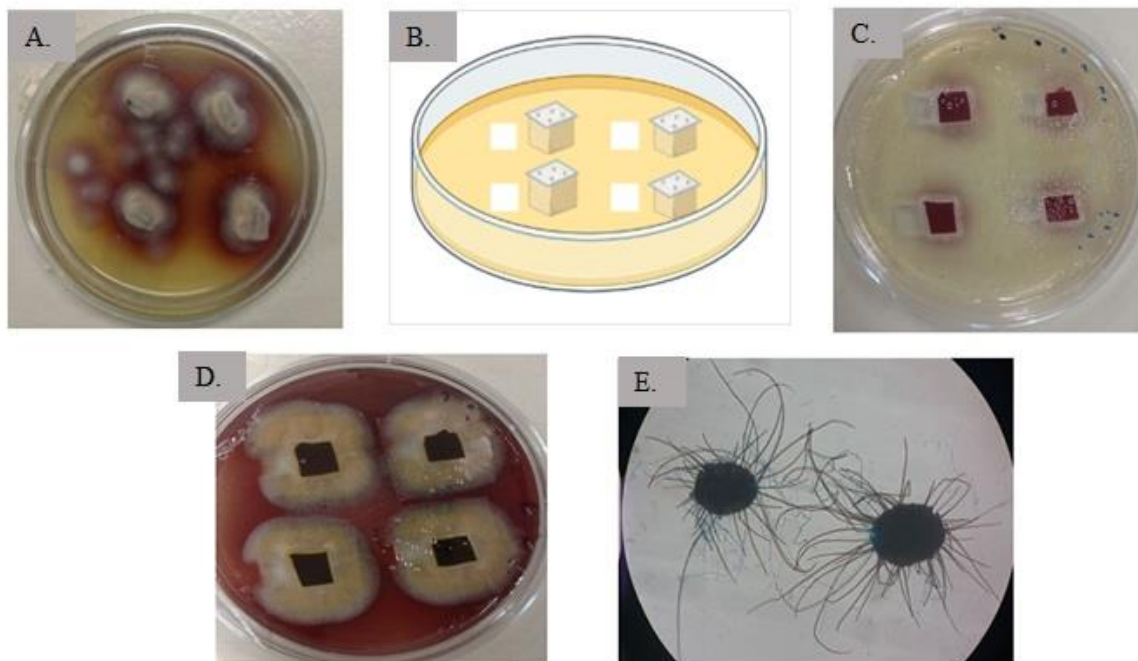
Fonte: Arquivo pessoal (2021)

Para caracterização microscópica, foi utilizada a técnica de microcultivo adaptada (JOHNSON, 1946; NUGENT *et al.*, 2006; RIDDEL, 1950).

Desta forma, 4 cubos do meio sólido foram cortados da placa com meio sólido BDA e sobreposto ao lado, adjacente ao ágar. Com a alça foi transferido o inóculo da cultura, através de perfurações para os 4 cubos, para a placa do microcultivo, seguida da sobreposição da lamínula sobre o cubo contendo o inóculo. O crescimento do inóculo foi acompanhado no estereomicroscópio para posterior montagem das lâminas com Azul de Lactofenol e/ou glicerina (Figura 14).

As lâminas foram observadas no microscópio óptico e fotodocumentadas para contribuir com o acervo da coleção de cultura do Laboratório de Microbiologia “Táxon Ambiental” da UNESP de Rio Claro.

Figura 14 - LMA 1982. Técnica de Microcultivo para visualização de estruturas reprodutivas. A. Cultura pura após 72h de crescimento; B. transferência do inóculo para a placa do microcultivo; C e D. Observação de crescimento sob a lamínula; E. Observação no microscópio óptico, fotodocumentação e identificação preliminar (aumento 400x).



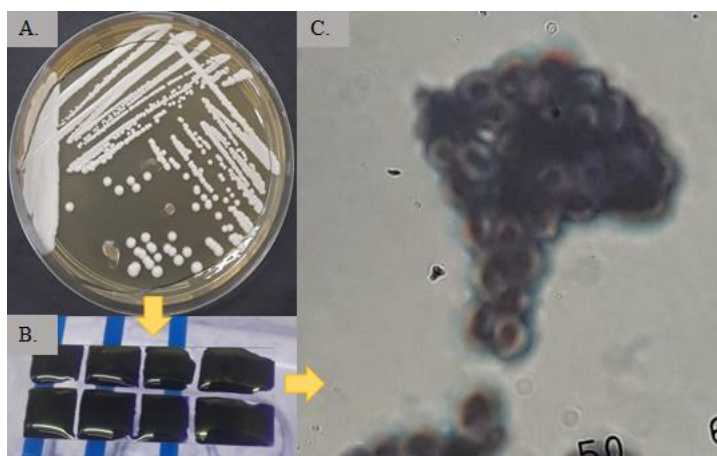
Fonte: Elaborado pela autora (2021). B. Criado no BioRender 2020.

4.3.2. Caracterização de Bactérias

As bactérias foram caracterizadas através de macro e microscopia. Para caracterização macroscópica, com o auxílio do estereomicroscópio, as colônias foram descritas quanto à cor, elevação, borda, superfície, forma e configuração da colônia. Para caracterização microscópica, os isolados foram submetidos ao teste de coloração de Gram descrito por Halebian *et al.* (1981).

A partir da coloração de Gram foi possível identificar a forma celular, Bastonete ou Coco; E a coloração referente a absorção dos corantes Violeta-Iodo pela parede celular das Gram- (negativa) ou a absorção da Safranina pelas Gram+ (positiva) e ainda foi possível distinguir o grupo das bactérias Gram variáveis (Figura 15).

Figura 15 - Técnica de Gram para diferenciação de Gram (+), Gram (-) e Gram variável. A. 8 colônias foram escolhidas, o isolado Coco gram (+) (BAC11) é o representante da imagem. B. Montagem da lâmina de Gram C. Observação no aumento de 1000x.



Fonte: Elaborado pela autora (2020)

4.3.3. Caracterização dos Fitopatógenos

Os fitopatógenos, foram cedidos pelo Instituto Biológico (IB) e o Quadro 2 evidencia o tempo de crescimento e a procedência de cada fitopatógeno *in vitro*.

Esses microrganismos estavam preservados em tubos de ensaios com meio de cultura sólido e posteriormente, foram reativados em meio BDA. Após a reativação, foi realizado o microcultivo para caracterização microscópica e preservação ao acervo de microrganismos.

Quadro 2 - Fitopatógenos testados no teste de antagonismo

Cód IB	ID	Meio de cultura	Tempo de crescimento (dias)	Procedência
MMBF 13/11	<i>Phytophthora sojae</i>	BDA	5	Londrina, PR
MMBF 12/18	<i>Macrophomina phaseolina</i>	BDA	5	Paraná
MMBF 05/05	<i>Colletotrichum truncatum</i>	BDA	5	São Paulo, SP
MMBF 30/11	<i>Rhizoctonia solani</i>	BDA	3	Botucatu, SP
MMBF 04/19	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	BDA	14	Londrina, PR

4.4. Preservação

Os fungos filamentosos foram preservados segundo o método Castellani (DIOGO; SARPIERI; PIRES, 2005). Dessa forma, as colônias foram cortadas em cubos e transferidos para dois tubos esterilizados contendo água destilada autoclavada, seguido de armazenamento em refrigerador a 4°C.

As bactérias foram preservadas em glicerol 20% (KUMAR *et al.*, 2013). Desta forma, as colônias purificadas foram transferidas, com auxílio da alça de inoculação, para dois criotubos contendo 20% glicerol e 80% água destilada autoclavada e armazenados em congelador a -20°C.

4.5. Teste de Antagonismo

O teste de antagonismo, ou cultura pareada, evidencia a diminuição ou inibição do inóculo fitopatógeno pela ação do endofítico *in vitro*. Os fitopatógenos analisados no teste são *Phytophthora sojae*, *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum truncatum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*.

O experimento foi conduzido em placas de Petri de 90 mm. Os fitopatógenos e endofíticos foram cultivados isoladamente como controle e após 7 dias, foram transferidos para o experimento de antagonismo.

A análise dos dados, foi baseada na metodologia descrita por Badalyan, Innocenti e Garibyan (2002), no entanto foi adaptada de modo que foi possível pontuar os endofíticos que obtiveram ação antagonista contra os fitopatógenos. Para tal, foi considerado dois modos de ação do endofítico. Primeiramente, considerou-se a situação onde o endofítico não afetou/inibiu o crescimento do fitopatógeno, de modo que o endofítico SI (Sem inibição) recebeu 0 pontos. O segundo modo de ação, foi considerado que endofítico afetou/diminuiu o crescimento do fitopatógeno, recebendo 1 ponto para cada fitopatógeno que foi afetado. Esse segundo ainda foi subclassificado em 4 tipos de inibição, sendo:

- HI (Halo de inibição): A colônia do endofítico formou um halo de inibição com o micélio do fitopatógeno
- ID (Inibição à Distância): O endofítico diminuiu o inóculo do fitopatógeno à distância, considerando principalmente o direcionamento do crescimento patogênico para o lado oposto ao endofítico

- AE (Ação Endofítica): A colônia do endofítico cobriu todo ou parte do micélio fitopatogênico.
- Consórcio: Foi observado que a ação conjunta de 2 ou mais endofíticos presentes no teste limitaram o crescimento do fitopatógeno

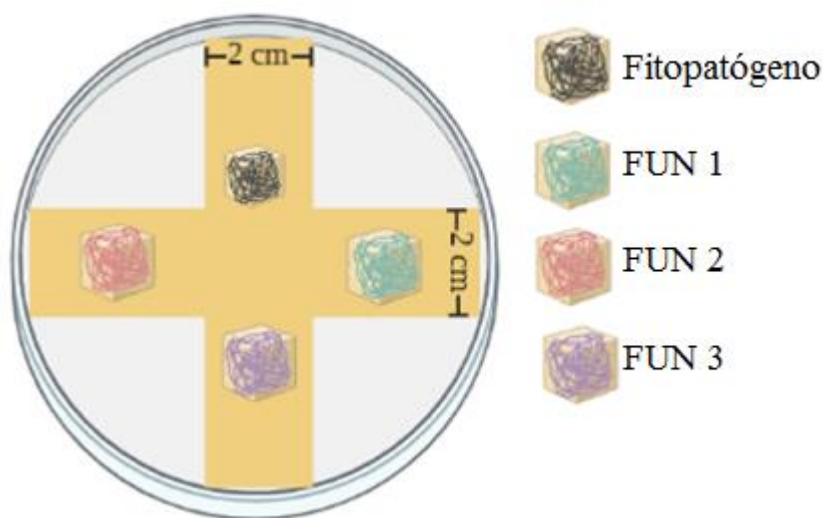
Finalmente, foi somado as pontuações dos endofíticos com objetivo de selecionar os isolados que mais comprometeram o crescimento fitopatogênico e elencar quais fungos e bactérias são potenciais candidatos para um produto de biocontrole.

