

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Bioprospecção de agentes microbianos para o controle da ferrugem  
asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*)**

**Daniel Eiji Hinoue de Souza**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Ciências Área de concentração:  
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba  
2025**

**Daniel Eiji Hinoue de Souza**  
**Bacharel em Ciências Biológicas**

**Bioprospecção de agentes microbianos para o controle da ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*)**

Orientador:  
Prof. Dr. **ITAMAR SOARES DE MELO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de:  
Mestre em Ciências. Área de concentração:  
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba**  
**2025**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Souza, Daniel Eiji Hinoue

Bioprospecção de agentes microbianos para o controle da ferrugem asiática da soja  
(*Phakopsora pachyrhizi*) / Daniel Eiji Hinoue de Souza. - - Piracicaba, 2025.

70 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de  
Queiroz”.

1. Controle biológico 2. Metabólitos secundários 3. Actinobactérias I. Título

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Itamar Soares de Melo e ao Dr. Leonardo José da Silva, pela orientação, paciência e confiança ao longo desses dois anos. À minha família, pelo amor, apoio e compreensão constantes. Aos meus amigos, pela amizade e motivação. À equipe do Laboratório de Microbiologia Ambiental (LMA) e da Embrapa, pela colaboração e pelo acolhimento desde a época em que eu era estagiário. Agradeço também as pessoas que me auxiliaram ao longo do caminho, como a equipe da Embrapa Soja que por meio da Dra. Kátia Nechet disponibilizaram material para a realização dos experimentos e a equipe dos professores Luiz Alberto Moraes Beto e Eduardo Crevelin da USP de Ribeirão Preto pela ajuda com as análises químicas de metabólitos. Por fim, agradeço também à agência de fomento CNPq pelo apoio financeiro que foi fundamental para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>7</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>9</b>
<b>1) INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>13</b>
2.1) O cultivo da soja no Brasil .....	<b>13</b>
2.2) Bioinsumos na sojicultura .....	<b>13</b>
2.3) Questões fitossanitárias da ferrugem .....	<b>15</b>
2.4) Ferrugens da soja .....	<b>15</b>
2.5) Controle biológico .....	<b>16</b>
2.6) Agentes de controle biológico para doenças foliares.....	<b>18</b>
<b>3) OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
<b>4) MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
4.1.1) Potencial de bactérias e fungos no controle de FAS.....	<b>21</b>
4.1.2) Produção de urediniósporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> em condições controladas de casa de vegetação.....	<b>21</b>
4.1.3) Avaliação da taxa de germinação dos urediniósporos da ferrugem asiática <i>in vitro</i> ....	<b>22</b>
4.2) Avaliação do potencial de linhagens microbianas capazes de inibir a germinação dos urediniósporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> .....	<b>23</b>
4.3) Identificação taxonômica dos isolados microbianos selecionados .....	<b>23</b>
4.4.1) Avaliação do crescimento de bactérias em meio oligotrófico .....	<b>24</b>
4.4.2) Avaliação da formação de biofilme por bactérias selecionadas .....	<b>25</b>
4.5) Avaliação do potencial de fungos e bactérias no controle da ferrugem asiática em folhas destacadas e em condições controladas em casa de vegetação .....	<b>25</b>
4.6.1) Tolerância a fungicidas .....	<b>27</b>
4.6.2) Extração de metabólitos secundários produzidos por <i>Streptomyces araujoniae</i> CMAA 894.....	<b>28</b>
4.6.3) Avaliação do potencial bioativo da linhagem microbiana selecionada no controle da ferrugem asiática da soja (ensaio em condições controladas de casa de vegetação) .....	<b>28</b>
4.6.4) Avaliação da severidade da doença em mudas em casa de vegetação.....	<b>29</b>
4.7) Análise estatística .....	<b>31</b>

4.8.1) Perfil químico dos metabólitos secundários produzidos por <i>Streptomyces araujoniae</i> CMAA 894 .....	31
4.8.2) Produção de AIA e promoção de crescimento de plantas .....	33
<b>5) RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>
5.1.1) Organização das linhagens fúngicas e bacterianas .....	35
5.1.2) Produção de inóculo de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> em condições de casa de vegetação ..	35
5.2) Inibição da germinação de uredíniosporos da ferrugem asiática por bactérias e fungos ..	36
5.3) Identificação taxonômica dos isolados microbianos selecionados .....	38
5.4.1) Avaliação do crescimento de bactérias em meio oligotrófico .....	40
5.4.2) Avaliação de formação de biofilme por bactérias selecionadas .....	41
5.5) Avaliação do potencial de microrganismos no controle da ferrugem asiática .....	42
5.6) Tolerância de fungos e bactérias antagonistas a <i>Phakopsora pachyrhizi</i> ao fungicida Amistar Top.....	45
5.7.1) Avaliação do potencial de controle da ferrugem asiática por suspensão de micélio de <i>S. araujoniae</i> , CMAA 894, e seus metabólitos secundários em condições de casa de vegetação (experimento 1).....	47
5.7.2) Avaliação do potencial do controle de ferrugem asiática por suspensão de micélio de <i>S. araujoniae</i> , CMAA 894, em condições de casa de vegetação (experimento 2).....	49
5.8.1) Perfil químico dos metabólitos secundários produzidos por <i>Streptomyces araujoniae</i> (CMAA 894) .....	52
5.8.2) Produção de Ácido Indol -Acético por <i>Streptomyces araujoniae</i> .....	55
<b>6) DISCUSSÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>63</b>

## RESUMO

### **Bioprospecção de agentes microbianos para o controle da ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*)**

A produção sustentável de alimentos e energia limpa e acessível são metas a serem atingidas até 2030 como definido pelos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da ONU (Organização das Nações Unidas). A soja é uma importante cultura agrícola cujos grãos podem ser utilizados tanto para a alimentação humana e animal, quanto para a produção de biocombustíveis a partir do seu processamento físico-químico. O principal fitopatógeno da sojicultura atualmente é o fungo *Phakopsora pachyrhizi*, agente causador da ferrugem asiática da soja que em ambientes de alta suscetibilidade pode provocar perdas de até 70% da produção. O controle da ferrugem asiática vem sendo um desafio para as regiões produtoras que frequentemente utilizam fungicidas sintéticos e cultivares resistentes com relativo sucesso, contudo com o surgimento de novas raças do fitopatógeno resistentes aos métodos tradicionais de controle, novas formas de manejo como a utilização de bioinoculantes que promovam o controle biológico da doença não é só desejável, como necessária tendo em vista o aspecto fitossanitário e ambiental da cadeia produtiva da soja. Neste sentido, sucessivas etapas de “screening” foram realizadas visando à seleção de microrganismos isolados da filosfera da soja e da rizosfera de plantas da Caatinga com atividade antagonista que promovesse o controle da ferrugem asiática da soja, avaliada através da inibição da germinação de uredinósporos e diminuição da severidade de plantas inoculadas com o fitopatógeno em condições em casa de vegetação. Posteriormente, a linhagem *Streptomyces araujoniae* CMAA 894 apresentou o melhor desempenho como observado pela diminuição de até 70% da área lesionada e o perfil de seus metabólitos secundários foram avaliados, revelando a presença de vários membros de antibióticos da família das bafilomicinas. Além disso, *S. araujoniae* CMAA 894 e outros microrganismos antagonistas selecionados tiveram outras características promotoras de crescimento de plantas. Os resultados deste trabalho corroboram para que o já estudado isolado CMAA 894 seja um excelente agente de controle visando à ferrugem asiática. Contudo, novos estudos, especialmente aqueles referentes à formulação de inóculo com o microrganismo, devem ser realizados para a formulação de um inoculante inédito.

Palavras-chave: Controle biológico, Metabólitos secundários, Actinobactérias

## ABSTRACT

### **Bioprospecting of microbial agents for the control of asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*)**

Sustainable food production and clean, affordable energy are goals to be achieved by 2030, as proposed by the UN (United Nations) Sustainable Development Goals. Soybean is an important agricultural crop whose grains can be used primarily for both human and animal consumption, and secondarily for the production of biofuels through physio-chemical processing. Today, the main phytopathogen in soybean production is the fungus *Phakopsora pachyrhizi*, the causative agent of asian soybean rust, which in highly susceptible environments can cause losses of up to 70% of production. Managing soybean rust has been a challenge for cultivating areas that often use synthetic fungicides and resistant cultivars with relative success. However, with the emergence of new races of the phytopathogen that are resistant to traditional control methods, new forms of management, such as the use of bioinoculants that promote biological control of the disease are not only desirable, as well necessary, given the phytosanitary and environmental aspects of the soybean production chain. Therefore, successive screening steps were performed in order to select microorganisms isolated from the soybean phyllosphere and the rhizosphere of Caatinga biome plants with antagonistic activity that would promote biological control of asian soybean rust, evaluated through inhibition of urediniospore germination and reduction in the severity of plants inoculated with the phytopathogen under greenhouse conditions. Afterwards, the strain *Streptomyces araujoniae* CMAA 894 demonstrated the best performance as evidenced by a reduction of up to 70% in the lesioned area. The profile of the selected actinobacteria (CMAA 894) secondary metabolites was also evaluated, revealing the presence of several members of the bafilomycin family of antibiotics. In addition, *S. araujoniae* CMAA 894 and other selected antagonistic microorganisms had other plant growth-promoting characteristics evaluated. The results of this study corroborate that the previously studied isolate CMAA 894 is an excellent biological control agent targeting soybean rust. However, new studies, especially those related to the formulation of inoculum with the microorganism, must be carried out for the formulation of a new inoculant.

**Keywords:** Biological control, Secondary metabolites, Actinobacteria

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Urediniosporos não germinados de <i>P. pachyrhizi</i> .....	22
<b>Figura 2:</b> Folíolos destacados dispostos em placa de vidro .....	26
<b>Figura 3:</b> Muda de soja cultivada unifoliada em tubete após excisão .....	27
<b>Figura 4:</b> Disposição de vasos com mudas de soja em casa de vegetação.....	29
<b>Figura 5:</b> Seção de folha acometida por ferrugem asiática da soja .....	30
<b>Figura 6:</b> Lesão de ferrugem asiática da soja com urediniosporos visíveis .....	30
<b>Figura 7:</b> Área foliar acometida pela ferrugem asiática da soja analisada com o plugin RUST .....	31
<b>Figura 8:</b> Extração dos metabólitos secundários da linhagem <i>Streptomyces araujoniae</i> CMAA894 .....	32
<b>Figura 9:</b> (A-B) Plantas acometidas pela ferrugem asiática da soja com sintomas aparentes	35
<b>Figura 10:</b> Comprimento dos fragmentos dos marcadores taxonômicos analisados em gel de eletroforese .....	38
<b>Figura 11:</b> Crescimento de bactérias em meio oligotrófico de bactérias selecionadas.....	41
<b>Figura 12:</b> Formação de biofilme por bactérias antagônicas à ferrugem asiática <i>in vitro</i> . ....	42
<b>Figura 13:</b> Placa de petri cultivada com <i>Streptomyces araujoniae</i> (CMAA 894) e folha tratada e não tratada .....	45
<b>Figura 14:</b> Aspecto de crescimento de bactérias selecionadas em placa contendo diferentes concentrações do fungicida AMISTAR TOP.....	46
<b>Figura 15:</b> Aspecto de crescimento de fungos e actinobacteria selecionados em placa contendo diferentes concentrações do fungicida AMISTAR TOP.....	46
<b>Figura 16:</b> Gráfico da avaliação do número de lesões/ folha em experimento em casa de vegetação 1 .....	48
<b>Figura 17:</b> Gráfico da avaliação do número de urédias em lesões/ folha em experimento em casa de vegetação 1.....	48
<b>Figura 18:</b> Estimativa da área do trifólio acometida pela ferrugem asiática utilizando o plugin RUST em experimento em casa de vegetação 1.....	49
<b>Figura 19:</b> Gráfico da avaliação do número de lesões/ folha em experimento em casa de vegetação 2 .....	50
<b>Figura 20:</b> Gráfico da avaliação do número de urédias em lesões/ folha em experimento em casa de vegetação 2.....	50

<b>Figura 21:</b> Estimativa da área do trifólio acometida pela ferrugem asiática utilizando o plugin RUST em experimento em casa de vegetação 2.....	<b>51</b>
<b>Figura 22:</b> Comparação entre mudas tratadas com inóculo de <i>Streptomyces araujoniae</i> (CMAA 894) e não tratadas .....	<b>52</b>
<b>Figura 23:</b> Análise por UPLC-MS do extrato bruto de <i>S. araujoniae</i> (CMAA 894) .....	<b>55</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Taxa de inibição da germinação de urediniósporos de <i>P. pachyrhizi</i> por microrganismos antagonistas.....	<b>37</b>
<b>Tabela 2:</b> Identificação taxonômica de linhagens de bactérias antagonistas através do sequenciamento do marcador molecular da região do RNA ribossomal 16S. ....	<b>39</b>
<b>Tabela 3:</b> Identificação taxonômica de linhagens fúngicas antagonistas através do sequenciamento do marcador molecular da região ITS (Internal Transcribed Spacer). ....	<b>40</b>
<b>Tabela 4:</b> Reação de folhas e plantas de soja à inoculação com <i>P. pachyrhizi</i> .....	<b>44</b>
<b>Tabela 5:</b> Média dos parâmetros analisados para se inferir a severidade da ferrugem asiática no experimento em casa de vegetação 1 .....	<b>47</b>
<b>Tabela 6:</b> Média dos parâmetros analisados para se inferir a severidade da ferrugem asiática no experimento em casa de vegetação 2 .....	<b>51</b>
<b>Tabela 7:</b> Taxa de inibição de frações dos metabólitos de <i>S. araujoniae</i> CMAA 894.....	<b>52</b>



## 1) INTRODUÇÃO

A produção de alimentos é um desafio da atualidade. Segundo a estimativa recém apresentada pela FAO, a população mundial deverá atingir 10 bilhões de habitantes dentro de 30 anos. Concomitantemente, a produção de alimentos precisará aumentar cerca de 60% de forma a suprir a demanda alimentar. Nesse sentido, a produtividade brasileira é fundamental já que o país produz cerca de 10% de todo o alimento consumido no mundo. Diante disso, pesquisas voltadas ao aprimoramento de técnicas agrícolas e estratégias de manejo se tornam imprescindíveis, principalmente, quando se trata do controle de pragas e doenças agrícolas.