4.5.1. Teste de antagonismo: fungos

Nos testes de antagonismo para fungos filamentosos, foram utilizadas placas com meio de cultura BDA e o teste foi dividido em etapa 1 e etapa 2.

Na etapa 1, os endofíticos e fitopatógenos foram reativados dos criotubos preservados pelo método Castellani e cresceram durante 7 dias para posterior inoculação nas placas do teste de antagonismo. No teste, o ágar cortado em formato de sinal positivo (+) com 20 mm de largura em cada faixa. Posteriormente, foi transferido um cubo de 0,5 cm de diâmetro em cada faixa, com o fungo endofítico. O fitopatógeno foi inoculado no centro da placa, como indica a figura 16. Os endofíticos foram escolhidos aleatoriamente para compor a placa.

Figura 16 - Esquema do teste de antagonismo. Disposição em sinal positivo (+) da placa de Petri. Há um cubo (0,5 cm) do antagonista no centro de cada faixa e um fitopatógeno, próximo do centro da placa. FUN: Fungo endofítico.



Fonte: Elaborado no BioRender, pela autora (2021)

Na etapa 1, foi possível descartar os endofíticos com ação do tipo SI (0 pontos), onde nenhum fitopatógeno foi inibido e selecionar para a etapa 2 os microrganismos que obtiveram ao menos 1 ação antagonista (1 ponto), sendo o mínimo 1 ponto e o máximo 5 pontos.

Na etapa 2, os fungos foram submetidos ao teste novamente para segunda seleção seguindo os mesmos critérios e pontuações.

Finalmente, obteve-se uma tabela com as pontuações das duas etapas onde foi possível somar os pontos da etapa 1 e 2 onde o mínimo foi 1 e o máximo 10 para eleger os endofíticos que foram destaque no experimento.

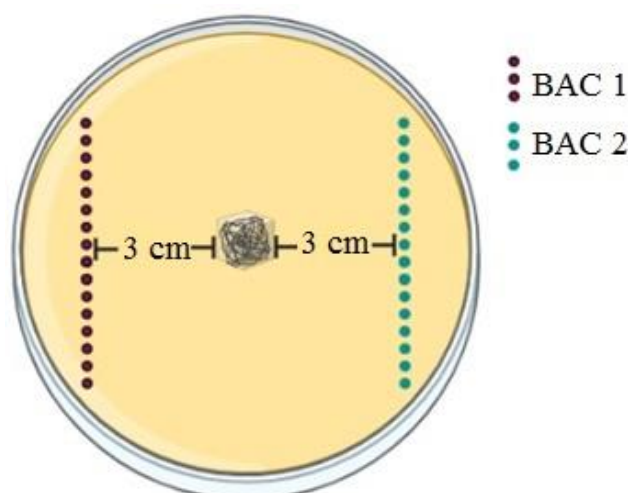
4.5.2 Teste de antagonismo: bactérias

O teste de antagonismo com as bactérias seguiram o método de cultura pareada adaptado de Chen *et al.*, (2018).

Os fitopatógenos foram inoculados nos meios de cultura NA (Nutriente Agar), ISP2 e YMA como controle do crescimento, no entanto o crescimento destes foram reduzidos no meio NA e a espécie *Sclerotinia sclerotiorum* apresentou crescimento muito lento nos três meios de cultura. Desta forma, os microrganismos dependentes do meio NA e *S. sclerotiorum* foram excluídas do teste de antagonismo com endofíticos bacterianos. Os demais fitopatógenos, não apresentando nenhuma variação de crescimento nos meios ISP2 e YMA.

No teste, foi inoculado um cubo, com o fitopatógeno, no centro da placa seguida de inoculação através de uma linha vertical com a bactéria endofítica sendo um endofítico diferente em cada lado da placa (Figura 17)

Figura 17 - Esquema do teste de antagonismo bacteriano. BAC: Bactéria endofítica.



Fonte: Elaborado no BioRender pela autora (2021)

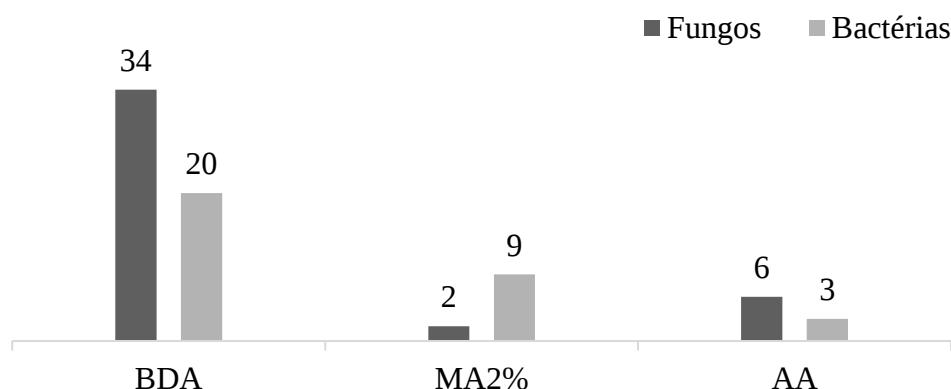
5. RESULTADOS

5.1. Isolamento

O isolamento foi feito a partir de 150 grãos de soja, recuperando inicialmente 73 microrganismos, sendo 42 fungos (FUN) e 32 bactérias (BAC). Durante a etapa de purificação, 4 isolados fúngicos e 6 bacterianos perderam a viabilidade, em um total de 9,6% de perda. Assim, o acervo atual conta com 62 microrganismos, 38 fungos e 24 bactérias.

Comparando-se a recuperação de isolados nos meios de culturas (Figura 18), foram obtidos, em ordem decrescente, 54 em BDA, 11 em MA2% e 9 em AA.

Figura 18 - Microrganismos recuperados no isolamento pelos meios de cultura BDA, MA2% e AA.



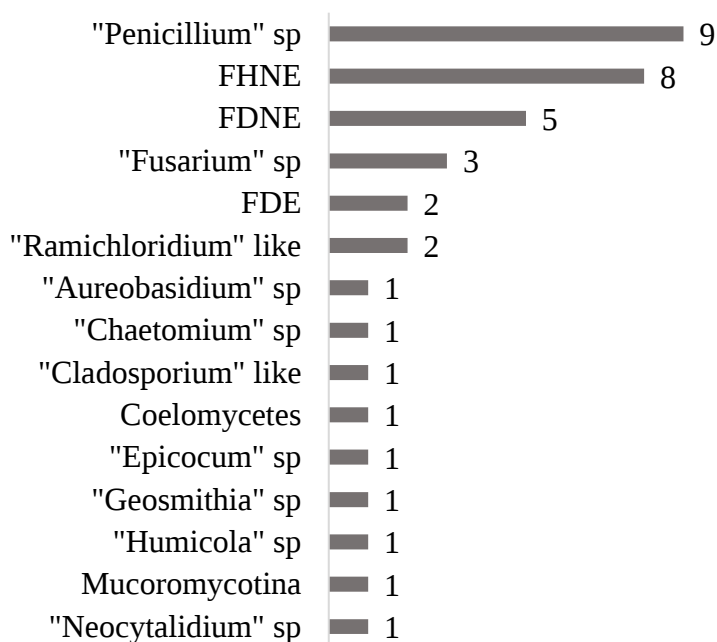
Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Após, os isolados foram transferidos para a etapa de purificação, sendo os fungos para o meio BDA e as bactérias para os meios ISP2, YMA e NA. Os diferentes meios para bactérias, possibilitaram crescimento adequado para cada linhagem. O Meio ISP2 recuperou o maior número de isolados (n=14) e os meios YMA (n=05) e NA (n=05).

5.2. Identificação preliminar de fungos endofíticos

Através das caracterizações morfológicas e microscópicas da colônia, os 38 fungos foram agrupados em 12 táxons. Os fungos que não apresentaram estruturas reprodutivas ou não foi possível identificar, foram agrupadas em fungos hialinos não esporulante (FHNE), fungo dematiáceos não esporulante (FDNE) e fungos dematiáceos esporulantes (FDE). A figura 19, relaciona os grupos e a ocorrência dos mesmos.

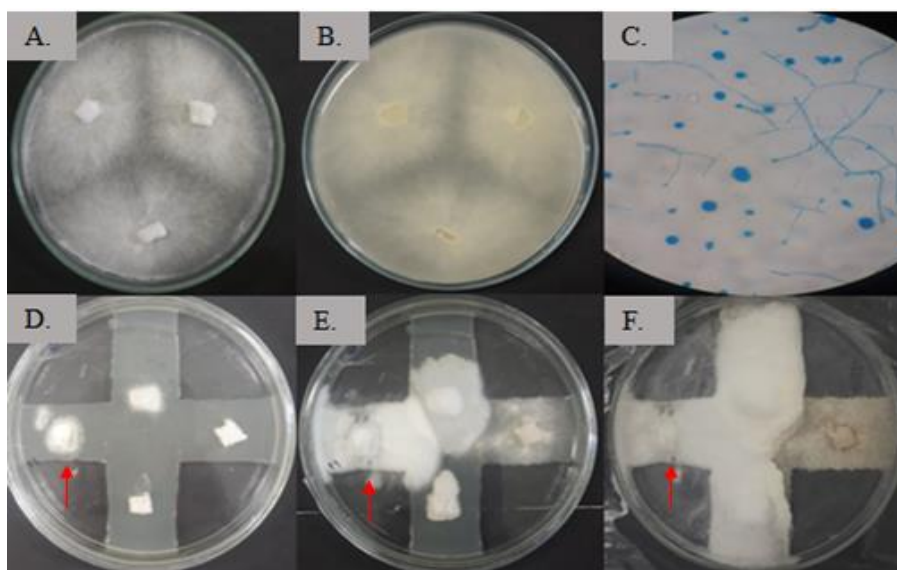
Figura 19 - Táxons de fungos endofíticos isolados de grão de soja. FHNE: Fungo Hialino Não Esporulante; FDNE: Fungo Dematiáceo Não Esporulante; FDE: Fungo Dematiáceo Esporulante



Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Além disso, foi identificado através da microscopia, 6 isolados de fungos formadores de clamidósporos. Segundo Webster e Weber (2007), clamidósporos são estruturas com paredes espessas, intercalares ou terminais, cuja função está associada à reserva energética de lipídeo e glicogênio, produzidos principalmente sob estresse. A figura 20, aponta o fungo FHNE (FUN14) um dos representantes dos formadores de clamidósporos, bem como o desempenho do endofítico nos testes de antagonismos.

Figura 20 – FHNE (FUN14) formador de clamidósporo e antagonista contra *P. sojae*, *M. phaseolina*, *C. truncatum* e *R. solani*. A. Frente da colônia. B. Verso da colônia. C. Clamidospóros observados, 200x. D. 48h de teste, a seta indica o FUN14. E. 96h de teste F. Resultado após 168h de teste.



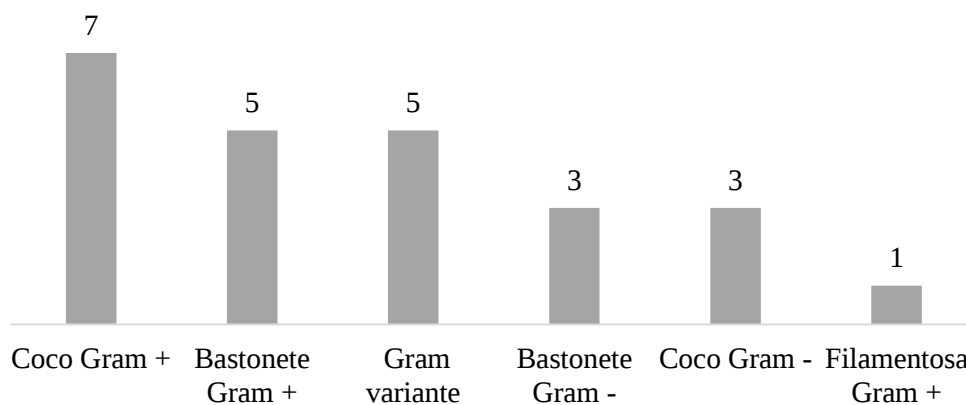
Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Através das análises macroscópicas foi possível identificar os fungos filamentosos produtores de exsudatos e pigmentos. Desta forma, observou-se 3 linhagens produtoras de pigmento, 8 linhagens produtoras de exsudatos e 8 linhagens produtoras de exsudatos somado ao pigmento. As cores observadas dos exsudatos foram: rosáceo, vermelho, amarelo, marrom, transparente e vermelho. Os pigmentos, envolvem principalmente a mudança de coloração do meio de cultura sólido (BDA) e foi observado as colorações vermelho, amarelo, marrom e alaranjado.

5.3. Identificações preliminar de bactérias

A coloração de Gram possibilitou o reconhecimento dos microrganismos unicelulares em 6 grupos: Coco Gram⁺ (n=7), Bastonete Gram⁻ (n=5), Bastonete Gram⁻ (n=3), Gram variante (n=5), Coco Gram⁻ (n=3), e filamentoso Gram⁺ (n=1). A figura 21, evidencia os grupos e a ocorrência desses microrganismos.

Figura 21 - Grupos e ocorrências de bactérias isolados do grão de soja. (+): positivo; (-): negativo

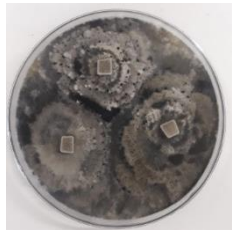
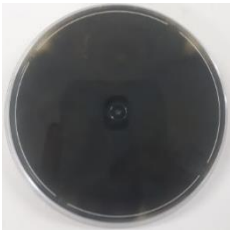
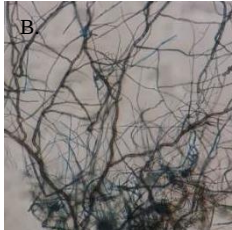
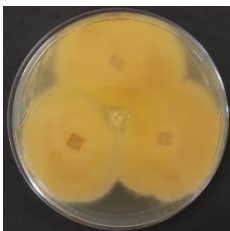
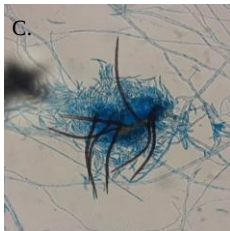
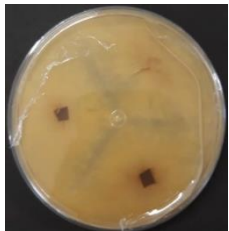
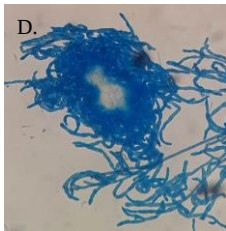
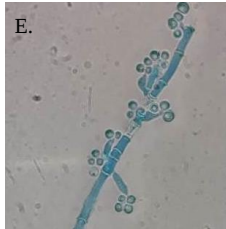


Fonte: Elaborado pela autora (2021)

5.4. Caracterização dos fitopatógenos

Os 5 fitopatógenos foram submetidos ao microcultivo seguido de preservação pelo método *Castellani*. O Quadro 3, evidencia a fotodocumentação frente e verso das placas e microscopia.

Quadro 3- Placa frente, reverso e microscopia dos fitopatógenos. *P. sojae*, *M. phaseolina*, *C. truncatum* e *R. solani*, fotodocumentadas após 5 dias de crescimento e *S. sclerotiorum* após 15 dias. A. 1000x. B. 400x. C. 400x. D. 400x. E. 1000x.

Identificação Fitopatógeno	Frente	Reverso	Micrografia
<i>Phytophthora</i> <i>sojae</i> MMBF 13/11			
<i>Macrophomina</i> <i>phaseolina</i> MMBF 12/18			
<i>Colletotrichum</i> <i>truncatum</i> MMBF 05/05			
<i>Rhizoctonia</i> <i>solani</i> MMBF 30/11			
<i>Sclerotinia</i> <i>sclerotiorum</i> MMBF 04/19			

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

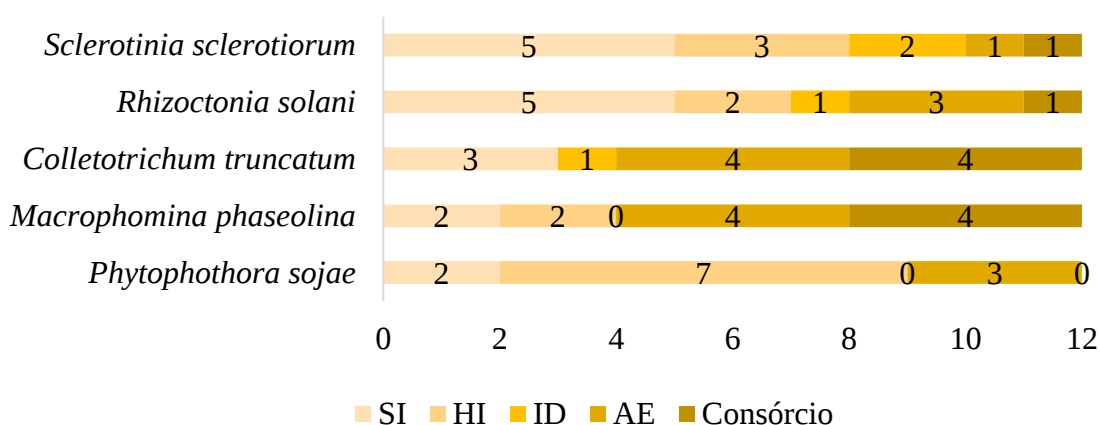
5.5. Teste de Antagonismo

5.5.1. Antagonistas fúngicos

Dos 38 isolados, foram selecionados 35 fungos endofíticos para o teste de antagonismo sendo 3 endofíticos excluídos por apresentarem tempo de crescimento superior a 7 dias. A linhagem de *S. sclerotiorum* foi inoculada 7 dias antes dos endofíticos, pois o tempo de crescimento até a formação de escleródios variou $14 (\pm 2)$ dias.

Na etapa 1, os 35 fungos foram testados contra os 5 fitopatógenos (3 endofíticos por placa multiplicado por 5 fitopatógenos) obtendo-se 60 placas. No 7º dia, o experimento foi finalizado e as placas foram pontuadas segundo os critérios de Badalyan, Innocenti e Garibyan (2002), a figura 22 evidência o resultado da etapa 1 de acordo com os cinco tipos de ação do endofítico contra os fitopatógeno.

Figura 22– Resultado da etapa 1 do teste de antagonismo (correspondente a 60 placas). SI: Sem inibição do fitopatógeno; HI: Halo de inibição de endofítico e fitopatógeno; ID: Inibição da distância pelo endofítico; AE: Endofítico cobriu o micélio do fitopatógeno; Consórcio: 2 ou mais endofíticos atuaram na inibição do crescimento do fitopatógeno.



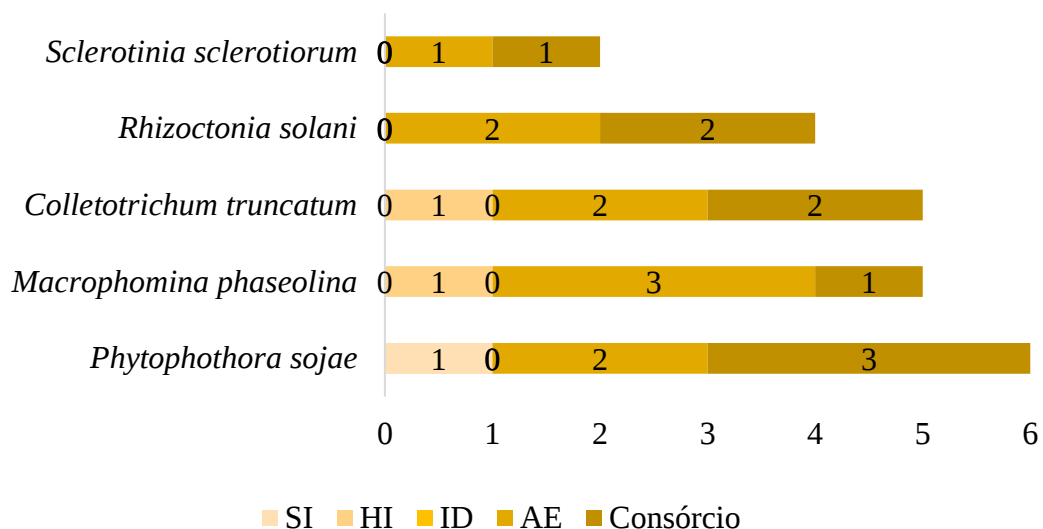
Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Na etapa 1, foi atribuído pontos aos endofíticos onde, 0 = não inibiu nenhum fitopatógeno e 5 = inibiu todos os fitopatógenos. Do total de endofíticos, 21 inibiram ao menos 1 fitopatógeno e foram selecionados para a etapa 2.