A sojicultura é uma das principais atividades agrícolas realizadas no Brasil, ocupando áreas superiores a 45 milhões de hectares na safra de 2023/24. Impactando diretamente a produtividade da soja no Brasil, o fitopatógeno *Phakopsora pachyrhizi*, agente causal da ferrugem asiática da soja, pode acarretar perdas superiores a 70% de produtividade, por meio da desfolha precoce e impossibilidade de formação de grãos. A variabilidade genética do patógeno tem dificultado o desenvolvimento de cultivares resistentes, tornando o controle químico a única prática utilizada até o presente momento.

Nesse sentido, insumos biológicos se colocam como uma possível alternativa para o controle da ferrugem da soja, considerando não só o seu menor impacto ambiental quando comparado aos fungicidas tradicionais, como também o evidente sucesso dos agentes já utilizados na cultura da soja como biofertilizantes e nodulantes fixadores de nitrogênio. Portanto, este projeto tem como intuito a prospecção de isolados microbianos, muitos dos quais isolados da filofera de soja capazes de controlar a ferrugem asiática.



## **2) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1) O cultivo da soja no Brasil**

O cultivo de soja (*Glycine max*) é uma das principais atividades econômicas agrícolas realizadas no Brasil. Assim sendo, a magnitude hoje vislumbrada da sojicultura se deve em parte à consolidação de lavouras e indústrias de processamento da leguminosa em regiões do cerrado nos anos 90 (OLIVEIRA; SCHNEIDER, 2016), fato este que levou o grão a ser cultivado no país em áreas superiores a 45 milhões de hectares na safra de 2023/24 como aponta relatório do USDA (2024). O grão de soja e notavelmente seus derivados como o óleo e o farelo se tornaram indubitavelmente essenciais para a manutenção de uma balança comercial favorável ao país, especialmente no contexto da formação do complexo “Brasil-China soja-carne”, por conseguinte consolidando as regiões Sul e Centro-oeste como as principais produtoras e mais recentemente levando uma expansão da cultura da soja para a micro região MATOPIBA (ESCHER; WILKINSON, 2019). Logo, como decorrência de fatores como a ampliação das áreas cultivadas juntamente com a implementação de técnicas e insumos levaram a um aumento da produção nacional do grão nos últimos anos, levando-o a estaca de 40% do total produzido mundialmente na safra de 2023/2024 como indica relatório do USDA (2024). Portanto, o desenvolvimento de tecnologias que promovam a produtividade da sojicultura em área já cultivadas é de vital importância para que a produção e comercialização do grão continue pujante e que cada vez mais pautas ambientais conservacionistas voltadas ao uso do solo sejam atendidas (KUMAWAT; RAZDAN; SAHARAN, 2022), especialmente ao que tange a utilização de bioinsumos.

### **2.2) Bioinsumos na sojicultura**

O mercado de bioinsumos agrícolas vem neste novo milênio ganhando espaço no Brasil, atingindo a marca de pelo menos 1 bilhão de reais faturados somente no ano de 2020-2021 como apontado em reportagem da área e aumentando seu mercado em 37% (GERUM *et al*, 2024)(JACINTHO, 2023). Além disso, outro marco que demonstra a consolidação do uso e produção de bioprodutos como política nacional foram tanto a criação de bases de dados voltada à consulta de produtos como o aplicativo “Bioinsumos” da Embrapa que cataloga cerca de 1081 bioinsumos licenciados voltados para o crescimento de plantas e controle fitossanitário, como também a criação do Programa Nacional de Bioinsumos no ano de 2020 instituído pelo Decreto Federal nº 10.375, de 26 de maio de 2020 que passou a

promover o desenvolvimento, produção industrial e formação profissional de toda cadeia produtiva voltada para os bioinsumos (BRASIL, 2020)(VIDAL *et al*, 2021).

Dessa forma, dada a consolidação da agroindústria dos produtos biológicos juntamente com a dinamicidade e inovação desta área, a necessidade sobre a delimitação do significado de “bioinsumos” surgiu. Assim, autores como Vidal, Saldanha e Veríssimo (2020) ao debaterem acerca do tema, colocam o termo “bioinsumo” como abrangente e ainda em construção, posição também adotada pelos legisladores do decreto instituidor do “Programa Nacional de Bioinsumos” como pode ser observado no Decreto Federal nº 10.375, de 26 de maio de 2020:

“Para os fins do disposto neste Decreto, considera-se bioinsumo o produto, o processo ou a tecnologia de origem vegetal, animal ou microbiana, destinado ao uso na produção, no armazenamento e no beneficiamento de produtos agropecuários, nos sistemas de produção aquáticos ou de florestas plantadas, que interfiram positivamente no crescimento, no desenvolvimento e no mecanismo de resposta de animais, de plantas, de microrganismos e de substâncias derivadas e que interajam com os produtos e os processos físico-químicos e biológicos” (BRASIL, 2020, art. 2º).

Os bioinsumos à base de microrganismos são produtos que possuem organismos como o seu princípio ativo, podendo ser eles vírus, bactérias ou fungos (MEYER; MAZARO; SILVA, 2022). Diversos produtos já são amplamente difundidos, especialmente na cultura de soja, onde microrganismos do gênero *Bradyrhizobium* são utilizados para a promoção da fixação biológica do nitrogênio, responsável pelo aporte nutricional de 94% do nitrogênio necessário para o desenvolvimento da soja, resultando em uma economia de aproximadamente 10 bilhões de dólares que de outra forma seriam destinados à importação de fertilizantes nitrogenados (MARTIN *et al*, 2022) (ARAUJO, 2022). Ademais, referente a utilização de bioinsumos para o controle de pragas e doenças de plantas, mecanismos antagônicos de microrganismos como *Bacillus amyloliquefaciens* já são bem documentados e utilizados no controle biológico para o manejo de fitonematoides em produtos formulados já comercializados (NGALIMAT *et al*, 2021). Portanto, fica claro que bioinsumos já vêm sendo amplamente empregados nos campos agrícolas, tanto para a promoção de crescimento de plantas através de um melhor aporte nutricional, como também para a manutenção da fitossanidade na lavoura.

Nesse contexto, a fim de se obter a formulação de novos produtos biológicos, diversas etapas como o isolamento do microrganismo, identificação quimiotaxonômica, screening, concentração, pureza, virulência atestada, tempo de shelf life são importantes etapas e parâmetros a serem avaliados a fim de que se tenha um produto final eficiente e

confiável como estipulado pelo Programa Nacional de Bioinsumos (VIDAL *et al*, 2021).

### 2.3) Questões fitossanitárias da ferrugem

A ferrugem é uma doença foliar que acomete plantas vasculares ocasionada por diversos microorganismos biotróficos da ordem Pucciniales do grupo monofilético dos basidiomicetos (AIME *et al*, 2006). O ciclo de vida desse grupo de fungos biotróficos é complexo, apresentando não só diferentes formas do mesmo microrganismo em diferentes estágios fenológicos vegetais, como também havendo a formação de corpos de frutificação (AIME *et al*, 2006) cujos esporos obrigatoriamente necessitarão de um hospedeiro para a sua perpetuação (HELFER, 2014). Diversas espécies vegetais de interesse econômico como a cana-de-açúcar com *Puccinia melanocephala* e *Puccinia kuehnii* (SIMON *et al*, 2016), milho com *Puccinia polysora* (DA COSTA; DA SILVA; COTA, 2013) e a soja com *Phakopsora pachyrhizi* (YORINORI; PAIVA, 2002) são suscetíveis aos seus respectivos agentes causadores da ferrugem, podendo levar ao surgimento de epidemias que caso não controladas culminam na queda da safra graças à diminuição da área fotossintética provocada pela desfolha precoce.

Portanto, ao se tratar da sojicultura, tendo em vista os fatores intrínsecos de *P. pachyrhizi* tais como a diversidade de formas em seu ciclo de vida e a fácil disseminação dos seus uredíniosporos pelo vento (GOELLNER *et al*, 2010) somada às condições propícias encontradas em campo como longas durações do período molhamento foliar (IGARASHI *et al*, 2014) e a prevalência de uma única espécie vegetal suscetível em sistemas de monocultura, colocam a ferrugem como um patógeno com um alto potencial para o desencadeamento de epidemias em lavouras em território nacional.

### 2.4) Ferrugens da soja

A ferrugem da soja possui dois agentes causais, são eles *Phakopsora meibomiae*, nativo da América Latina e *Phakopsora pachyrhizi*, de origem asiática (SOUSA; ALVES; CASTRO, 2006). Assim sendo, ao infectar seus hospedeiros suscetíveis à doença, as espécies de *Phakopsora* provocam lesões características do tipo TAN (castanho claro) ou RB (pardo avermelhado) e formação de urédias na parte abaxial da folha, levando à uma diminuição da capacidade fotossintética do vegetal e provocando uma diminuição no tamanho dos grãos. Ademais, como visto em Bonde *et al* (2006), *P. pachyrhizi* se mostrou mais virulento em cultivares de soja altamente suscetíveis à ferrugem como Williams e Wayne, apresentando

não só uma prevalência de lesões do tipo TAN em seus hospedeiros como também maiores e mais numerosas urédias em cada lesão. Dessa forma, *P. pachyrhizi*, por apresentar sintomas com maior severidade (BONDE *et al*, 2006) (GOELLNER *et al*, 2010) é tida como o principal patógeno que afeta a cultura da soja no país desde que foi introduzida nas Américas e, portanto, a doença por ela provocada, conhecida como a ferrugem asiática da soja (FAS), possui alta importância epidemiológica. Assim sendo, diferentemente da ferrugem autóctone, *P. meibomiae*, a chegada de *P. pachyrhizi* ao Brasil em 2002 (FREIRE *et al*, 2002) resultou em perdas da safra variando entre 30-70% nas regiões mais afetadas (YORINORI; PAIVA, 2002), conseqüentemente impulsionando a adoção do manejo químico nas áreas de produção e a identificação de *loci* genético *Rpp*, em variedades de soja resistentes a doença, por programas de melhoramento (HARTMAN; MILES; FREDERICK, 2005).

O alastramento acelerado da FAS nas principais regiões produtoras logo na primeira década do milênio (YORINORI; NUNES JÚNIOR; LAZZAROTTO, 2004) levou à introdução de diversas formas de manejo ainda utilizadas para a mitigação de seus efeitos nas plantações, dentre as quais estão o controle químico (SCHERM *et al*, 2009) e a identificação de genes como os *loci Rpp* em variedades de soja resistentes a doença por programas de melhoramento (HARTMAN; MILES; FREDERICK, 2005). Contudo, com a disseminação e estabelecimento da ferrugem asiática, observou-se a emergência de raças diferentes de *P. pachyrhizi* capazes de infectar variedades de soja carreadoras de genes de resistência (genes R) *Rpp1* e *Rpp2* (ROSA; SPEHAR, 2015) e que também apresentavam resistência ou menor sensibilidade aos métodos tradicionais já bem estabelecidos de controle baseadas na aplicação de fungicidas comerciais (FIALLOS; FORCELINI, 2013) (LANGENBACH *et al*, 2016).

## 2.5) Controle biológico

Frente a essa situação, a busca por modelos de manejo eficientes de controle da FAS tornou-se uma prioridade. O controle biológico é uma alternativa que pode ser incorporada ao manejo integrado de pragas. Nesse sentido, há uma ampla gama de definições para o termo, autores como Fontes e Valadares-Inglis (2020) assumem uma abordagem a partir de um escopo mais abrangente, como:

“[...] o controle biológico será abordado no contexto de redução de populações de organismos indesejáveis que ocorrem nos agroecossistemas nos quais inimigos naturais, como predadores, parasitoides, parasitas, herbívoros, competidores e patógenos, mantenham sob controle qualquer população com potencial nocivo à atividade humana, como as pragas da agricultura. Esse grupo de organismos nocivos

inclui artrópodes (insetos e ácaros), nematoides e microrganismos patogênicos às plantas cultivadas e plantas daninhas.” (FONTES; VALADARES-INGLIS, 2020, p.22)

Contudo, autores como Jamiołkowska (2020) e Amichot *et al* (2024) também ressaltam a atividade de compostos de origem biológica na promoção do controle de doenças de plantas de forma direta ou indireta como os elicitores e semioquímicos. Portanto, da mesma forma que ocorre com a delimitação do termo “bioinsumos”, a definição precisa e universal do que seria o controle biológico é um termo ainda em construção, tendo em vista os avanços tecnológicos na área que levam à transformações e discussões acerca das fronteiras conceituais que delimitariam o que seria o controle biológico.

Dessa forma, sob a ótica defendida por Fontes e Valadares-Inglis (2020), o controle biológico inoculativo é uma estratégia baseada na aplicação de inoculantes que promovem um aumento populacional e permanência de microrganismos antagonistas ao patógenos de plantas no ambiente agrícola através de mecanismos como a competição e antibiose. Na cultura da soja, fungos e bactérias como *Bacillus spp* (DORIGHELLO *et al*, 2015), *Simplicillium lanosoniveum* (GAUTHIER *et al*, 2014) e *Trichoderma spp* (EL-HASAN *et al*, 2022) já demonstraram potencial no controle da principal doença da cultura, a ferrugem asiática, através de mecanismos como antibiose e micoparasitismo. Por outro lado, a utilização de elicitores biológicos que atuam aumentando a resistência da planta também vem demonstrando resultados promissores no controle da ferrugem asiática como apontado no trabalho De Paula *et al* (2021), onde são elencados insumos que induzem a resistência sistêmica de plantas, dentre os quais produtos baseados em elicitores biológicos, como os formulados a partir de parede celular de leveduras, já vem sendo cadastrados no MAPA e comercializados no Brasil. Logo, a utilização de microrganismos benéficos e elicitores vem demonstrando uma possível solução para o manejo de doenças de plantas, especialmente a FAS.