Na etapa 2, os endofíticos foram distribuídos nas placas de antagonismo de acordo com os fitopatógenos que inibiram na etapa 1. Desta forma, *P. sojae*, *M. phaseolina* e *C. truncatum* contaram com 5 placas para cada teste, *R. solani* (n=4) e *S. sclerotiorum* (n=2). Após 7 dias, o

teste foi finalizado e pode-se, novamente, atribuir pontos a ação de cada endofítico de acordo com os critérios e estabelecer os resultados exibidos na figura 23.

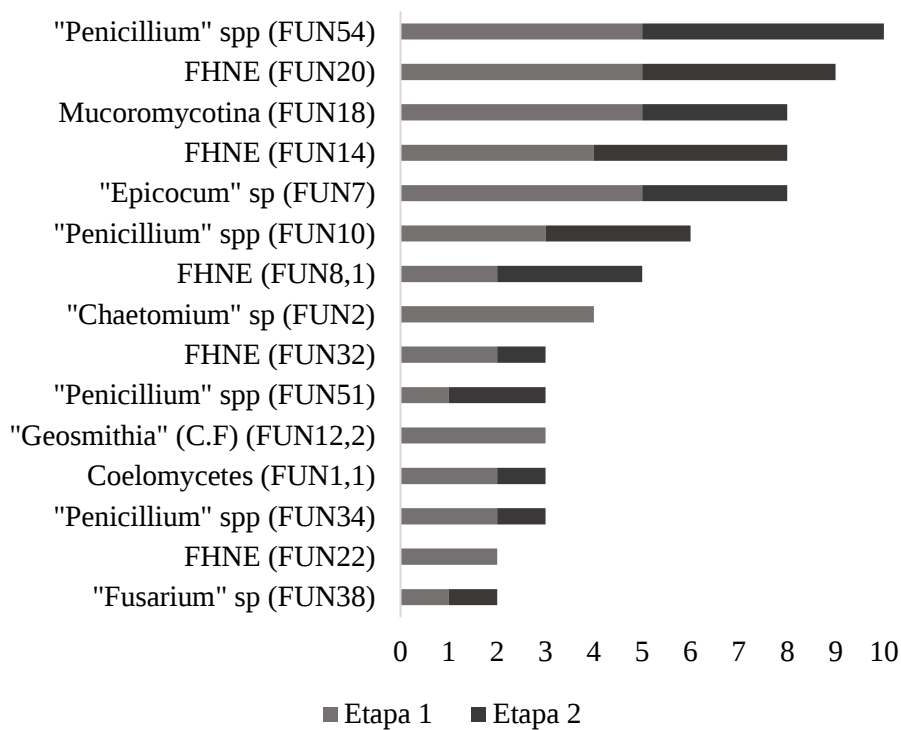
Figura 23– Resultado da etapa 2 do teste de antagonismo (corresponde a 29 placas). SI: Sem inibição do fitopatógeno; HI: Halo de inibição de endofítico e fitopatógeno; ID: Inibição da distância pelo endofítico; AE: Endofítico cobriu o micélio do fitopatógeno; Consórcio: 2 ou mais endofíticos atuaram na inibição do crescimento do fitopatógeno.



Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Finalmente obteve-se uma tabela com as pontuações de todos os endofíticos nos dois testes, que foram somados, onde 1 = inibiu apenas 1 fitopatógeno na etapa 1 e 10 = inibiu todos os fitopatógenos nas etapas 1 e 2. A partir do resultado da pontuação, elencamos 15 fungos que obtiveram no mínimo 2 pontos. A figura 24 exibe os grupos de endofíticos e as pontuações.

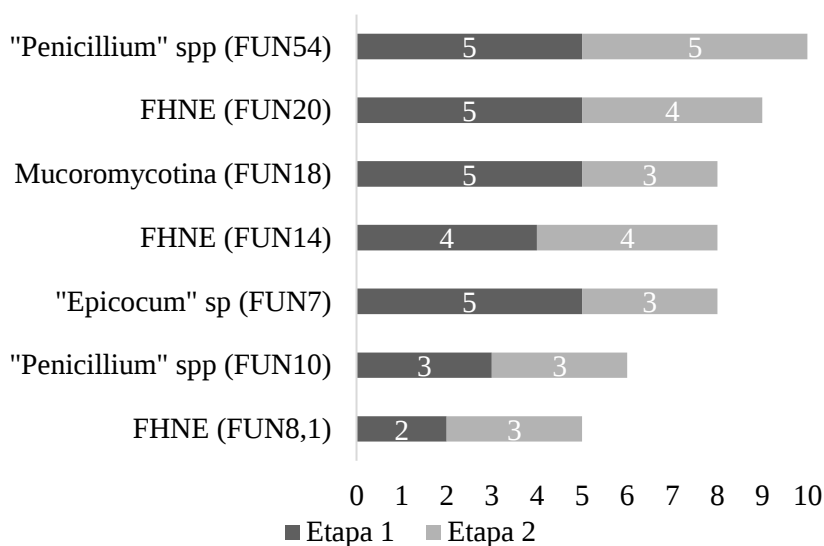
Figura 24 – Resultado da somatória de pontuações das etapas 1 e 2, onde 1 = endofítico inibiu apenas 1 fitopatógeno na etapa 1 e 10 = endofítico inibiu todos os fitopatógenos nas etapas 1 e 2. FHNE: Fungo hialino não esporulante



Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Dos 15 fungos, foi possível identificar os endofíticos com ação antagonista em 50% das placas (no mínimo 5 pontos). Desta forma foi selecionado 7 principais antagonistas, sendo o *Penicillium* spp. (FUN54) com pontuação máxima, 10 pontos. A figura 25 evidencia a soma das pontuações das etapas 1 e 2.

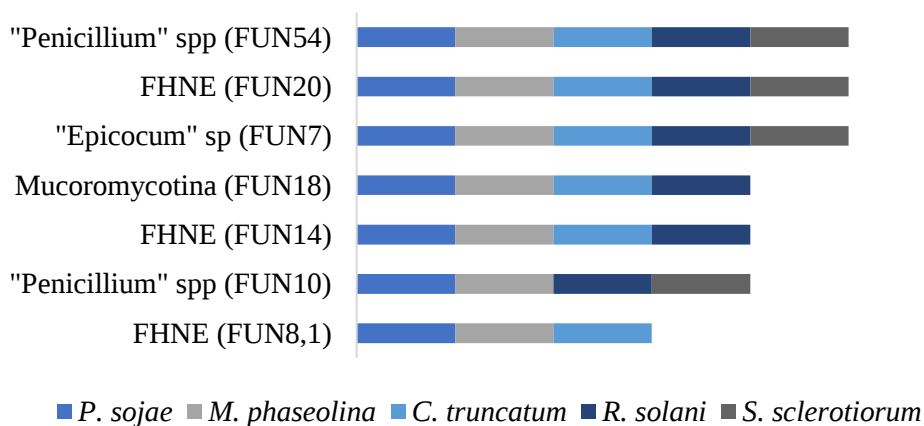
Figura 25 - Resultado final da somatória de pontos atribuídos aos fungos endofíticos antagonistas. FHNE: Fungo hialino não esporulante; FUN: Fungo



Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Para finalizar a análise, pode-se observar os fitopatógenos inibidos por cada fungo endofítico. Desta forma, obtivemos que 3 fungos endofíticos com capacidade antagônica contra todos os 5 fitopatógenos estudados nesse trabalho (Figura 26).

Figura 26 - Relação da capacidade antagônica dos endofíticos para cada fitopatógeno.

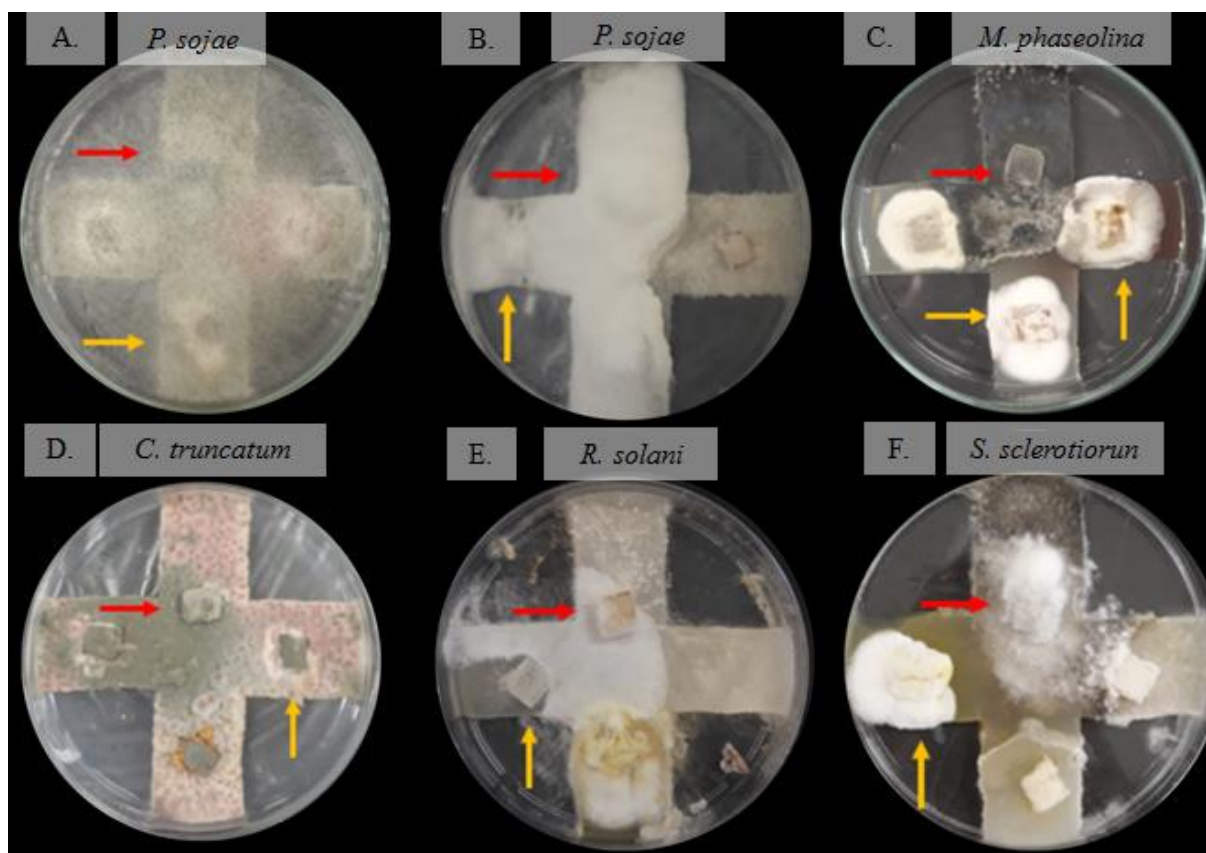


Fonte: Elaborado pela autora (2021)

A Figura 27, exibe alguns resultados obtidos nos testes de antagonismo com endofíticos fúngicos evidenciando a ação antagônica dos 7 principais antagonistas deste trabalho, segundo os critérios estabelecidos. Nas Figura 27A, 27B, 27D e 27E, podemos destacar que a ação antagônica dos endofíticos foram do tipo AE (o endofíticos cobriu todo ou parte do micélio do

fitopatógeno), enquanto que a figura 27F o micélio do endofítico e fitopatógeno formaram HI (halo de inibição). As Figura 27C, observamos que todos os endofíticos contribuíram para a diminuição do crescimento do micélio do fitopatógeno, portanto trata-se de inibição por consórcio.