Nesse sentido, o desenvolvimento de inoculantes a base de microrganismos representa uma ferramenta importante no manejo integrado de fitopatógenos. O aprimoramento dessa tecnologia vai ao encontro das necessidades atuais de uma agricultura sustentável, uma vez que quando comparado com os tradicionais fertilizantes e fungicidas quimiossintéticos, os inoculantes promovem a saúde do solo aumentando ou restaurando a sua atividade enzimática e, por conseguinte, tornando-o mais fértil (KHAN *et al*, 2023), além de serem opções mais acessíveis ao países em desenvolvimento, como o caso do Brasil, onde a utilização de

inoculantes gera uma economia de bilhões de dólares anualmente (THIEBAUT *et al*, 2023). Ademais, alguns agentes de controle já apresentaram resultados promissores e são regularmente utilizados na diminuição da severidade e progressão de outras doenças que afetam culturas agrícolas como *Bacillus spp*, *Pseudomonas spp* e *Trichoderma spp* e atualmente são estudadas a possibilidade de aplicá-las na forma de consórcio microbianos, potencializando a sua ação protetora de plantas (POVEDA; EUGUI, 2022). Portanto, a utilização de bactérias e fungos isolados com ação antagonista de *P. pachyrhizi* é uma área ainda a ser melhor investigada, especialmente com microrganismos cuja prospecção de metabólitos secundários ativos contra o agente etiológico da FAS ainda não foram amplamente explorados.

## **2.6) Agentes de controle biológico para doenças foliares**

A população residente de microrganismos da filosfera, isto é a porção aérea de um vegetal abrangendo seu caule, flores e folhas, desempenha uma função importante para a manutenção da fitossanidade de uma planta (NEWTON; GRAVOUI; FOUNTAINE, 2010). No ambiente filosférico, bactérias e fungos habitantes do espaço endofítico e superficial, especialmente em folhas, já possuem uma gama de características descritas que atuam como promotores de crescimento de plantas, tal como a produção de biofilmes (MORRIS; MONIER; JACQUES, 1998), liberação de fitohormônios do grupo da citocinina e auxina (LINDOW; BRANDL, 2003), fixação de nitrogênio e, notavelmente, a supressão de crescimento de microrganismos fitopatogênicos (LIU; BRETTELL; SINGH, 2020). Contudo, embora os serviços ecossistêmicos dos microrganismos da filosfera sejam essenciais para a fitossanidade, sua microbiota ainda não é tão amplamente estudada como a da rizosfera como indica o comparativo entre o número de publicações dentre áreas (KOSKELLA, 2020), demonstrando, portanto, ser uma área com potencial ainda a ser explorado. Assim sendo, o presente estudo tem como proposta a bioprospecção de microrganismos, sobretudo filosféricos, inéditos com potencial para o controle da ferrugem asiática a partir de sua aplicação preventiva em mudas de soja.

### 3) OBJETIVOS

O objetivo principal do presente trabalho foi o de realizar uma prospecção de bactérias e fungos, muitos deles isoladas da filosfera de soja, depositados na Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental - Embrapa Meio Ambiente (CMAA) visando ao controle de *Phakopsora pachyrhizi*. Linhagens efetivas, selecionadas, quanto ao controle do patógeno foram estudadas quanto aos seus respectivos mecanismos de ação.

Para o atingimento desse objetivo, algumas atividades foram conduzidas, quais sejam:

**I)** Avaliação do potencial de bactérias e fungos em inibir a germinação dos urediniosporos de FAS e de inibir, ou reduzir os sintomas da doença, após inoculação em folhas de soja destacadas e em condições de casa de vegetação;

**II)** Avaliação do perfil químico dos metabólitos secundários produzidos pelas linhagens antagonistas à FSA e caracterização dos agentes bioativos;

**III)** Avaliação do potencial de linhagens microbianas selecionadas na produção do fitohormônio ácido indolacético



## 4) MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1.1) Potencial de bactérias e fungos no controle de FAS

Isolados bacterianos depositados na Coleção de Culturas de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental (CCMA) da Embrapa Meio Ambiente na cidade de Jaguariúna - São Paulo coletados entre os anos de 2002 e 2014, conservados em tubos criogênicos com solução glicerol 25% em ultrafreezer a -80 °C e coletados em diferentes regiões do estado de São Paulo e do bioma da Caatinga no semi-árido nordestino foram reativados em placas de Petri contendo meio TSA (Ágar Triptona-Soja). Os isolados fúngicos, também conservados na CCMA seguindo o método Castellani, foram reativados depositando seus discos micelianos em meio BDA (Batata- Dextrose Ágar) para a averiguação da pureza de suas colônias. Todas as placas contendo os microrganismos foram mantidas em BOD a 26 °C para a sua utilização nos trabalhos posteriores. Um total de 37 bactérias e 23 fungos foram avaliados quanto a seu potencial de inibir a germinação de urediniósporos.

### 4.1.2) Produção de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi* em condições controladas de casa de vegetação

A ferrugem asiática da soja tal como diversas outras ferrugens apresenta um crescimento limitado em meios de cultura, sendo, portanto, um dos microrganismos ainda não cultiváveis (TWIZEYIMANA; HARTMAN, 2010). Dessa forma, com o intuito de se superar a limitação de sua manipulação *in vitro*, foi necessária a manutenção do fitopatógeno em plantas suscetíveis a fim de que se desse continuidade ao seu ciclo de vida, obrigatoriamente biotrófico (GOELLNER *et al*, 2010) e, a partir de suas estruturas esporulantes, as urédias, se pudesse obter urediniósporos utilizados no presente estudo.

Mudas de soja da variedade NEO 610 IPRO foram utilizadas por apresentar rápido desenvolvimento, alto potencial de ramificação e suscetibilidade ao patógeno *Phakopsora pachyrhizi*. As mudas foram preparadas em vasos de 3 litros, em solo argiloso, suplementado com 20% de substrato vegetal e alto potencial de drenagem. Para que ocorresse a transmissão da ferrugem asiática e para que houvesse a manutenção do patógeno *in vivo*, plantas saudáveis no estágio vegetativo (V3-V4) foram alocadas no mesmo ambiente de plantas já infectadas pela FAS, inóculo concedido pela Embrapa Soja Londrina- Paraná, e mantidas condições de alta umidade e temperatura entre 20-25 °C, a fim de que ocorresse uma propagação facilitada do fungo e o ciclo contínuo de infecção (YORINORI; NUNES JÚNIOR; LAZZAROTTO,

2004). Além disso, folhas das plantas com lesões do padrão TAN foram destacadas periodicamente para a averiguação da existência de corpos de frutificação na porção abaxial, evidenciando que a linhagem de *P. pachyrhizi* ainda apresentava a virulência desejada (YORINORI; PAIVA, 2002).

#### 4.1.3) Avaliação da taxa de germinação dos urediniosporos da ferrugem asiática *in vitro*

Os urediniosporos (**figura 1**) foram coletados agitando-se levemente folhas com urédias jovens visíveis sobre placas de vidro limpas. Os esporos foram transferidos para tubos tipo Eppendorf e a concentração de sua suspensão foi ajustada para  $1 \times 10^5$  esporos/ mL adicionando-se uma solução de água destilada esterilizada e Tween 80 a 0,01% (v/v), concentração verificada através da contagem dessas estruturas em câmara de Neubauer.



**Figura 1:** Urediniosporos não germinados de *P. pachyrhizi*, observados em microscópio ótico, 40X.

A taxa de germinação média dos urediniosporos foi determinada através da contagem de estruturas germinadas após 6 horas de incubação em câmara úmida. Assim, 10  $\mu$ L da suspensão foram depositadas na concavidade de lâminas de microscopia escavadas e estas foram alocadas no interior de um pote hermético envolto em papel alumínio contendo espumas encharcadas de água destilada a fim de que se criasse uma câmara úmida e escura, cujo ambiente fosse propício para a germinação dos esporos. Após o período de incubação de 6 horas a 22 °C, 10  $\mu$ L do corante azul de algodão + lactofenol foram adicionados em cada

concauidade a fim de se paralisar a atividade biológica e permitir a contagem em microscópio ótico (100 esporos contados, análises em triplicatas, em aumento de 40x), urediniósporos foram considerados germinados caso apresentassem um tubo germinativo superior a 2 vezes o seu tamanho como visto em Blum *et al* (2015).

#### **4.2) Avaliação do potencial de linhagens microbianas capazes de inibir a germinação dos urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi***

Isolados bacterianos e fúngicos foram cultivados em meio TSB e BD, respectivamente, a 26 °C, 160 rpm, por 48 horas. Alíquotas contendo  $1 \times 10^8$  células/ mL ou com uma massa micelial semelhante (fungos e actinobactérias) tiveram suas concentrações ajustadas com água destilada estéril e seu potencial como agente biológico contra o desenvolvimento *in vitro* dos urediniósporos de *P. pachyrhizi* foram avaliadas, conforme Dorighello *et al* (2015). Assim, 10 uL da suspensão de células bacterianas ou da massa micelial e o mesmo volume da suspensão de urediniósporos foram distribuídas nos compartimentos escavados de lâminas de microscopia e acondicionadas em câmara úmida com temperatura controlada tal como no item 4.1.3. A avaliação também ocorreu de forma semelhante ao item 4.1.3 e, portanto, os isolados que apresentaram um desempenho igual ou maior a 90% em relação à inibição da germinação dos urediniósporos foram identificados e direcionados para a sua identificação e os próximos ensaios para a averiguação de possíveis características de interesse agrônômico.

#### **4.3) Identificação taxonômica dos isolados microbianos selecionados**

A identificação dos melhores isolados selecionados foi realizada utilizando marcadores moleculares, o DNA foi extraído a partir de culturas puras cultivadas em meio líquido apropriado por 48 horas utilizando o kit DNeasy UltraClean Microbial da QIAGEN. O DNA extraído teve sua qualidade aferida através da avaliação da sua integridade utilizando eletroforese em um gel de 1,2% de agarose e a verificação de sua pureza foi avaliada com espectrofotômetro NanoDrop. Após a confirmação da boa qualidade das amostras extraídas, elas foram utilizadas para reações downstream.

A classificação taxonômica dos isolados bacterianos foi determinada pelo sequenciamento dos marcadores moleculares da região 16S (LANE, 1991) utilizando um conjunto de 8 primers internos do locus 27F; 357F; 357R; 704F; 704R; 114F; 110R E 1494R. Por sua vez, os isolados fúngicos foram identificados utilizando o marcador ITS utilizando o

conjunto ITS1-F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')/ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (GARDES; BURNS, 1993; WHITE *et al.*, 1991). Os produtos de PCR foram purificados com Wizard® Genomic DNA Purification Kit e utilizados para a reação de sequenciamento com o kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing*. As condições para amplificação e os parâmetros de ciclagem foram: 1 µL PCR purificado (35 ng), 2 µL 5x *BigDye Terminator Sequencing Buffer*, 1,6 µL oligonucleotídeos iniciadores (5 pmol), 1 µL *Ready Reaction PreMix BigDye* e 4,4 µL água ultrapura esterilizada. O sequenciamento foi realizado no analisador genético *Applied Biosystems 3500 XL*. A avaliação de qualidade e a montagem dos *contigs* consenso foram realizadas no programa BioEdit versão 5.0.9 (HALL *et al.*, 2011). O índice de similaridade foi verificado com o BLAST+ 2.16.0 comparando as sequências obtidas com as sequências disponíveis nas plataformas EzBioCloud (YOON *et al.*, 2017) e NCBI (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

#### **4.4.1) Avaliação do crescimento de bactérias em meio oligotrófico**

A superfície foliar é um ambiente extremamente hostil para o crescimento microbiano. Agentes de biocontrole de doenças foliares devem crescer e competir nesse ambiente desprovido de nutrientes. Nesse sentido, a seleção de linhagens efetivas para o biocontrole de doenças deve levar em consideração a capacidade de um microrganismo em ambiente oligotrófico.

Isolados bacterianos selecionados na etapa *in vitro* em lâmina escavada foram cultivados sob as mesmas condições do item 4.2. Após o período de cultivo, as células foram submetidas a um processo de lavagem, realizado consecutivamente três vezes, consistindo no seguinte processo: centrifugação (4000 rpm, 10 minutos), eliminação do sobrenadante, adição de água destilada estéril e vortexização até a dissolução do corpo de fundo (pellet). A seguir, alíquotas de 2 µL ( $\sim 2 \cdot 10^8$  células) das suspensões bacterianas foram colocadas com quatro repetições nas cavidades da microplaca de 96 poços contendo 200 µL de meio TSB diluído a 1700 vezes a fim de simular a quantidade de glicose disponível na superfície foliar como visto em Mercier e Lindow (2000) tendo folhas primárias de feijão-de-vagem (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Bush Blue Lake) na fase de emergência do primeiro trifólio como modelo. A placa permaneceu sob incubação em BOD a 30 °C sem agitação tendo a sua densidade ótica avaliada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm nos períodos de 6, 24, 30 e 48 horas após a inoculação do meio de cultura.

#### **4.4.2) Avaliação da formação de biofilme por bactérias selecionadas**

Alíquotas dos isolados bacterianos cultivados e ajustados no ensaio do item 4.4.2 também foram utilizados para averiguar a formação de biofilme em microplaca de 96 poços contendo 200 µL de meio TSB não diluído avaliados 24 e 48 horas após a inoculação. A metodologia utilizada para quantificar a formação de biofilme foi a baseada na utilização de corante cristal violeta e etanol como descrito em Djordjevic, Wiedmann e McLandsborough (2002). Sendo assim, nos intervalos de avaliação das placas descartou-se o meio de cultura contendo as bactérias. Cada poço foi lavado com água destilada estéril três vezes, onde adicionou-se uma solução de cristal violeta a 0,1% e, após 15 minutos de fixação, o corante foi descartado, os poços foram lavados mais três vezes para a eliminação de corante residual e foram adicionados 250 µL de etanol absoluto para a solubilização do cristal violeta retido no biofilme. Após 5 minutos, as densidades óticas dos poços foram avaliadas em espectrofotômetro sob um comprimento de onda de 570 nm.

#### **4.5) Avaliação do potencial de fungos e bactérias no controle da ferrugem asiática em folhas destacadas e em condições controladas em casa de vegetação**

##### **I) Folhas destacadas**

Linhagens microbianas que foram selecionadas na etapa de germinação em lâminas escavadas tiveram sua eficiência em controlar a FAS avaliada em folhas destacadas em placas de Petri utilizando três blocos separados com os seus próprios controles. A suspensão de urediniósporos e os inóculos foram preparados de maneira semelhante ao item 4.2. Dessa forma, o conteúdo dos frascos de cultivo foram transferidos para tubos tipo Falcon de 50 mL limpos, eles foram centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos em centrífuga modelo Eppendorf 5430r e após o descarte do sobrenadante foram adicionados 30 mL de água destilada + Tween80 a 0,01% (v/v) autoclavados ao corpo de fundo, o conjunto foi homogeneizado com vortex e centrifugado novamente, esta etapa de limpeza foi realizada três vezes a fim de que o inóculo final estivesse livre de quaisquer resquícios do meio de cultura.

Para a montagem das placas, trifólios jovens de mudas de soja no estágio V3-V4 foram coletados ao amanhecer e mantidas em câmara úmida até a montagem das placas com quatro repetições por tratamento. Os folíolos destacados, com sua face abaxial voltada para cima, foram separados e colocados no interior de placas de Petri de vidro com 5,5 cm de diâmetro previamente limpas e forradas com papel filtro qualitativo umidificado com água destilada autoclavada e um pedaço de algodão úmido fixado ao seu pecíolo (**figura 2**) (LI *et*

al, 2010). O inóculo foi pulverizado sobre os folíolos utilizando um aspersor manual até que se atingisse o ponto de escorrimento. Após 48 horas da inoculação dos tratamentos, uma área circular de 2,9 cm de diâmetro no centro de cada folíolo foi inoculada com 20 uL da suspensão de urediniósporos ( $1-2 \times 10^5$  esporos/ mL) com a utilização de pipetas e pincéis de silicone. Para promover o processo de infecção, as placas foram envoltas com papel alumínio para a criação de um ambiente escuro e úmido e mantidas em sala climatizada a 22 °C por 48h, posteriormente o papel alumínio foi removido e as placas foram mantidas sobre a bancada do laboratório sendo umidificadas quando necessário. As folhas foram avaliadas após 14 dias da inoculação com urediniósporos, atribuindo-se uma nota de 1 a 3 para cada trifólio de acordo com o grau de severidade da FAS encontrado dentro do experimento.



**Figura 2:** Folíolos destacados com área circular de 2,9 cm de diâmetro delimitada.

A metodologia de folhas destacadas oferece uma série de vantagens como um maior controle do ambiente do experimento e menor espaço utilizado. Contudo, a mesma apresenta limitações como a necessidade de suplementação de fitohormônios para evitar e retardar processos como a clorose e senescência (32, 33). Logo, metodologias que consigam garantir os benefícios mencionados e suplantam as desvantagens são desejadas.

## **II) Plantas cultivadas em tubetes em casa de vegetação**

Nesse quesito, tubetes cônicos de plástico de 250 mL preenchidos com substrato

Carolina Soil Garden (turfa, vermiculita e calcário) foram semeados, mantidos em casa de vegetação com um sistema de irrigação em aspersão e após suas mudas atingirem o estágio V4, a porção caulinar logo acima do nó do unifólio foi excisado (**figura 3**). As mudas compoendo as quatro repetições do experimento receberam seus tratamentos da mesma forma que as folhas destacadas, a seguir elas foram mantidas em câmara úmida e escura por 48 horas. As quatro repetições do experimento foram avaliadas 14 dias após a inoculação com patógeno atribuindo-se uma nota de 1 a 3 de acordo com a severidade encontrada tal como com as folhas destacadas. Por fim, utilizando-se dos dados obtidos nos ensaios de placas e em tubetes, pôde-se selecionar uma actinobacteria “CMAA 894” com o melhor desempenho em controlar a ferrugem asiática e, portanto, a mesma foi direcionada para os próximos experimentos.



**Figura 3:** Tubete contendo muda de soja com seus unifólios remanescentes após excisão.

#### **4.6.1) Tolerância a fungicidas**

Testes preliminares com concentrações utilizadas em campo do fungicida sistêmico AMISTAR TOP (azoxistrobina 200g/ L; difenoconazol 125g/ L) da Syngenta, foram realizados em placas de Petri com meio BDA ou TSA simulando de condições de 250; 500 e 1000 mL/ ha com o intuito de se avaliar a tolerância dos microrganismos selecionados a esse fungicida. Os microrganismos foram inoculados a partir do estriamento por esgotamento ou colocando-se um plug do micélio anteriormente preservado em frascos tipo Castellani no centro do meio de cultura. As placas foram mantidas em BOD a 30 °C por 7 dias e a avaliação

foi realizada a partir da observação do crescimento dos microrganismos, isto é, se houve o desenvolvimento de uma cultura e se concentrações maiores do fungicida inibiram o desenvolvimento comparado com o controle.

#### **4.6.2) Extração de metabólitos secundários produzidos por *Streptomyces araujoniae* CMAA 894**

Para avaliar o potencial bioativo do isolado microbiano em controlar a infecção e/ou a proliferação da ferrugem asiática da soja *in vivo*, mudas de soja foram cultivadas conforme item 4.1.2, desbastadas até que se obtivesse apenas duas plantas por vaso e foram tratadas com suspensão celular actinobacteria selecionada na etapa 4.5 e seu extrato bruto.

Dessa forma, a fim de se preparar os inóculos, a suspensão celular foi feita como descrito no item 4.5. O extrato bruto foi obtido a partir da inoculação de 2 L de meio batata dextrose (BD) distribuídos em 10 frascos de cultivos de 500 mL e inoculados com 500 uL de pré-inóculo (OD600 = 0,5) do isolado CMAA 894. Os frascos de cultivo foram mantidos sob agitação de 150 rpm a 30 °C por 10 dias, visando proporcionar uma ótima aeração da cultura. Após o período de incubação, o meio de cultura foi centrifugado, o sobrenadante foi recuperado e filtrado com membrana 0,22 uM, seguido de sua separação para a alteração de seu pH para 3,0 e 8,0. A extração de seus metabólitos nas duas faixas de pH foi realizada utilizando-se acetato de etila como solvente extrator ( $\frac{1}{3}$  do volume total) em uma separação líquido-líquido utilizando funil de separação tal como descrito em Melo; Sanhueza (1995). Por fim, as amostras extraídas foram combinadas, secas em rotaevaporador, pesadas e foi feito uma solução de 0,5 mg/mL, concentração de valor conhecido pelo seu efeito fungicida para uso posterior (BEYER *et al*, 2019) (SILVA *et al*, 2014).

#### **4.6.3) Avaliação do potencial bioativo da linhagem microbiana selecionada no controle da ferrugem asiática da soja (ensaio em condições controladas de casa de vegetação)**

Plantas no estágio fenológico V6 e início do estágio reprodutivo, semeadas há 35 dias, foram selecionadas e receberam os tratamentos separadamente que consistiram na aplicação, até o ponto de escorrimento, do **extrato bruto** ressuspendido em DMSO a 0,1% (v/v) (0,5 mg/ mL) e da **suspensão bacteriana** em Tween 80 a 0,01% (v/v) (OD600 = 0, 25) 48 horas antes da inoculação com a suspensão de urediniosporos de *P. pachyrhizi* ( $1-2 * 10^5$  esporos/mL) preparadas como no item 4.1.3. Os vasos foram dispostos aleatoriamente em mesas (**figura 4**) em casa de vegetação com ambiente parcialmente controlado abaixo de um sistema aspersor ligado quatro vezes ao dia totalizando 4 minutos a fim de se criar um

ambiente com alta umidade e água livre na superfície foliar, condições ideais para infecção das plantas pelo patógeno e desenvolvimento dos sintomas da doença (FURTADO *et al*, 2009). O potencial bioativo do isolado e de seus metabólitos foi avaliado 21 dias após a inoculação com o fitopatógeno causador da ferrugem asiática da soja. Posteriormente, observando o ótimo desempenho do tratamento com a suspensão celular, o experimento foi repetido utilizando 2 aplicações da suspensão celular, intervaladas em 7 dias, a fim de verificar se haveria o aumento da eficiência do controle da doença conferido pelo inóculo.

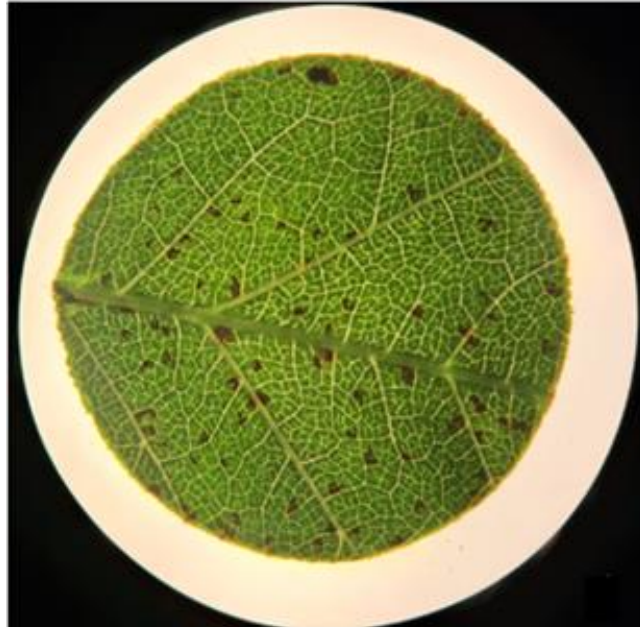


**Figura 4:** Vasos dispostos aleatoriamente em mesas em casa de vegetação. O sistema de aspersão pode ser visto logo acima.

#### **4.6.4) Avaliação da severidade da doença em mudas em casa de vegetação**

Duas semanas após a inoculação de patógenos no experimento 4.7.1, sintomas da ferrugem asiática já eram visíveis e, ao fim de três semanas, duas folhas do terço médio e baixo (4 trifólios por vaso) de cada planta foram aleatoriamente coletadas para avaliação da severidade da doença, totalizando 32 e 40 folhas por tratamento no primeiro e segundo experimento, respectivamente. Os trifólios foram fotografados e uma seção de, aproximadamente, 2,5 cm de diâmetro do centro de cada folíolo foram recortados com um fura rolha para avaliação da severidade da ferrugem asiática. Assim, a avaliação da severidade se deu pela contagem com lupa estereoscópica do número total de lesões em cada disco do trifólio (**figura 5**), contagem do número de urédias em 10 lesões escolhidas aleatoriamente

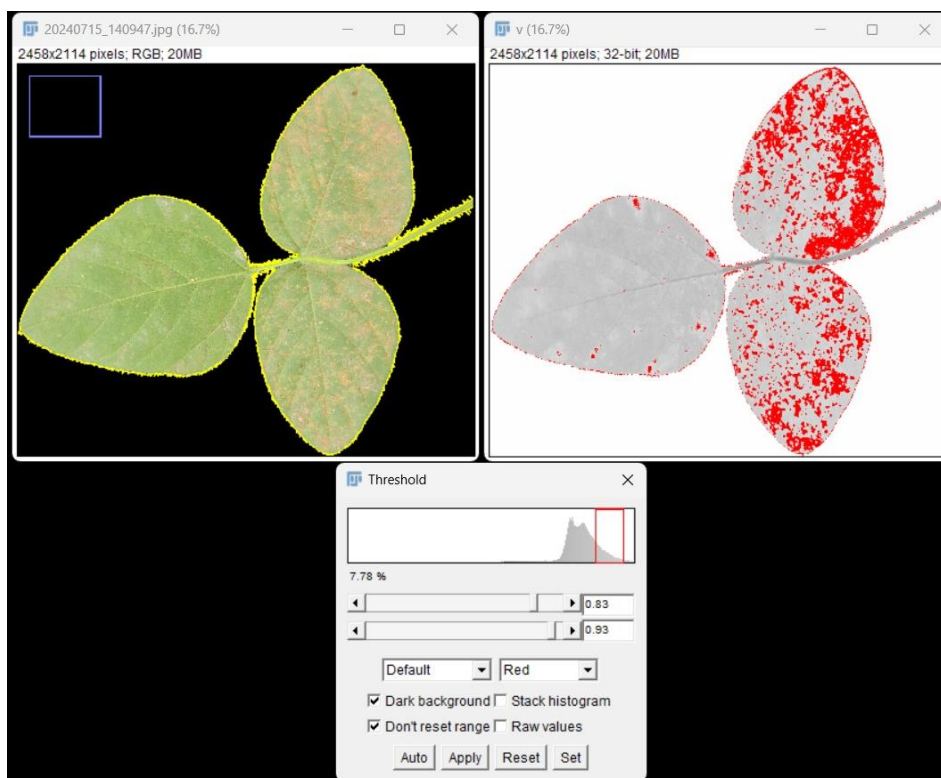
(**figura 6**) e leitura de imagens das folhas com o ImageJ com o plug-in Robust User-friendly Script Tool (RUST) adaptado para estimar a área acometida pela doença (**figura 7**) (BONDE *et al* 2006) (GALLEGO-SÁNCHEZ *et al*, 2020) (MUELLER, 2003).