Figura 27- Resultados dos testes de antagonismo evidenciando os 7 endofíticos fúngicos que obtiveram as maiores pontuações contra os 5 fitopatógenos que foram testados, segundo os critérios estabelecidos no tópico 4.5.1. A seta amarela indica os endofíticos e a vermelha os fitopatógenos. A. endofítico FUN18; B. endofítico FUN14; C. Consórcio entre FUN45,1; FUN7 e FUN8,1; D. endofítico FUN54; E. endofítico FUN20; F. endofítico FUN10



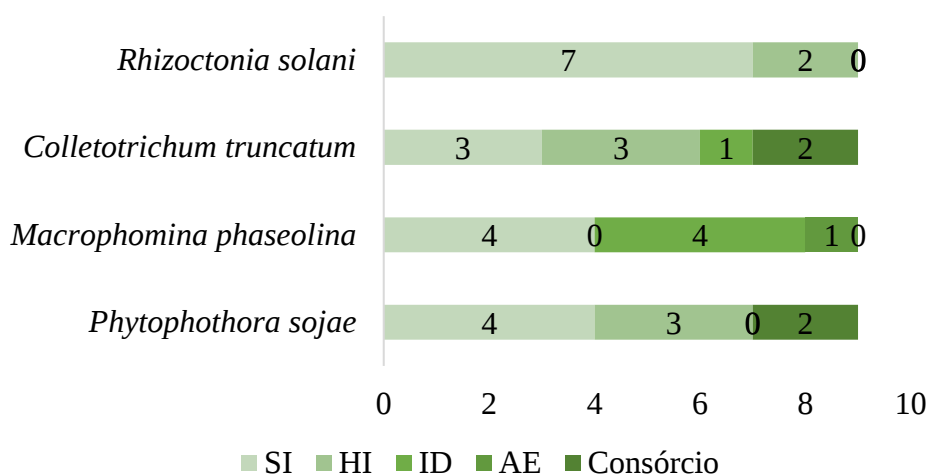
Fonte: Elaborado pela autora (2021)

5.5.2. Antagonistas bacterianos

As bactérias foram confrontadas com os fitopatógenos *P. sojae*, *M. phaseolina*, *C. truncatum* e *R. solani* nos meios de cultura YMA e ISP2. A linhagem *S. sclerotiorum* foi desconsiderada uma vez que o tempo de crescimento nos meios de culturas destinados as bacterias não foi suficiente para o crescimento da colônia e formação de escleródios, o mesmo ocorreu para o meio NA com os outros fitopatógenos.

Foram selecionados 18 endofíticos bacterianos totalizando 9 testes para cada fitopatógeno (total de 36 placas). O resultado das placas de cada fitopatógeno está evidenciado na figura 28.

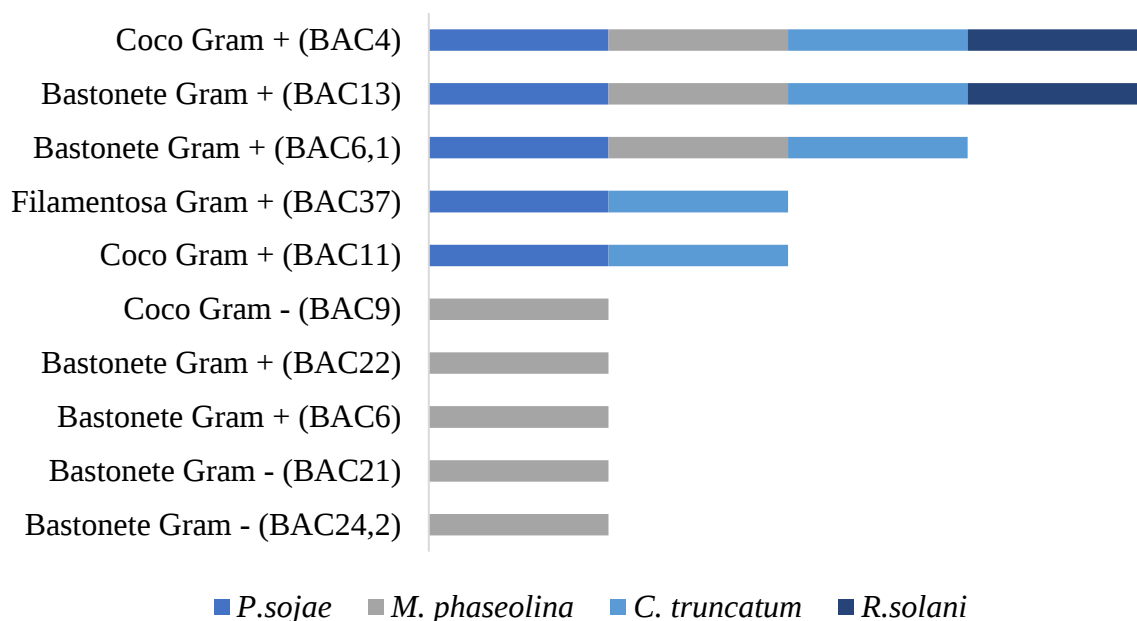
Figura 28 - Resultado do teste de antagonismo para endofíticos bacterianos (correspondente a 36 placas). SI: Sem inibição do fitopatógeno; HI: Halo de inibição de endofítico e fitopatógeno; ID: Inibição da distância pelo endofítico; AE: Endofítico cobriu o micélio do fitopatógeno; Consórcio: 2 ou mais endofíticos atuaram na inibição do crescimento do fitopatógeno



Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Posteriormente, os endofíticos foram pontuados conforme obtiveram atividade antagonista contra os fitopatógenos, onde 0 = não inibiu nenhum fitopatógeno e 4 = inibiram os 4 fitopatógenos. Dos 18 isolados, 55% (n=10) inibiram ao menos 1 fitopatógeno enquanto que 27% (n=5) inibiram no mínimo 2 fitopatógenos. Importante ressaltar que 2 isolados mostraram ação antagonista contra os 4 fitopatógenos testados, a figura 29 evidencia os endofíticos potenciais antagonistas deste trabalho.

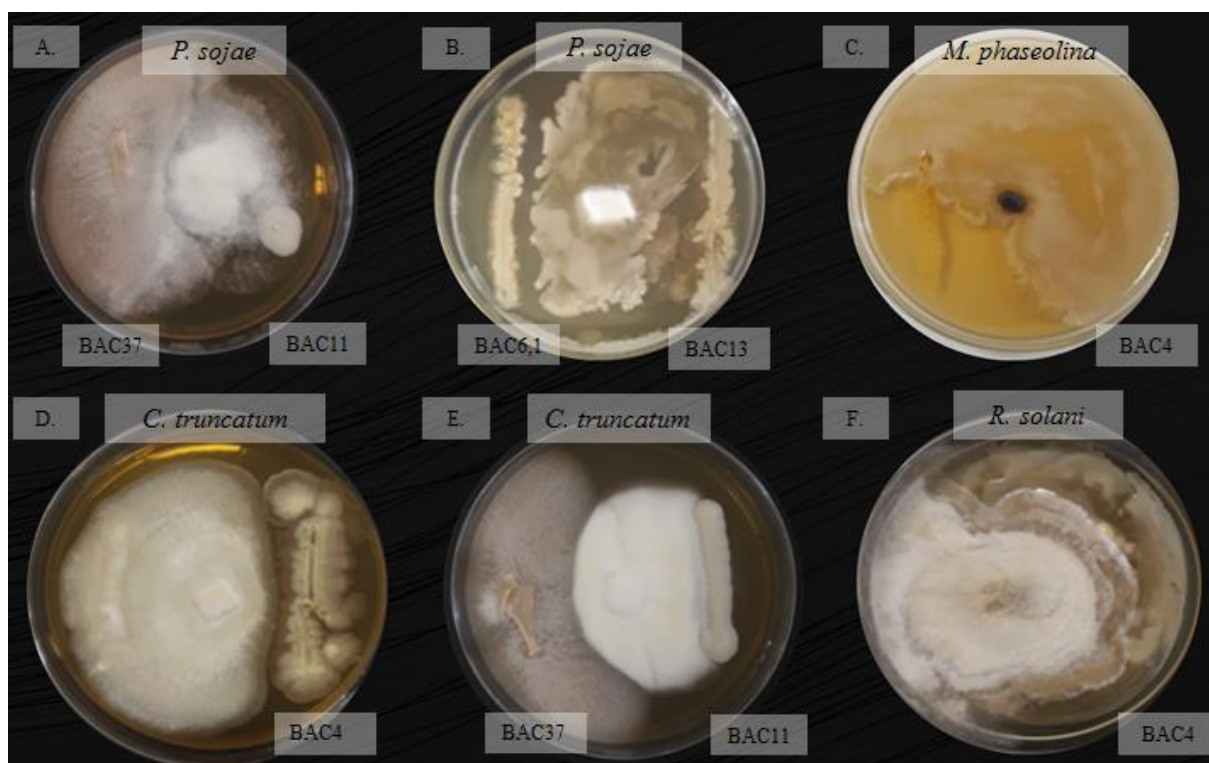
Figura 29 - Resultado final dos endofíticos bacterianos que inibiram 2 ou mais fitopatógenos.