**Figura 5:** Seção foliar com lesões (pontos necróticos) provocados por FAS.



**Figura 6:** Lesão de FAS exibindo urédias com urediniósporos visíveis.



**Figura 7:** ImageJ com o plugin RUST adaptado para avaliação da área lesionada por FAS com o threshold traçado entre 0,83 e 0,93.

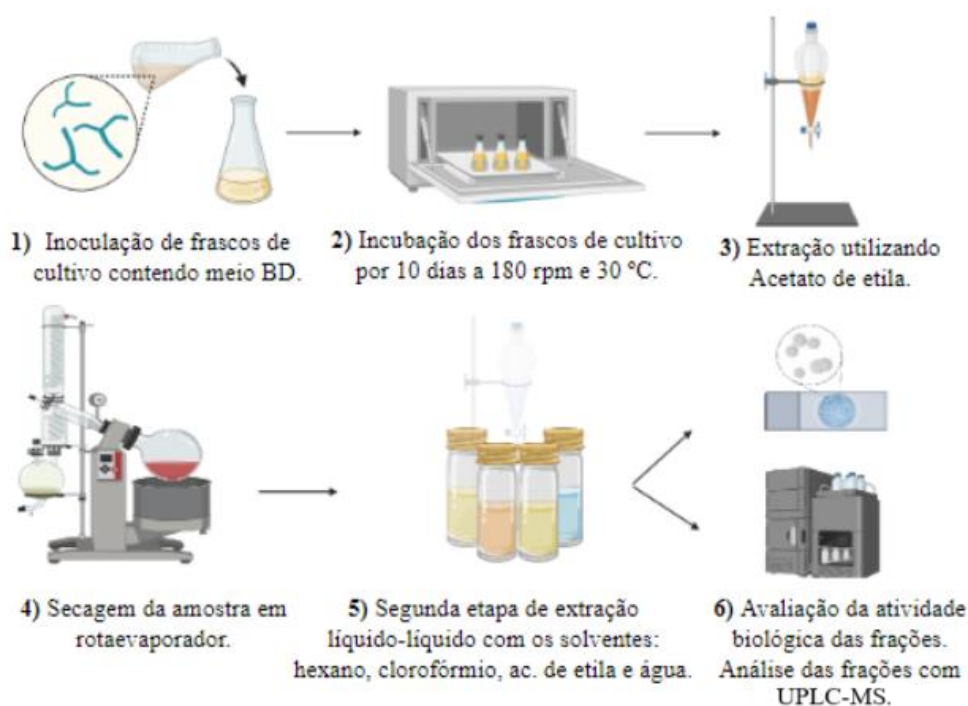
#### 4.7) Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no Python versão 3.12.1 no ambiente virtual Pycharm 2023.3.7 utilizando as bibliotecas Pandas 2.2.0rc0, SciPy 1.12.0, StatsModel 0.14.2 e Seaborn 0.13.2 e o software Prisma para a geração de gráficos. Nos experimentos em casa de vegetação 1 e 2 cada repetição teve o seu maior e menor valores retirados e com os dois valores restantes fez-se uma média que foi utilizada como input para as análises. Após verificar a normalidade e variâncias iguais entre os grupos com os Testes de Shapiro-Wilk e Levene disponíveis no pacote SciPy, utilizou-se os testes ANOVA seguido do Teste de Tukey e Teste T de Student adotando o valor de  $\alpha = 0,05$  em todas as análises para verificação e distinção de quais grupos tiveram resultados expressivos ( $p\text{-value} < 0,05$ ) nos experimentos 1 e 2 respectivamente. Além disso, foi utilizado o teste Z para comparar os resultados obtidos entre os experimentos em casa vegetação 1 e 2.

#### 4.8.1) Perfil químico dos metabólitos secundários produzidos por *Streptomyces araujoniae* CMAA 894

Em virtude do ótimo desempenho de *Streptomyces araujoniae* (CMAA 894) em inibir

o desenvolvimento do patógeno, os seus possíveis mecanismos antagonistas contra o fungo *P. pachyrhizi* foram explorados. O extrato bruto foi preparado e extraído tal como na seção 4.7.1 e submetido a uma nova etapa de separação líquido-líquido semelhante à anterior. Essa nova etapa foi realizada utilizando um funil de separação com quatro solventes de polaridades diferentes adicionados consecutivamente. São eles, respectivamente: hexano, clorofórmio, acetato de etila e água. Cada uma das quatro frações foi concentrada e seca em rotavapor, pesada, ressuspensa em metanol e, alíquotas, foram retiradas para os testes de inibição. As leituras foram feitas com Cromatografia Líquida de Ultra Desempenho acoplada à Espectrometria de Massas (UPLC-MS) (**figura 8**).



**Figura 8:** Protocolo de extração dos metabólitos secundários da linhagem *Streptomyces araujoniae* CMAA 894 utilizando quatro solventes com polaridades diferentes.

Dessa forma, parte das alíquotas foram utilizadas em ensaios de germinação de uredíniosporos em lâmina escavada tal como nos itens 4.1.3 e 4.2 utilizando as frações na concentração de 0,5 mg/ mL, ressuspensa em DMSO a 0,1% (v/v).

Por outro lado, o restante das alíquotas e parte do extrato foram utilizados para a caracterização química de seus constituintes, visando a identificação de moléculas de interesse com potencial ação fungicida. A separação e caracterização dos compostos químicos presentes nas amostras foi realizada com a Cromatografia Líquida de Ultra Desempenho acoplada à Espectrometria de Massas (UPLC-MS) e as moléculas foram sediadas (Na<sup>+</sup>) em

modo de análise positivo. Os dados das massas e cargas de cada fração foram analisados comparando-se com o banco de dados disponível em CHEMnetBASE: Dictionary of Natural Products para a sua identificação.

#### **4.8.2) Produção de AIA e promoção de crescimento de plantas**

A verificação e quantificação da produção de ácido indol-acético (AIA) pela linhagem *S. araujoniae* CMAA 894 foram realizadas com base nos trabalhos de Frankenberger Jr *et al* (1988). Assim, o pré inóculo foi preparado a partir da repicagem de uma colônia isolada de CMAA 894 para o meio nutritivo Batata Dextrose (BD) seguida de incubação por 48 horas sob agitação de 150 rpm, posteriormente a sua densidade ótica foi ajustada para o valor de 0,5 e 50 uL foram utilizados para inocular frascos de cultivo de 25 mL contendo 10 mL de meio Minimal Salt (MS) com elementos traços e suplementado com L-triptofano. Os frascos com 5 repetições para cada tempo foram mantidos sob agitação de 120 rpm a 28 °C no escuro até a sua avaliação 24, 48 e 72 após a inoculação.

A quantificação de AIA produzido pela actinobacteria nos tempos marcados foi realizada com base na absorbância do meio após adição do reagente de Salkowsky. Para isso, para cada frasco, o meio foi inicialmente centrifugado a 4000 rpm em tubos tipo Falcon de 15 mL por 15 minutos e 100 uL do sobrenadante foi transferido para um poço de microplaca de 96 poços, onde adicionou-se 100 uL do reagente de Salkowsky, a placa foi envolta com papel alumínio e incubada no escuro por 20 minutos até o momento de sua leitura. O controle negativo foi realizado no tempo 0 com 5 uL do pré inóculo sendo pipetados em 1 mL do meio MS com elementos traços e suplementado; o processamento até a leitura foram idênticos ao realizados com o meio inoculado. A absorbância de cada poço foi medida com espectrofotômetro configurado com o comprimento de onda de 570 nm com a opção de múltiplas leituras por poço (16 pontos por poço e 10 flashes por ponto) e com base na curva padrão previamente preparada a partir da leitura da absorbância com AIA sintético (3-Indoleacetic acid) da Sigma, foi possível inferir a quantidade de AIA produzido pelo isolado no período de 72 horas.



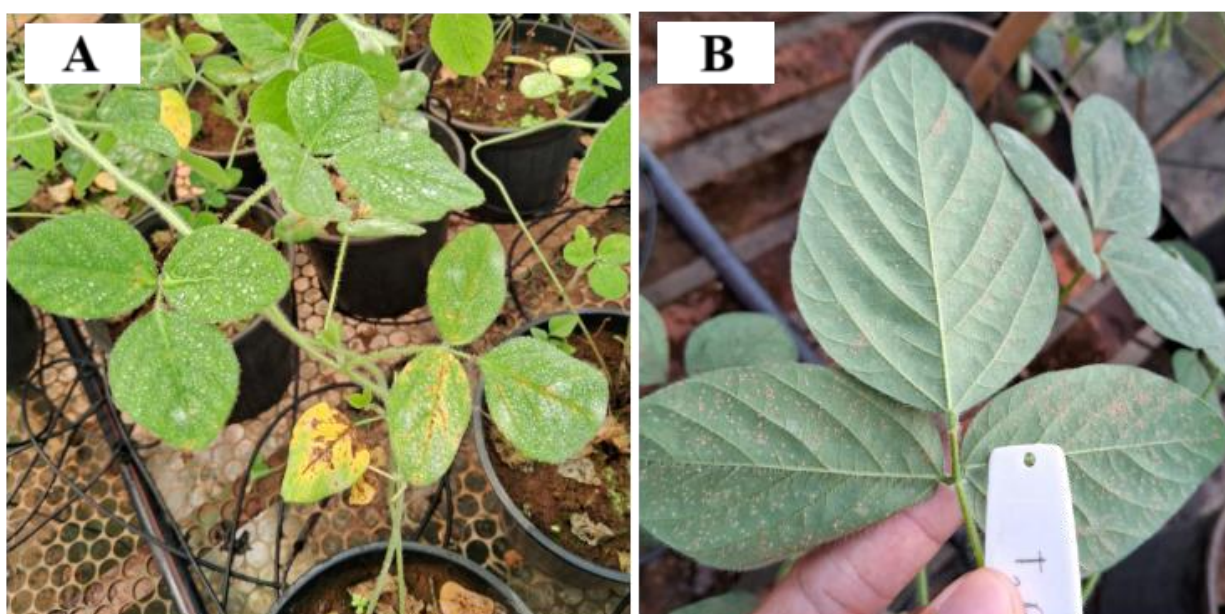
## 5) RESULTADOS

### 5.1.1) Organização das linhagens fúngicas e bacterianas

Os isolados cedidos pela Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental – Embrapa Meio Ambiente foram reativados em meios de cultivo TSA e BDA através do estriamento por esgotamento. Após o período de incubação e verificação das linhagens viáveis, a coleção de trabalho foi composta por 37 isolados bacterianos e 23 isolados fúngicos, os quais foram preservados em solução glicerol 20%, a -80 °C para análises posteriores.

### 5.1.2) Produção de inóculo de *Phakopsora pachyrhizi* em condições de casa de vegetação

Mudas de soja NEO 610 IPRO, cultivadas em vasos de 3 litro e, continuamente expostas à plantas infectadas com a ferrugem asiática, desenvolveram sintomas típicos semelhantes aos da doença (**figura 9**). Isso demonstra que o ambiente escolhido e o regime de aspersão de água para a manutenção de água livre na superfície das folhas foram condições propícias para a multiplicação do inóculo de *Phakopsora pachyrhizi*, criando uma fonte de inóculo ao longo dos experimentos.



**Figura 9:** Plantas de soja com sintomas típicos de ferrugem asiática. A foto à esquerda (A), mostra plantas com lesões características de FAS com água livre em sua superfície. A foto à direita (B), mostra a face abaxial de folhas com urédias de FAS.

## **5.2) Inibição da germinação de uredíniosporos da ferrugem asiática por bactérias e fungos**

Sessenta isolados microbianos foram analisados em relação ao seu potencial como agentes de controle biológico da ferrugem asiática. Para isto, foram realizadas sucessivas etapas de “screening”, sendo a primeira delas a avaliação de inibição da germinação de uredíniosporos de *P. pachyrhizi*. Dessa forma, foi possível selecionar os microrganismos que apresentaram uma taxa de inibição de germinação de uredíniosporos acima de 90% (em cinza na **tabela 1**) que foram utilizados nas próximas etapas.

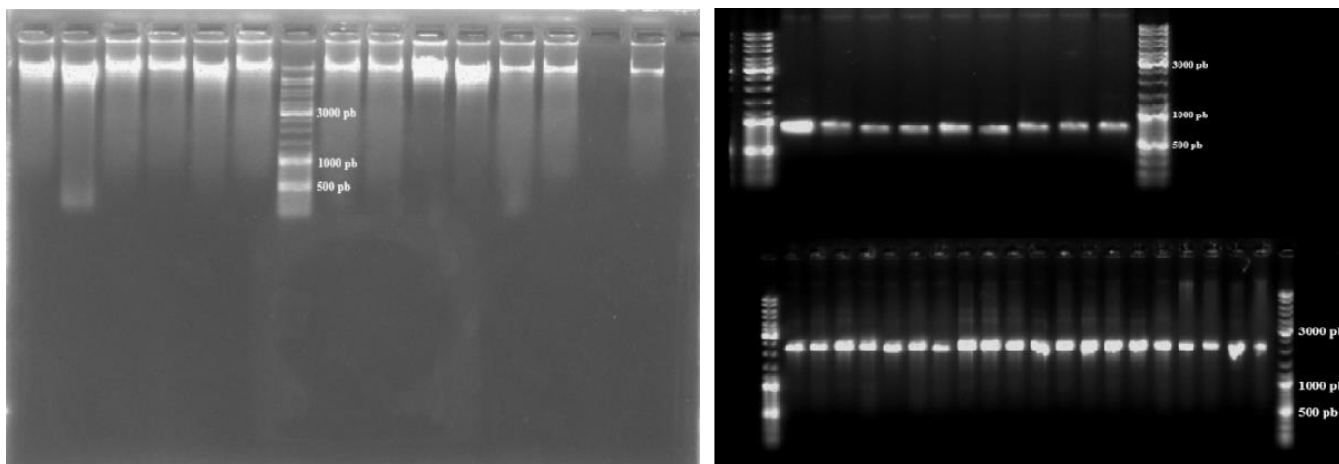
<b>Isolados bacterianos</b>	<b>Inibição da germinação de urediniósporos (%)</b>	<b>Isolados fúngicos</b>	<b>Inibição da germinação de urediniósporos (%)</b>
<b>F2AFSD2</b>	100	<b>F1NCD2</b>	100
<b>BL</b>	100	<b>07-08</b>	100
<b>277</b>	100	<b>F3VSD-F3</b>	100
<b>65</b>	100	<b>30-05</b>	99
<b>19</b>	100	<b>02-13</b>	98
<b>NTN 021/08</b>	98	<b>32-01</b>	98
<b>14</b>	95	<b>44-18</b>	97
<b>EN19</b>	95	<b>F2ASD-F2</b>	95
<b>CMAA 894</b>	94	<b>F1NED-F2</b>	93
<b>0G</b>	93	<b>41-15</b>	85
<b>F1NA5</b>	92	<b>F1NCD-F1</b>	77
<b>F3VSD2</b>	92	<b>F1NA7</b>	70
<b>CMAA 1322</b>	91	<b>27-16</b>	67
<b>EN78</b>	91	<b>27</b>	66
<b>133</b>	88	<b>F1NCD-F2</b>	54
<b>191</b>	83	<b>F1NCD1</b>	34
<b>CMAA 1649</b>	81	<b>F3VA1</b>	22
<b>F3VSD-F1</b>	79	<b>Isol_5</b>	18
<b>F1NA1</b>	78	<b>Isol_6</b>	16
<b>149</b>	68	<b>40-09</b>	14
<b>F3VSD1</b>	67	<b>Isol_4</b>	3
<b>F1NA8</b>	58	<b>Isol_3</b>	0
<b>F3VA2</b>	56	<b>PT</b>	0
<b>Isol_7</b>	46		
<b>131</b>	45		
<b>AFS192</b>	45		
<b>Isol_8</b>	40		
<b>3T3-R3</b>	32		
<b>CMAA 1196</b>	20		
<b>3TA-73</b>	20		
<b>CMAA 1647</b>	20		
<b>CAAT 2-62</b>	18		
<b>CAAT 4-22</b>	17		
<b>Isol_2</b>	16		
<b>Isol_9</b>	15		
<b>CAAT 5-38</b>	11		
<b>Isol_1</b>	0		

**Tabela 1:** Taxa de inibição da germinação de urediniósporos de *P. pachyrhizi* por microrganismos antagonistas (células cinzas).

### 5.3) Identificação taxonômica dos isolados microbianos selecionados

A etapa de identificação de microrganismos é uma etapa crucial para a otimização da bioprospecção, tendo em vista que grupos de microrganismos produtores de metabólitos secundários de importância biotecnológica frequentemente possuem genes responsáveis pelas enzimas de interesse conservados filogeneticamente, compondo, dessa forma, um cluster de genes tal como ocorre com *Bacillus spp* produtores de antifúngicos, clado com alto potencial de ser utilizado como agentes de controle biológico (KHURANA *et al*, 2020).

Assim, após a extração do DNA genômico e verificação de sua pureza por espectrofotometria e integridade em gel de agarose 1,2%, foi possível utilizá-lo como template para a amplificação das regiões de importância taxonômica 16S e ITS (**figura 10**) para posterior sequenciamento.



**Figura 10:** DNA genômico extraído de 15 isolados (esquerda). Produtos de PCR purificados das regiões ITS (~700 pb) e 16S (~2200 pb) (direita). Marcador: Thermo Scientific™ O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder.

A reação de sequenciamento resultou em leituras (reads) com excelente qualidade. Os dados foram exportados para a plataforma do software BioEdit versão 5.0.9 e trimming dos reads, os contigs dos isolados ainda não identificados foram submetidos no BLAST+ 2.16.0, resultando na identificação dos isolados da coleção de trabalho com base nos cinco maiores scores (Max Score) dentre os resultados (**tabelas 2 e 3**).

<b>Isolados bacterianos</b>	<b>Identificação taxonômica</b>	<b>Códigos de acesso/ referências</b>
<b>F2AFSD2</b>	<i>Bacillus sp</i>	(MW384546.1) (MH712051.1) (KU291373.1) (KC790240.1) (MF185159.1)
<b>BL</b>	<i>Bacillus sp</i>	(MW332243.1) (MF094717.1) (MG893181.1) (MW361242.1) (MN393073.1)
<b>19</b>	Brucellaceae (Família)	(CP175669.1) (OK614086.1) (EF537009.1) (KP326563.1) (CP174548.1)
<b>NTN021/08</b>	Enterobacteriaceae (Família)	(MH107113.1) (CP071226.1) (CP142089.1) (OR976060.1) (MW750407.1)
<b>14</b>	<i>Microbacterium sp</i>	(KR906333.1) (KF788209.1) (MK389435.1) (MN367116.1) (MF523801.1)
<b>EN19</b>	Enterobacteriaceae	(CP157375.1) (OP630970.1) (ON845417.1) (OR434944.1) (MT113090)
<b>F1NA5</b>	Erwiniciaceae (Família)	(U80209.1) (MN428659.1) (MN540930.1) (MT234397.1) (MK905372.1)
<b>F3VSD2</b>	<i>Pseudomonas cichorii</i>	(KX456362.1) (AB724294.1) (MH373661.1) (MT982172.1) (KC311733.1)
<b>EN78</b>	<i>Bacillus sp</i>	(MW332243.1) (MF094717.1) (MG893181.1) (MW361242.1) (MN393073.1)
<b>0G</b>	<i>Bacillus subtilis</i>	(MG893181.1) (MN393073.1) (ON045789.1) (CP136263.1) (OR431488.1)
<b>CMAA 894</b>	<i>Streptomyces araujoniae</i>	Silva et al (2013)
<b>CMAA 1322</b>	<i>Streptomyces caatingaensis</i>	Santos et al (2015)

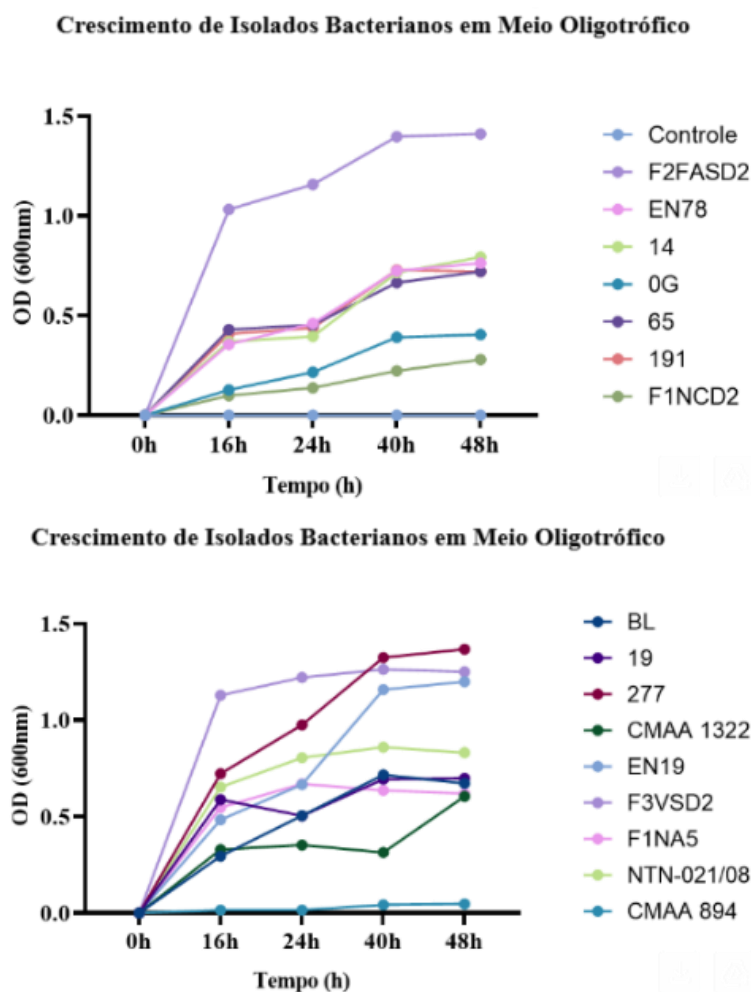
**Tabela 2:** Identificação taxonômica de linhagens de bactérias antagonistas através do sequenciamento do marcador molecular da região do RNA ribossomal 16S.

Isolados fúngicos	Identificação taxonômica	Códigos de acesso
<b>F1NED-F2</b>	<i>Diaporthe sp</i>	(MG870470.1) (MG870463.1) (MG870480.1) (MT820321.1) (MG870461.1)
<b>30-05</b>	<i>Fusarium sp</i>	(OM875470.1) (PP906874.1) (MT371377.1) (PQ451743.1) (PP344798.1)
<b>F2ASD-F2</b>	Eurotiales (Família)	(MG870422.1) (ON024678.1) (MZ014549.1) (MH474242.1) (KF871458.1)
<b>32-01</b>	<i>Fusarium sp</i>	(PP101536.1) (OM106205.1) (MZ723890.1) (MZ723895.1) (PQ482276.1)
<b>02-13</b>	<i>Trichoderma sp</i>	(OR284305.1) (OR350467.1) (MH400822.1) (PP770479.1) (OZ012412.1)
<b>44-18</b>	<i>Trichoderma sp</i>	(PQ219339.1) (MK871215.1) (OQ821765.1) (MN634481.1) (MW361348.1)
<b>07-08</b>	<i>Trichoderma sp</i>	(PQ035928.1) (MH284011.1) (MF871526.1) (OR939722.1) (MK870666.1)
<b>F3VSD- F3</b>	<i>Curvularia sp</i>	(ON926994.1) (MN912315.1) (MG250432.1) (PQ475961.1) (PP564501.1)

**Tabela 3:** Identificação taxonômica de linhagens fúngicas antagonistas através do sequenciamento do marcador molecular da região ITS (Internal Transcribed Spacer).

#### 5.4.1) Avaliação do crescimento de bactérias em meio oligotrófico

As condições bióticas como a disponibilidade de nutrientes na superfície da folha de um vegetal são condicionantes da composição e tamanho da comunidade epifítica de um vegetal (MORALES *et al*, 2018). Nesse contexto, a disponibilidade de fontes de carbono como apontado por Mercier e Lindow (2000) configura como o principal fator limitante para o desenvolvimento de populações de microrganismos. Além disso, pelas fontes de carbono estarem desigualmente distribuídas ao longo da superfície foliar, a filosfera é caracterizada por ser um ambiente majoritariamente oligotrófico com limitados nichos de nutrientes como nas proximidades de veios por onde vazam fotoassimilados (LEVEAU; LINDOW, 2001). Assim, com o intuito de simular o crescimento das bactérias selecionadas sob a superfície foliar, um meio de cultura com a quantidade de fonte carbono modificada para as concentrações usualmente encontradas em folhas de feijão-de-vagem (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Bush Blue Lake) foi utilizado a fim de avaliar o crescimento de bactérias selecionadas em um meio oligotrófico (**Figura 11**).



**Figura 11:** Crescimento de bactérias em meio oligotrófico de bactérias selecionadas.

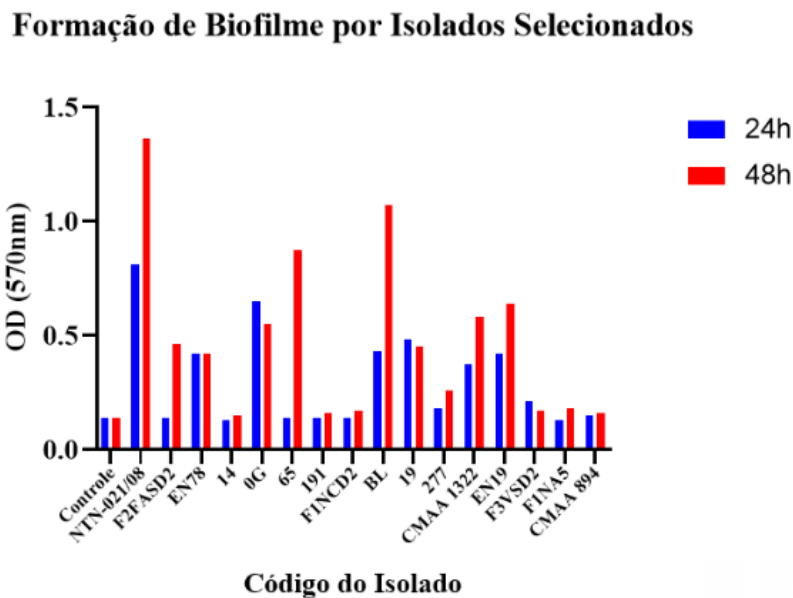
#### 5.4.2) Avaliação de formação de biofilme por bactérias selecionadas

A filosfera é um ambiente que está em contato direto com a atmosfera e, portanto, este espaço é caracterizado por um alto dinamismo de suas condições abióticas como umidade, temperatura e incidência de raios UV (KOSKELLA, 2020). Dessa forma, os microrganismos epifíticos necessitam dispor de adaptações que os permitam que sobrevivam neste ambiente.