Fonte: Elaborado pela autora (2021)

A Figura 30, exibe alguns dos resultados obtidos nos testes de antagonismo com endofíticos bacterianos evidenciando a ação antagonística dos 5 principais antagonistas bacterianos frente aos fitopatógenos *P. sojae*, *M. phaseolina*, *C. truncatum* e *R. solani*, a partir dos critérios estabelecidos. Desta forma, podemos observar que as figuras 30A, 30B, 30C e 30F os fitopatógenos sofreram a inibição do tipo ID, uma vez que os endofíticos bacterianos diminuíram consideravelmente o micélio dos fitopatógenos. Enquanto que a Figura 30D é possível identificar como sendo a inibição do tipo HI, com formação de um halo de inibição da BAC4 contra do fitopatógeno *C. truncatum*, que por sua vez cresceu do lado oposto e cobriu todo a colônia do outro endofítico. Por fim, observamos a Figura 30E com inibição do tipo consórcio, pois notamos que o inóculo de *C. truncatum* diminuiu consideravelmente nos dois lados, no que tange às BAC11 e BAC37.

Figura 30 - Resultados dos testes de antagonismo evidenciando os 5 endofíticos bacterianos que obtiveram as maiores pontuações contra os 4 fitopatógenos, segundo os critérios estabelecidos no tópico 4.5.1.



Fonte: Elaborado pela autora (2021)

6. DISCUSSÃO

“Duplicar a produtividade agrícola e o rendimento dos pequenos produtores de alimentos”, buscando a erradicação da fome, constitui um dos objetivos de desenvolvimento sustentável da ONU até 2030 (<https://unric.org/pt/objetivo-2-erradicar-a-fome/>). Nessa missão, uma das oportunidades que surgem é o biocontrole de pragas e fitopatógenos para ajudar a minimizar o uso de defensivos químicos nas lavouras, mantendo ou aumentando a produtividade das mesmas.

A comercialização de grãos, por exemplo, envolve tratamentos como a adição de fungicidas para evitar a colonização de fungos fitopatogênicos, mas desde o plantio das sementes o solo já recebe adubos químicos e diferentes produtos sanitários. Em situações onde se deseja eliminar, reduzir ou retardar a ocorrência de doenças causadas por microrganismos, recomenda-se também o estabelecimento de um período de “vazio sanitário para a cultura”, quando pelo menos por 60 dias deve-se manter a ausência total de plantas vivas de soja. Essa prática diminui o aparecimento do inóculo da doença e a necessidade de outros métodos de

controle, sendo uma economia nos custos de produção (<https://amazonfertilizantes.com.br/as-5-melhores-praticas-para-o-cultivo-de-graos/>) .

Assim, várias estratégias são usadas para preservar a produtividade das colheitas, mas o controle biológico desponta como uma das mais sustentáveis, rentáveis (RASHAD; MOUSSA, 2020) e ecologicamente assertivas. Existem diversos estudos que mostram resultados promissores em várias regiões do mundo (AHMAD *et al.*, 2021; FALAHZADAH; KARIMI; GAUGLER, 2020; MIGWI *et al.*, 2020; TILOCCA; CAO; MIGHELI, 2020).

Como mencionado anteriormente, os grãos utilizados nesse estudo receberam um banho de “Coopermax TB”, que dentre seus componentes possui o fungicida “Derosal Plus” composto por *Carbendazim* (15%) e *Triam* (35%). Apesar disso, 62 isolados microbianos foram recuperados em cultura ativa, indicando que esses endofíticos são resistentes ao composto ativo, ou capazes de biodegradá-lo.

Spagnoletti e Chiocchio (2019), ao testar a resistência de endófitos de raízes ao *Carbendazim* descobriu efeito negativo em fungos micorrizos e em biocontroladores comuns como *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. Em contrapartida, esses autores evidenciaram que o fitopatógeno *Alternaria alternata* tem capacidade de degradar o *Carbendazim in vitro*. Rathjen *et al.* (2020) ao estudar o efeito do *Triam* em rizobactérias de sementes de leguminosas, detectou baixa sobrevivência de rizóbios nas sementes que, por sua vez, diminuíram a nodulação das raízes. Nossa hipótese é que o tratamento com “Coopermax TB” cause desbiose na comunidade endofítica uma vez que há microrganismos que se aproveitam dele como fonte de carbono e outros que são inibidos na sua presença. Balbín-Suárez *et al.* (2021), utilizaram o conceito de desbiose referente ao desequilíbrio do microbioma do rizoplane de macieira. Foi observado que as pressões ambientais, incluindo fitopatógenos, resultaram em um forte mecanismo de defesa da planta acarretando a desbiose, como consequência houve aparecimento de diversos sintomas na planta.

Além do tratamento com “Derosal Plus”, foi adicionado sulfato de Estreptomicina ao meio de cultura durante a etapa de isolamento. Nas placas de isolamento, foi acrescido 400 µL do antibiótico Estreptomicina diluídos em 1 litro de meio de cultura BDA, para evitar o crescimento de bactérias. A estreptomicina é um antibiótico aminoglicosídeos isolado de *Streptomyces griseus* com ação contra bactérias aeróbicas gram-negativas, muito utilizado em quadros de Tuberculose, contudo inúmeras bactérias são estudadas pela resistência ao antibiótico (WATERS; TADI, 2021). Neste trabalho, foram isoladas 6 bactérias Gram negativas, com provável resistência à estreptomicina.

Ao que tudo indica, esse é o primeiro trabalho relatado sobre microrganismos endofíticos do grão da soja tratada com “*Derosal Plus*”. Os dados dessa investigação contribuem para pesquisas de consórcio microbiano resistentes a fungicidas, com potencial para produção de um produto visando um manejo integrado.

Yang *et al.* (2018) isolaram fungos endofíticos de raízes e grãos de soja em regiões do Japão. Os gêneros mais abundantes no grão foram *Cladosporium*, *Alternaria*, *Engyodontium*, *Guehomyces*, *Nigrospora* e *Aspergillus*. Em comparação, nesse trabalho a identificação preliminar evidenciou 1 isolado de *Cladosporium*, contudo há outros isolados dematiáceos que oportunamente serão identificados por sequenciamento do DNA genômico, podendo revelar outros gêneros

O táxon com maior ocorrência no isolamento foi *Penicillium* spp. (n=9). Estudos relatam que linhagens desse gênero produzem o fitormônio Giberelina aumentando o crescimento da planta (LEITÃO; ENGUITA, 2016). São resistentes a metais pesados o que possibilita um menor estresse para plantas em altos níveis de contaminação por agroquímicos (KHAN; LEE, 2013). Atuam como antagonista contra diversos fitopatógenos, incluindo *Fusarium* spp. e possuem atividade de biorremediação e outras aplicações agrícolas e biotecnológicas (TOGHUEO; BOYOM, 2020). Apesar dos benefícios, Felšöciová *et al.* (2020) relataram que outras espécies desse gênero podem atuar como agentes fitopatogênicos. Desta forma é necessário a identificação do DNA genômico das linhagens de *Penicillium* spp. para confirmação da espécie e desvendar o papel ecológico no grão, uma vez que a identificação morfológica se mostra ineficiente para identificação ao nível de espécie.

Os fungos não esporulantes, também tratados por *Mycelia sterilia*, somaram 13 linhagens (34%) do total. Esse grupo é composto por fungos que não formam estruturas reprodutivas *in vitro* devido à alta especificidade que apresentam. Lacap, Hyde, Liew (2003), demonstraram que *Mycelia sterilia* são comumente encontrados em fungos endofíticos, a proporção pode chegar até 54% do total de isolados.

Nosso isolamento recuperou 15,7% (n=6) linhagens formadoras de clamidósporos, na maioria fungos não esporulantes, hialinos ou dematiáceos. Segundo Webster e Weber (2007), clamidósporos são estruturas com paredes espessas, intercalares ou terminais, cuja função está associada à reserva energética de lipídeo e glicogênio, produzidos principalmente sob estresse. Essas estruturas foram observadas em grande diversidade de fungos incluindo Ascomycetes, e Basidiomycetes (LIU *et al.*, 2020). A formação de clamidósporos em *Mycelia sterilia* não é bem entendido, contudo novos estudos sobre essa associação podem fornecer dados importantes para o cultivo de endofíticos.

Fungos formadores de clamidósporos são, particularmente importantes para as pesquisas associadas ao biocontrole. Foi observado por Cha *et al.* (2016), que a dificuldade de controlar a fusariose em morangos está associado à formação de clamidósporos que causam resistência por longos períodos. No estudo de Cuadrado-Orsorio *et al.* (2021), os pesquisadores observaram que os fungos captadores de nematoides, como *Arthrobotrys* sp., adquiriam maior resistência devido à presença de clamidósporos.

Nesse estudo, o endófito FHNE (FUN14), formador de clamidósporo, cresceu sobre o micélio de *P. sojae*, *M. phaseolina*, *C. truncatum* e *R. solani* nas etapas 1 e 2, com essas estruturas intercalares e terminais, mostrando-se um endofítico extremamente resistente. A figura 20.C evidencia essas estruturas e a figura 20.D, E e F a supressão do fitopatógeno no teste de antagonismo.

Através da caracterização macroscópica e com auxílio do estereomicroscópio, foi possível identificar que 54% (n=20) dos isolados produzem exsudatos e/ou pigmentação do meio de cultura. Esses metabólitos são bem estudados na literatura para produção de fármacos, resposta aos metabólitos das plantas, inibidor de patógenos, dentre outros. A formação de gotículas, gutação ou exsudatos é comumente observada em colônias de fungos filamentosos *in vitro*. A exsudação ocorre no micélio aéreo e o líquido pode ser pigmentado ou hialino. Hutwimmer *et al.* (2010), mencionaram que os exsudatos são reservatórios de água, metabólitos secundários e enzimas. Em *Sclerotinia* sp., os exsudatos precedem a lise da membrana plasmática para formação de escleródios, o que explicaria a eficiência dessas estruturas no crescimento e na disseminação desse fitopatógeno.

El-hawary *et al.* (2021), através de um estudo inédito e promissor, investigaram os metabólitos provenientes da raiz de soja que possibilitariam a produção de fitofármacos para COVID-19. Os autores identificaram três compostos com potencial para produção da droga. Esses resultados preliminares demonstram a importância econômica da investigação de metabólitos secundários e a soja, por sua vez, exibindo mais um campo valioso de investigação.