O biofilme bacteriano é uma matriz composta, principalmente, por EPSs (exopolissacarídeo) produzido por comunidades de organismos formando agregados que permanecem unidos ocupando a superfície e que confere aos seus uma maior resistência a estresses ambientais (YIN *et al*, 2019). No contexto da filosfera, 70% das bactérias residentes desse micro nicho vivem em comunidades delimitadas por um biofilme (MONIER; LINDOW, 2003), ou seja, é notável a importância que essa forma de cooperação possui no sucesso da colonização de microrganismos sobre a superfície do vegetal. Colônias de bactérias produtoras de biofilme apresentam não só uma maior adesão e proteção contra a

dessecação, como também amenizam os efeitos nocivos das altas temperaturas e radiações UV incidentes sobre a planta (STONE; WEINGARTEN; JACKSON, 2018). Portanto, a capacidade de formação de biofilme é uma característica que potencializa a capacidade de permanência e colonização de microrganismos na filosfera e sua avaliação é necessária no processo de desenvolvimento de inoculantes voltados ao controle biológico, de ação preventiva, na parte aérea (FESSIA *et al*, 2022).

Assim sendo, a fim de avaliar estes importantes aspectos no processo de desenvolvimento de um inoculante para o controle da ferrugem asiática da soja, experimentos foram realizados com os isolados bacterianos selecionados a fim de verificar a formação de biofilme *in vitro* (figura 12).



**Figura 12:** Formação de biofilme por bactérias antagonistas à ferrugem asiática *in vitro*.

### 5.5) Avaliação do potencial de microrganismos no controle da ferrugem asiática

*Phakopsora pachyrhizi* é um patógeno biotrófico e, portanto, seu ciclo de vida é dependente da colonização dos tecidos vivos da planta para o seu desenvolvimento (GAUTHIER *et al*, 2014). Desse modo, experimentos utilizando trifólios e mudas de soja tiveram como intuito simular o processo de infecção do patógeno em condições de campo e em condições controladas de laboratório.

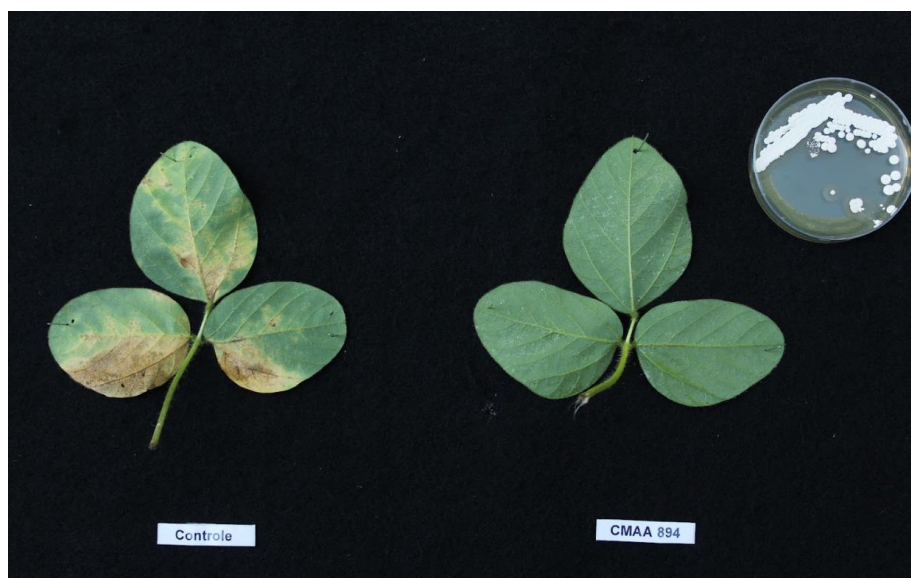
Assim sendo, 8 fungos e 15 bactérias pré-selecionadas foram avaliadas. Nos ensaios *in vitro*, ainda que constantemente fosse observado a perda de coloração natural dos trifólios, foi

possível selecionar os melhores isolados que resultaram nas menores notas de severidade e, portanto, eliminar aqueles causadores de fitotoxicidade (valores negativos) (**tabela 4**).

No ensaio em tubetes, duas linhagens foram selecionadas quanto às suas capacidades de reduzir a severidade da doença e, por isso, prosseguiram para os testes em vasos em casa de vegetação. Contudo, devido a ação fungicida de uma das linhagens já ter sido atestada em trabalhos anteriores envolvendo a avaliação de seu perfil de produtos metabólicos e o biocontrole de *Botrytis cinerea* em morangos no pós colheita (SILVA *et al*, 2013) (SILVA *et al*, 2014) (ZUCCHI, ; MORAES; MELO, 2008), a linhagem *Streptomyces araujoniae* (CMAA 894) foi selecionada para ser avaliado em condições de casa de vegetação (**figura 13**).

Linhagens	Severidade de FAS	
	Folhas destacadas	Tubetes
Controle	2,00	3,00
F2AFSD2	2,50	
NTN021/08	1,00*	1,33*
BL	1,75	
277	2,00	
CMAA 1322	1,25*	2,00
F1NCD2	3,00	
0G	1,50	
Controle	2,50	3,00
EN78	2,33	
CMAA 894	0,00*	1,00 *
65	1,50*	2,00
19	2,75	
EN19	2,75	
F1NA5	2,33	
14	1,67*	2,00
F3VSD2	2,25	
Controle	2,00	3,00
F1NED-F2	0,67*	1,00*
30-05	-0,50	
F2ASD-F2	-1,00	
32-01	-0,50	
02-13	-0,50	
44-18	-0,50	
07-08	0,75	

**Tabela 4:** Reação de folhas e plantas de soja à inoculação com *P. pachyrhizi*. Ensaios realizados utilizando-se trifólios destacados de soja e em tubetes. Isolados com as células em vermelho e com \* apresentaram os melhores resultados.



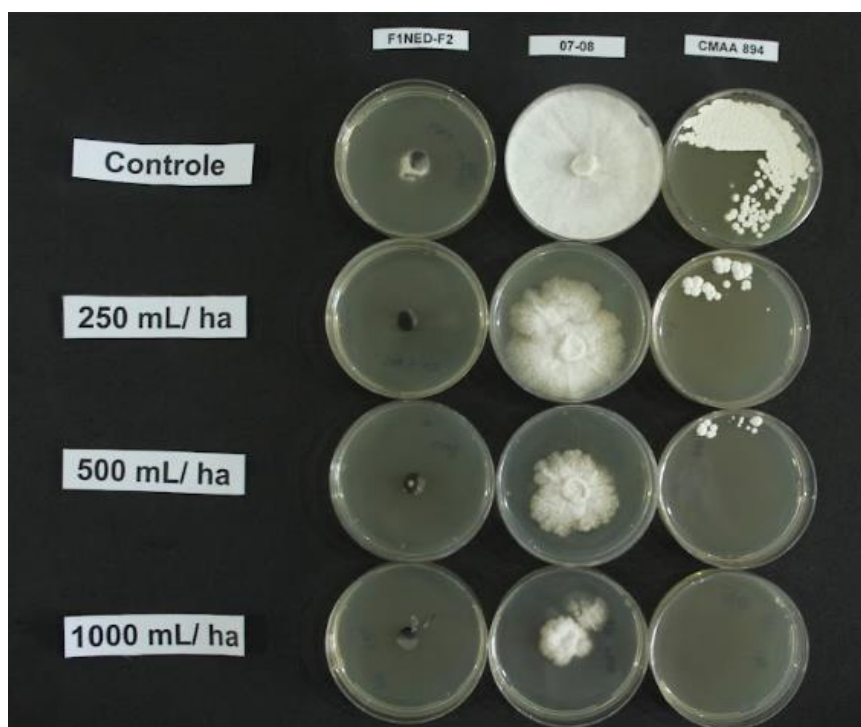
**Figura 13:** Sintomas da ferrugem asiática em folhas destacadas. A folha à esquerda mostra sintomas típicos da ferrugem (controle), enquanto a folha à direita mostra redução da área lesionada com a inoculação da actinobactéria, *S. araujoniae*, CMAA 894.

#### **5.6) Tolerância de fungos e bactérias antagonistas a *Phakopsora pachyrhizi* ao fungicida Amistar Top**

A avaliação da compatibilidade de microrganismos com potencial de serem utilizados como agentes de controle biológico com outros métodos de controle como os baseados na utilização de químico sintéticos são essenciais para o desenvolvimento de estratégias no contexto do Manejo Integrado de Pragas (MIP) (BOTELHO; MONTEIRO, 2011). Dessa forma, os isolados selecionados tiveram sua tolerância ao fungicida AMISTAR TOP (azoxistrobina 200g/ L; difenoconazol 125g/ L) avaliada através do seu crescimento em meio de cultura contendo concentrações do fungicida 0,5, igual e duas vezes superior ao utilizado em campo (**figuras 14 e 15**).



**Figura 14:** Aspecto do crescimento de bactérias em meio com o fungicida AMISTAR TOP, indicando uma resistência aos componentes do produto.



**Figura 15:** Aspecto do crescimento de fungos e actinobactéria em meio com o fungicida AMISTAR TOP, indicando uma resistência aos componentes do produto.

### 5.7) Avaliação do potencial de controle da ferrugem em condições de casa de vegetação

A ferrugem asiática da soja possui sintomas observáveis dentre os quais estão o desenvolvimento de lesões foliares com fenótipo variado abrangendo colorações desde o verde acinzentado até o castanho escuro ou castanho claro e erupção de urédias mais

comumente encontradas na face abaxial da folha (HOSSAIN *et al*, 2024)(MURITHI *et al*, 2016). Assim, a fim de se avaliar a eficiência de controle conferida pela suspensão de células e pelos metabólitos da linhagem CMAA 894 às mudas de soja selecionadas nos dois experimentos, a severidade da doença foi aferida através da contagem do número de lesões totais no trifólio em seções no centro de cada folíolo (**figura 16**), número de urédias em 10 lesões selecionadas aleatoriamente no trifólio (**figura 17**) e leitura da área total lesionada de cada trifólio utilizando o software ImageJ/Fiji com o plug-in Robust User-friendly Script Tool (RUST) adaptado para a ferrugem em soja (**figura 18**). Da mesma forma, o experimento em casa de vegetação (experimento 2) teve os mesmos parâmetros avaliados para o levantamento da severidade de FAS utilizando somente o inóculo com células de *S. araujoniae* (**figura 19-21**).

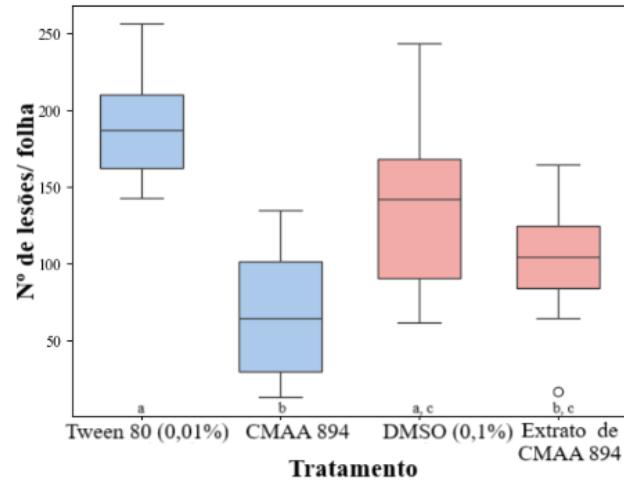
#### 5.7.1) Avaliação do potencial de controle da ferrugem asiática por suspensão de micélio de *S. araujoniae*, CMAA 894, e seus metabólitos secundários em condições de casa de vegetação (experimento 1)

O número de lesões, urédias e a área lesionada são parâmetros que estão diretamente relacionados com a severidade da ferrugem asiática da soja. Portanto, no primeiro experimento realizado com apenas uma aplicação dos tratamentos, foram realizadas pulverizações do extrato bruto (0,5 mg/ mL) e da suspensão de micélio *S. araujoniae* CMAA 894 (OD600 = 0,25) preparadas conforme descrito no item 4.7.1 e 4.7.2, respectivamente, e foi observada uma diminuição da severidade (**tabela 5**) quando comparada com os seus respectivos controles assim demonstrado nas figuras 16, 17 e 18.

Parâmetros ( $\mu$ )	Tween 80 (0,01%)	CMAA 894	Diminuição da severidade (%)	DMSO (0,01%)	Extrato de CMAA 894	Diminuição da severidade (%)
Número de lesões	190,2	68,1	64,1	137,7	114,4	16,9
Número de urédias	31,7	20,3	35,9	31,6	21,1	33,2
Área lesionada	5	1,9	62	5,1	1	80,3

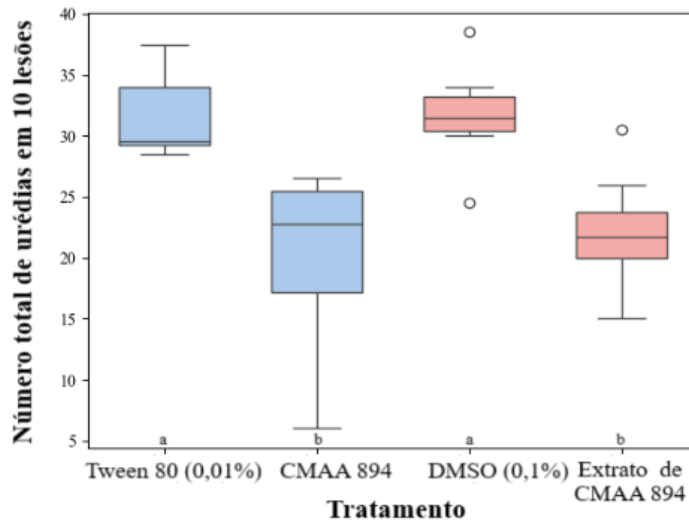
**Tabela 5:** Médias de parâmetros analisados para inferir a severidade de FAS em mudas de soja em casa de vegetação (experimento 1) e seus respectivos percentuais de controle (diminuição da severidade).