Gareis e Gottschalk (2007), mostraram que os exsudatos de dois contaminantes de alimentos, *Penicillium nordicum* e *P. verrucosum* contém grande quantidade da micotoxina “ocratoxina”, as quais estão presentes principalmente nos exsudatos quando comparados ao micélio.

Dos fungos endofíticos isolados neste trabalho, 54% apresentaram exsudação. El-Bondkly *et al.* (2021), relatam uma gama de compostos exclusivos dos fungos filamentosos, dentre esses os antifúngicos, antivirais e antibióticos com potencial para serem melhor explorados no âmbito do controle biológico.

Dos 62 microrganismos recuperados dos grãos de soja, 90% (n=55) foram avaliados no teste de antagonismo. Deste total 59% (n=36) exibiram ações antagonistas e 19% (n=12) dos isolados foram selecionados por apresentarem resultados promissores para pesquisas futuras. Nesse sentido, dessas 12 linhagens estudadas 7 são fungos e 5 são bactérias, com destaque para 3 fungos (FUN54, FUN20 e FUN7) e 2 bactérias (BAC13 e BAC4) que foram capazes de antagonizar todos os fitopatógenos ao qual foram testados.

Dentre os fungos filamentosos, o isolado *Penicillium* spp. (FUN54) antagonizou todos os fitopatógenos testados nesse trabalho. O modo de inibição aconteceu com o micélio do *Penicillium* crescendo sobre a colônia do fitopatógeno. Liang *et al.* (2021), isolaram de amostras de solo de arroz, um novo táxon de *Penicillium* para investigar o potencial inibitório contra 7 fitopatógenos do *Citrus*, incluindo *Colletotrichum gloeosporioides* e *R. solani*. Embora o táxon tenha demonstrado resultados promissores não conseguiu inibir *R. solani*. Neste trabalho, o isolado *Penicillium* spp. (FUN54) foi capaz de inibir todos os fitopatógenos inclusive *R. solani*. Rashmi, Kushveer e Sarma (2019), através de um levantamento bibliográfico, relataram mais de 100 plantas que possuem *Penicillium* endofítico, por isso acreditamos que esse gênero pertence a um campo abrangente de pesquisas para biocontrole.

O isolado *Epicocum* sp. (FUN7) foi o segundo melhor antagonista para controle dos fitopatógenos estudados, sendo o modo de ação por halo de inibição. Há poucos trabalhos investigando o potencial de biocontrole desse gênero, contudo Taguiam, Evallo e Balendres (2021) revelaram que o mesmo tem ação antagonista contra uma gama de fitopatógenos, mas a identificação da espécie é importante, uma vez que o gênero também conta com representantes fitopatógenos. Recentemente Del Frari (2019), testou o potencial de *Epicoccum layuense* contra fitopatógenos da videira e mencionou a linhagem como um candidato promissor como agente de biocontrole.

Para o representante de Mucoromycotina (FUN18), foi observada a inibição dos fitopatógenos através do crescimento sobre o micélio patogênico, posteriormente produzindo grande quantidade de exsudatos. Os exsudatos do Mucoromycotina podem estar associados à capacidade de degradação do micélio do fitopatógeno e por isso se revelou como um dos principais antagonistas desse trabalho.

7. CONCLUSÕES

O grão de soja possui microrganismos endofíticos com potencial para o biocontrole dos fitopatógenos *Phytophthora sojae*, *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum truncatum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Assim, constitui uma fonte importante para construção de acervos de interesse para o agronegócio no tocante ao controle de pragas.

A metodologia utilizada é adequada à proposta do estudo, mostrando que não há um grande número de táxons presentes nesse substrato, com a preponderância de fungos hialinos do Filo Ascomycota produtores de exsudatos e clamidósporos, em sua maioria.

Bactérias Gram Positivas (em maior número), Gram negativas e Gram variantes encontram-se presentes nos grãos de soja.

O acervo estruturado nesse levantamento será o ponto de partida para a elaboração de um produto biológico com aplicação para biocontrole, e também o objeto de outras pesquisas ao nível da Pós-graduação, em parceria com uma empresa bem estabelecida no ramo.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, G. *et al.* Biological control: a novel strategy for the control of the plant parasitic nematodes. Antonie van Leeuwenhoek, **International Journal of General and Molecular Microbiology**, Cairo, v. 9, 2021.
- ALENGEBAWY, A. *et al.* Heavy Metals and Pesticides Toxicity in Agricultural Soil and Plants: Ecological Risks and Human Health Implications. **Toxics**, Basel, v. 9, n. 3, p. 42-25, fev 2021.
- ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: Unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Düsseldorf, v. 90, n. 6, p. 1829–1845, 2011.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS EMPRESAS DE CONTROLE BIOLÓGICO. Biodefensivos registrados. **Produtos biológicos de controle registrados no Brasil desde 2005**. São Paulo, 2019. Disponível em: <https://www.abcbio.org.br/biodefensivos-registrados/>. Acesso em: 13 jun 2020.
- ASSUMPÇÃO, L. C. *et al.* Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 5, p. 503–510, 2009.
- BADALYAN, S. M.; INNOCENTI, G.; GARIBYAN, N. G. Antagonistic activity of xylotrophic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 41, n. 3, p. 220–225, 2002.
- BALBÍN-SUÁREZ, A. *et al.* Root exposure to apple replant disease soil triggers local defense response and rhizoplane microbiome dysbiosis. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 97, n. 4, p. 1–14, 2021.
- BEN-DAVID, A.; DAVIDSON, C. E. Estimation method for serial dilution experiments. **Journal of Microbiological Methods**, [S.l.], v. 107, p. 214–221, 2014.
- BETTIOL, W. **Controle Biológico de doenças de plantas**. 1. ed. Jaguariuna: EMBRAPA-CNPDA, 1991.
- BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, Dakota, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2006.
- CHA, J. Y. *et al.* Microbial and biochemical basis of a Fusarium wilt-suppressive soil. **ISME Journal**, [S.l.], v. 10, n. 1, p. 119–129, 2016.
- CHEN, L. *et al.* A comprehensive understanding of the biocontrol potential of *Bacillus velezensis* LM2303 against *Fusarium* head blight. **PLOS ONE**, [S.l.], v. 13, n. 6, p. 1–22, 2018.
- CHET, I.; INBAR, J. Biological control of fungal pathogens. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Rehovot, v. 48, n. 1, p. 37–43, 1994.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento de safra brasileiro – grãos: Sexto levantamento, março 2020 – safra 2019/2020. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento. 2013. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>. Acesso em: 13 jun 2020.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento de safra brasileiro – grãos: Sexto levantamento, março 2021 – safra 2020/2021. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento. 2013. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>. Acesso em: 13 jun 2020.

CUADRADO-OSORIO, P. D. *et al.* Chlamydospores production enhancement of *Duddingtonia flagrans* in a solid-state fermentation system. **DYNA, [Medellín]**, v. 88, n. 216, p. 152–159, 2021.

DALL'AGNOL, A. *et al.* **O Complexo Agroindustrial da Soja Brasileira**. Londrina, v. 4, p. 1-11, 2007. (Circular técnica 43). Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/470318/o-complexo-agroindustrial-da-soja-brasileira>. Acesso em: 13 jun 2020.

DAVE, K. *et al.* Facets of rhizospheric microflora in biocontrol of phytopathogen *Macrophomina phaseolina* in oil crop soybean. **Archives of Microbiology**, Bhopal, v. 203, n. 2, p. 405–412, 2021.

DE CAPRILES, C. H.; MATA, S.; MIDDELVEEN, M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. **Mycopathologia**, Caracas, v. 106, n. 2, p. 73–79, 1989.

DE SILVA, N. I. *et al.* Mycosphere Essays 9: Defining biotrophs and hemibiotrophs. **Mycosphere**, Guangzhou, v. 7, n. 5, p. 545–559, 2016.

DEL FRARI, G. *et al.* *Epicoccum layuense* a potential biological control agent of esca-associated fungi in grapevine. **PLOS ONE**, [S.l.], v. 14, n. 3, p. 1–22, 2019.

DIAS, M. D. *et al.* Current status of soybean anthracnose associated with *Colletotrichum truncatum* in Brazil and Argentina. **Plants**, Switzerland, v. 8, n. 11, p. 1–19, 2019.

DIOGO, H. C.; SARPIERI, A.; PIRES, M. C. Fungi preservation in distilled water. **An Bras Dermatol**, São Paulo, v. 80, n. 6, p. 591–595, 2005.

EL-BONDKLY, E. A. M.; EL-BONDKLY, A. A. M.; EL-BONDKLY, A. A. M. Marine endophytic fungal metabolites: A whole new world of pharmaceutical therapy exploration. **Heliyon**, Cairo, v. 7, n. 3, p. 1-15, 2021.

EL-HAWARY, S. S. *et al.* Soybean-associated endophytic fungi as potential source for anti-COVID-19 metabolites supported by docking analysis. **Journal of Applied Microbiology**, Minia, p. 1-19, 2021.

EMBRAPA SOJA. Dados econômicos – Portal Embrapa. **Soja em números (safra 2018/19)**. Londrina, 2019. Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>. Acesso em: 13 jun 2020.

- FALAHZADAH, M. H.; KARIMI, J.; GAUGLER, R. Biological control chance and limitation within integrated pest management program in Afghanistan. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 30, n. 1, 2020.
- FELŠÖCIOVÁ, S. *et al.* Antifungal activity of selected volatile essential oils against *Penicillium* sp. **Open Life Sciences**, [S.l.], v. 15, n. 1, p. 511–521, 2020.
- FORT, T. *et al.* Maternal effects shape the seed mycobiome in *Quercus petraea*. **New Phytologist**, [S.l.], p. 1594–1608, 2021.
- GAREIS, M.; GOTTSCHALK, C. Stachybotrys spp. and the guttation phenomenon. **Mycotoxin Research**, Oberschleissheim, v. 30, n. 3, p. 151–159, 2014.
- HACQUARD, S. *et al.* Microbiota and host nutrition across plant and animal kingdoms. **Cell Host and Microbe**, [S.l.], v. 17, n. 5, p. 603–616, 2015.
- HALEBIAN, S. *et al.* Rapid method that aids in distinguishing gram-positive from gram-negative anaerobic bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, [S.l.], v. 13, n. 3, p. 444–448, 1981.
- HARPER, J. T.; WAANDERS, E.; KEELING, P. J. On the monophyly of chromalveolates using a six-protein phylogeny of eukaryotes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 487–496, 2005.
- HARTLEY, S. E.; GANGE, A. C. Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores: Mutualism in a multitrophic context. **Annual Review of Entomology**, Surrey, v. 54, p. 323–342, 2009.
- HUTWIMMER, S. *et al.* Formation of exudate droplets by *Metarhizium anisopliae* and the presence of destruxins. **Mycologia**, Lawrence, v. 102, n. 1, p. 1–10, 2010.
- JOHNSON, E. A. An Improved Slide Culture Technique for the Study and Identification of Pathogenic Fungi. **Journal of bacteriology**, Houston, v. 51, n. 6, p. 689–694, 1946.
- KHAN, A. L.; LEE, I. J. Endophytic *Penicillium funiculosum* LHL06 secretes gibberellin that reprograms *Glycine max* L. growth during copper stress. **BMC Plant Biology**, Nizwa, v. 13, n. 1, p. 13–86, 2013.
- KUMAR, S. *et al.* Preservation and Maintenance of Microbial Cultures. In: ARORA, D. K.; DAS, S.; SUKUMAR, M. **Analyzing microbes: Manual of molecular biology techniques**. Karnal: Springer Protocols, 2013. p. 135–152.
- LACAP, D. C.; HYDE, K. D.; LIEW, E. C. Y. An evaluation of the fungal “morphotype” concept based on ribosomal DNA sequences. **Fungal Diversity**, [S.l.], v.12, p. 53–66, 2003.
- LEITÃO, A. L.; ENGUITA, F. J. Gibberellins in *Penicillium* strains: Challenges for endophyte-plant host interactions under salinity stress. **Microbiological Research**, [S.l.], v. 183, p. 8–18, 2016.
- LIANG, L. J. *et al.* A Novel Species of *Penicillium* with inhibitory effects against *Pyricularia oryzae* and fungal pathogens inducing citrus diseases. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S.l.], v. 10, p. 1–10, 2021.

LIU, H. *et al.* Microbiome-Mediated stress resistance in plants. **Trends in Plant Science**, [S.l.], v. 25, n. 8, p. 733–743, 2020.

MACHADO, D. F. M. *et al.* *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, [S.l.], v. 35, n. 1, p. 274–288, 2012.

MAHILUM-TAPAY, L. M. The importance of microbial culture collections and gene banks in biotechnology. *In*: DOELLE, H. W.; ROKEM, S.; BEROVIC, M. **Biotechnology: Fundamentals in Biotechnology**. Singapore: UNESCO Eolss Publishers, 2009. v. 1, p. 227–239.

MANIAS, D.; VERMA, A.; SONI, D. K. Isolation and characterization of endophytes: Biochemical and molecular approach. **Microbial Endophytes: Prospects for Sustainable Agriculture**, [S.l.], p. 1–14, 2019.

MIGWI, B. *et al.* Assessment of willingness-to-pay for Aflasafe KE01, a native biological control product for aflatoxin management in Kenya. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 37, n. 11, p. 1951–1962, 2020.

MORALES MOREIRA, Z. P.; HELGASON, B. L.; GERMIDA, J. J. Environment has a stronger effect than host plant genotype in shaping spring *Brassica napus* seed microbiomes. **Phytophymes Journal**, [S.l.], p. 1–11, 2021.

MUNDSTOCK, C. M.; THOMAS, A. L. Soja: fatores que afetam o crescimento e o rendimento de grãos. **Biblioteca Setorial da Faculdade de Agronomia da UFRGS**, Porto Alegre, 2005.

NAILA, A. *et al.* A review on global metal accumulators—mechanism, enhancement, commercial application, and research trend. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 26449–26471, 2019.

NARANJO, S. E.; ELLSWORTH, P. C.; FRISVOLD, G. B. Economic value of biological control in integrated pest management of managed plant systems. **Annual Review of Entomology**, v. 60, n. 1, p. 621–645, 2015.

NUGENT, L. K. *et al.* A revised method for the observation of conidiogenous structures in fungi. **Mycologist**, [S.l.], v. 20, n. 3, p. 111–114, 2006.

QIN, G. *et al.* Soil heavy metal pollution and food safety in China: Effects, sources and removing technology. **Chemosphere**, v. 267, p. 129205, 2021.

RASHAD, Y. M.; MOUSSA, T. A. A. Biocontrol agents for fungal plant diseases management. *In*: EL-WAKEIL, N.; SALEH, M.; ABU-HASHIM, M. **Cottage industry of biocontrol agents and their applications**. Switzerland: Springer Nature, 2020. p. 365–402.

RASHMI, M.; KUSHVEER, J. S.; SARMA, V. V. A worldwide list of endophytic fungi with notes on ecology and diversity. **Mycosphere**, Puducherry, v. 10, n. 1, p. 798–1079, 2019.

RATHJEN, J. R. *et al.* Impact of seed-applied pesticides on rhizobial survival and legume nodulation. **Journal of Applied Microbiology**, Glen Osmond, v. 129, n. 2, p. 389–399, 2020.

- RAZALI, N. M. *et al.* Comparative genomics: Insights on the pathogenicity and lifestyle of *Rhizoctonia solani*. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 22, n. 4, p. 1–25, 2021.
- REZNIKOV, S. *et al.* Soybean-*Macrophomina phaseolina*-Specific Interactions and Identification of a Novel Source of Resistance. **Phytopathology**, [S.l.], v. 109, n. 1, p. 63–73, 2019.
- RIBEIRO, D. S.; PEREIRA, T. S. O Agrotóxico Nosso De Cada Dia. **VITTALLE - Revista de Ciências da Saúde**, Altamira, v. 28, n. 1, p. 14–26, 2016.
- RIDDEL, R. W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia**, Durham, v. 42, n. 2, p. 265–270, 1950.
- ROSENBERG, E.; ZILBER-ROSENBERG, I. The hologenome concept of evolution after 10 years. **Microbiome**, Tel Aviv, v. 6, n. 1, p. 6-78, 2018.
- SEGARAN, G.; SATHIAVELU, M. Fungal endophytes: A potent biocontrol agent and a bioactive metabolites reservoir. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Vellore, v. 21, p. 1-14, 2019.
- SIMON, J. C. *et al.* Host-microbiota interactions: From holobiont theory to analysis. **Microbiome**, Le Rheu, v. 7, n. 1, p. 1–5, 2019.
- SMITH, H. S. On Some Phases of Insect Control by the Biological Method. **Journal of Economic Entomology**, v. 12, n. 4, p. 288–292, 1919.
- SOARES, H. V. O Trabalho Na Cadeia Da Soja No Centro-Oeste Brasileiro: Um Debate Sobre Emprego, Renda E Condições De Trabalho Na Agricultura Capitalista Contemporânea. **Tempos Históricos**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 602–628, 2019
- SOARES, R. Os prejuízos causados pelo maior vilão da soja brasileira. [Entrevista concedida a SCOT CONSULTORIA]. **SCOT CONSULTORIA**. Londria, Dezembro, 2018. Disponível em: <https://www.scotconsultoria.com.br/noticias/entrevista/49739/os-prejuizos-causados-pelo-maior-vilao-da-soja-brasileira.htm>
- SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F. Resíduos de Agroquímicos no Ambiente. In: SPADOTTO, C. A.; RIBEIRO, W. C. **Gestão de Resíduos na Agricultura e Agroindústria**, Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, 2012. v. 1, cap. 13, p. 302–319.
- SPAGNOLETTI, F. N.; CHIOCCHIO, V. M. Tolerance of dark septate endophytic fungi (DSE) to agrochemicals *in vitro*. **Revista Argentina de Microbiologia**, Caba, v. 52, n. 1, p. 43–49, 2020.
- STONE, J. K.; POLISHOOK, J. D.; WHITE, J. F. Endophytic Fungi. In: MUELLER, G. M.; BILLS, G. F.; FOSTER, M. S. **Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods**. [S.l.]: Elsevier Inc., 2004. cap. 12, p. 241–270.
- TAGUIAM, J. D.; EVALLO, E.; BALENDRES, M. A. *Epicoccum* species: ubiquitous plant pathogens and effective biological control agents. **European Journal of Plant Pathology**, v. 159, n. 4, p. 713–725, 2021.

- TILOCCA, B.; CAO, A.; MIGHELI, Q. Scent of a Killer: Microbial Volatilome and Its Role in the Biological Control of Plant Pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020.
- TOGHUEO, R. M. K.; BOYOM, F. F. Endophytic *Penicillium* species and their agricultural, biotechnological, and pharmaceutical applications. **3 Biotech**, Yaoundé, v. 10, n. 3, p. 1–35, 2020.
- TRINDADE, M. M. S. **Mecanismo de defesa e resistência das plantas a agentes patogénicos**. 2021. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agronômica) - Universidade de Évora, Évora, 2021.
- TRIVEDI, P. *et al.* Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. **Nature Reviews Microbiology**, Fort Collins, v. 18, n. 11, p. 607–621, 2020.
- U'REN, J. M.; ZIMMERMAN, N. B. Oaks provide new perspective on seed microbiome assembly. **New Phytologist**, [S.l.], v. 230, n. 4, p. 1293–1295, 2021.
- VERMA, B. *et al.* Characterization of *Rhizoctonia* spp. isolates, disease occurrence and management in various crops. In: SNEH, B. *et al.* **Rhizoctonia species: Taxonomy, Molecular biology, ecology, pathology and disease control**. [S.l.], 1995. p. 247–391.
- VERMA, S. K. *et al.* Seed-vectored endophytic bacteria modulate development of rice seedlings. **Journal of Applied Microbiology**, Varanasi, v. 122, n. 6, p. 1680–1691, 2017.
- WANG, Y.; TYLER, B. M.; WANG, Y. Defense and counterdefense during plant-pathogenic oomycete infection. **Annual Review of Microbiology**, [S.l.], v. 73, p. 667–696, 2019.
- WATERS, M.; TADI, P. Streptomycin. StatPearls [Internet], [S.l.], p. 3–5, 2021.
- WEBSTER, J.; WEBER, R. W. S. Introduction. In: WEBSTER, J.; WEBER, R. W. S. **Introduction to fungi**. 3. ed. New York: Cambridge University Press, 2007. cap. 1, p. 1–32.
- WHITE, J. F. *et al.* Seed endophytes microbes: Their roles in improving seedling fitness and competitor plant suppression. In: VERMA, S. K.; WHITE, J. F. **Seed Endophytes: Biology and Biotechnology**, [S.l.]: Springer Nature, 2019. cap. 1, p. 3–20.
- YANG, H. *et al.* Endophytic fungal communities associated with field-grown soybean roots and seeds in the Huang-Huai region of China. **PeerJ**, [S.l.] v. 2018, n. 4, p. 1–14, 2018.