- Número de lesões por trifólio



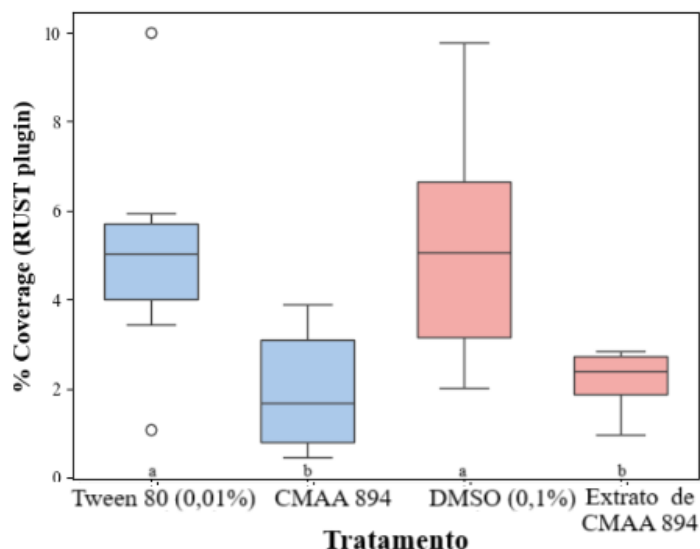
**Figura 16:** Número de lesões em seções circulares no centro de folíolos de soja no experimento em casa de vegetação 1 (uma aplicação dos tratamentos). Cores iguais correspondem ao controle e seu respectivo tratamento. (ANOVA, P-value = 0,0004; F-statistic = 8,21).

- Número de urédias



**Figura 17:** Número de urédias em 10 lesões aleatórias de seções circulares no centro de folíolos de soja no experimento em casa de vegetação 1. Cores iguais correspondem ao controle e seu respectivo tratamento. (ANOVA, P-value = 5,14e-05; F-statistic = 11,41).

- Área lesionada (plugin RUST)

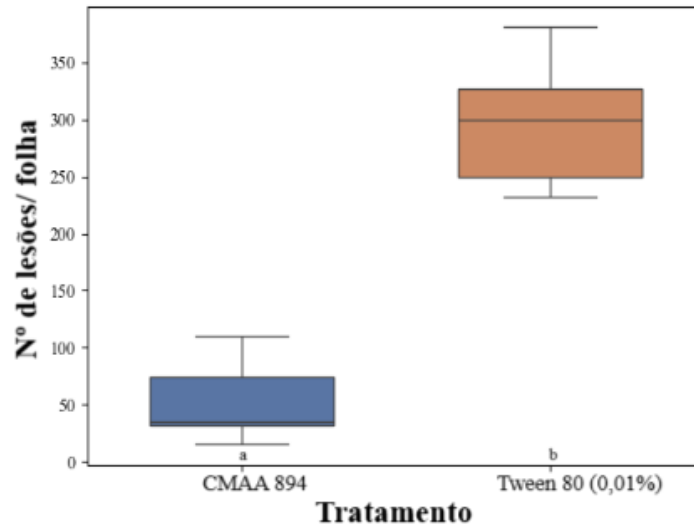


**Figura 18:** Estimativa da área (parâmetro “% Coverage”) do trifólio acometido por FAS utilizando o plugin RUST no experimento em casa de vegetação 1. Cores iguais correspondem ao controle e seu respectivo tratamento. (ANOVA, P-value =0,0028; F-statistic = 6,01).

### 5.7.2) Avaliação do potencial do controle de ferrugem asiática por suspensão de micélio de *S. araujoniae*, CMAA 894, em condições de casa de vegetação (experimento 2)

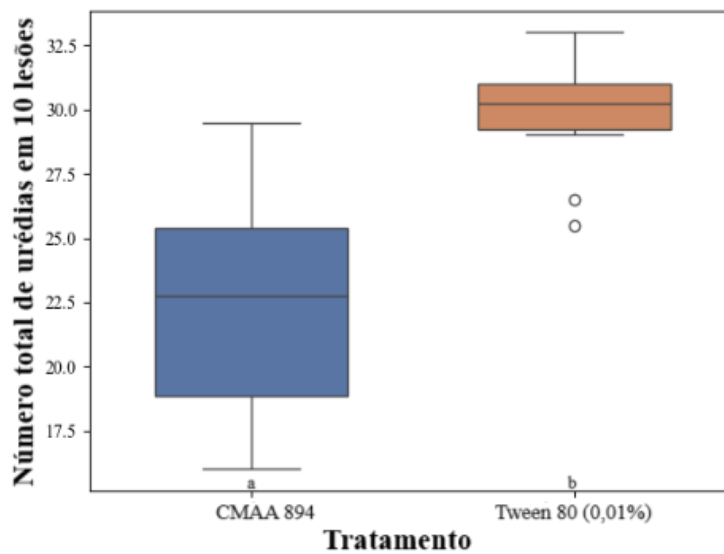
O ótimo desempenho da suspensão de micélio da linhagem de *S. araujoniae* CMAA 894 no controle biológico da ferrugem asiática da soja no primeiro experimento em condições de casa de vegetação (5.6.1), demonstrou a eficiência do tratamento com células do microrganismo sob aquele que utilizou unicamente uma suspensão composta por seus metabólitos secundários. Dessa forma, um segundo experimento foi conduzido utilizando apenas a suspensão de micélio (OD600 = 0,25) com uma aplicação adicional do tratamento. O objetivo desta etapa foi averiguar quaisquer incrementos de controle da doença proporcionados por um aumento da quantidade inicial de inóculo do agente de biocontrole, avaliados sob os mesmos parâmetros do experimento 1, como observado nas figuras 19, 20 e 21.

- Número de lesões por trifólio



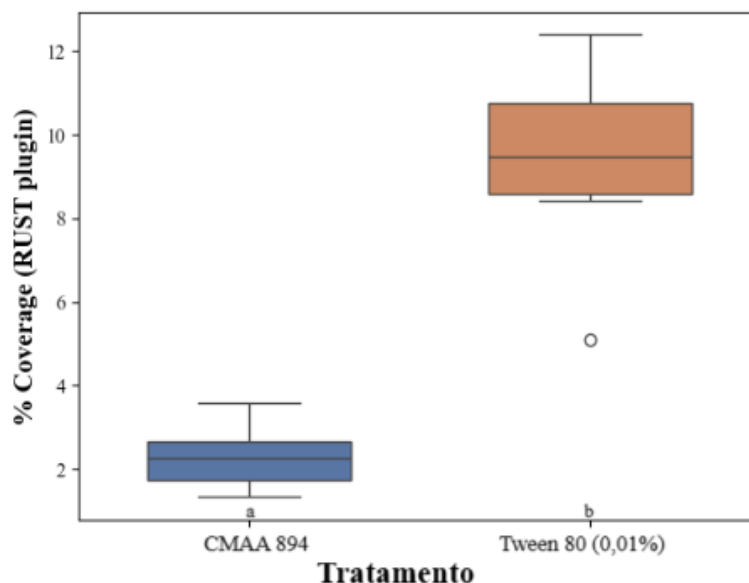
**Figura 19:** Número de lesões em seções circulares no centro de folíolos de soja no experimento em casa de vegetação 2. (T-student test, P-value =1,2479 e-09; T-statistic = -11,832).

- Número de urédias



**Figura 20:** Número de urédias contabilizadas em 10 lesões aleatórias de seções circulares com 2,5 cm de diâmetro do centro de folíolos de soja no experimento em casa de vegetação 2. (T-student test, P-value =0,0002; T-statistic = -4,62).

- Área lesionada (plugin RUST)



**Figura 21:** Estimativa da área (parâmetro “% Coverage”) do trifólio acometida pela ferrugem asiática utilizando o plugin RUST no experimento em casa de vegetação 2. (T-student test, P-value = 1,3063e-08; T-statistic = -10,11).

Dessa forma, a partir da quantificação dos parâmetros: número de lesões totais no trifólio em seções no centro de cada folíolo, número de urédias em 10 lesões selecionadas aleatoriamente no trifólio e leitura da área total lesionada (figuras 19, 20 e 21), pôde-se inferir que a aplicação do inóculo de *S. araujoniae* CMAA 894 promoveu a diminuição da severidade da ferrugem asiática (**tabela 6**) em mudas de soja, ponto corroborado a partir da comparação visual das plantas utilizadas nos experimentos (**Figura 22**).

Parâmetros ( $\mu$ )	Tween 80 (0,01%)	CMAA 894	Diminuição da severidade (%)
Número de lesões	323,3	48	85,1
Número de urédias	31	23,3	24,8
Área lesionada	9,4	2,9	69,1

**Tabela 6:** Médias de parâmetros analisados para inferir a severidade de FAS em mudas de soja em casa de vegetação (experimento 2) e seus respectivos percentuais de controle (diminuição da severidade).



**Figura 22:** Mudanças de soja inoculadas com *P. pachyrhizi*. A planta à esquerda (controle) apresenta sintomas de FAS como folhas amareladas e desfolha precoce, enquanto a planta à direita inoculada com *S. araujoniae* apresenta poucos sintomas da doença e ótimo vigor.

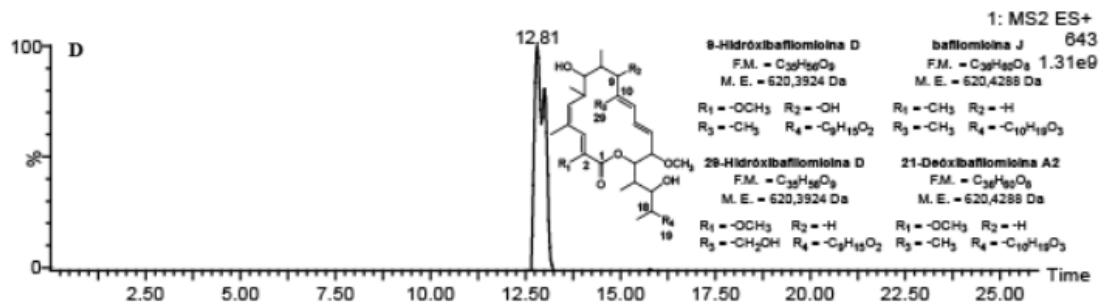
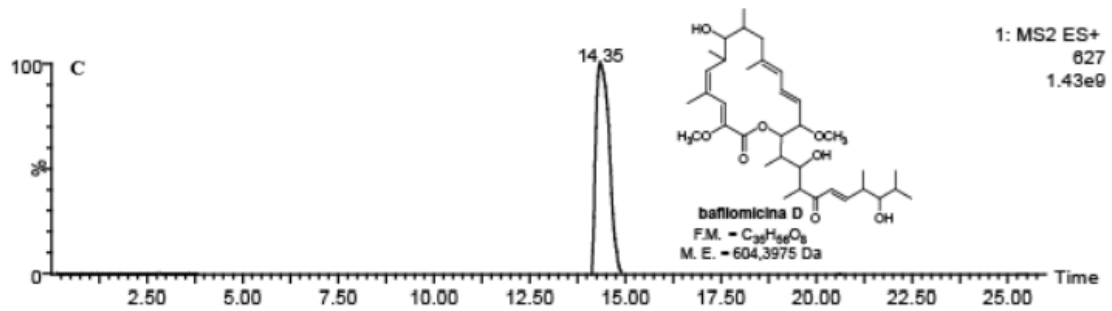
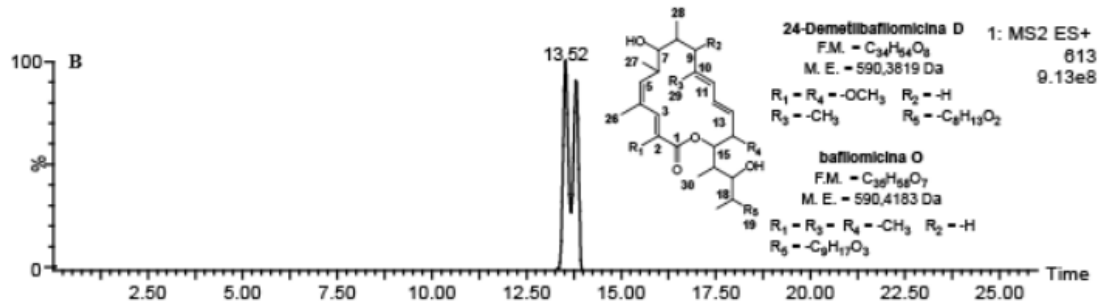
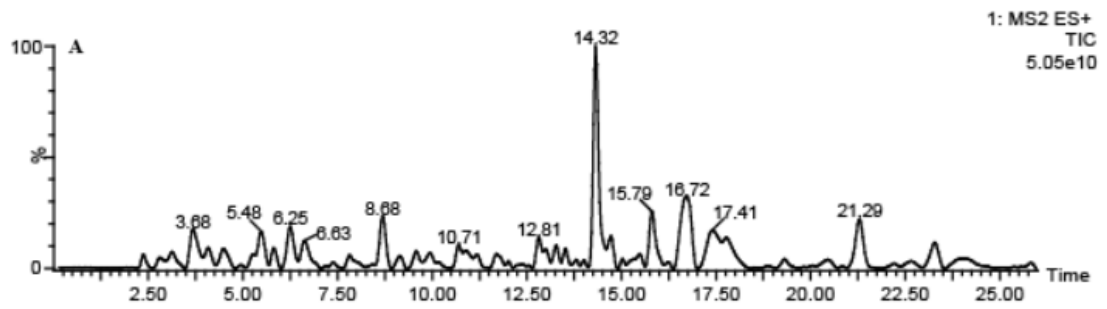
### 5.8.1) Perfil químico dos metabólitos secundários produzidos por *Streptomyces araujoniae* (CMAA 894)

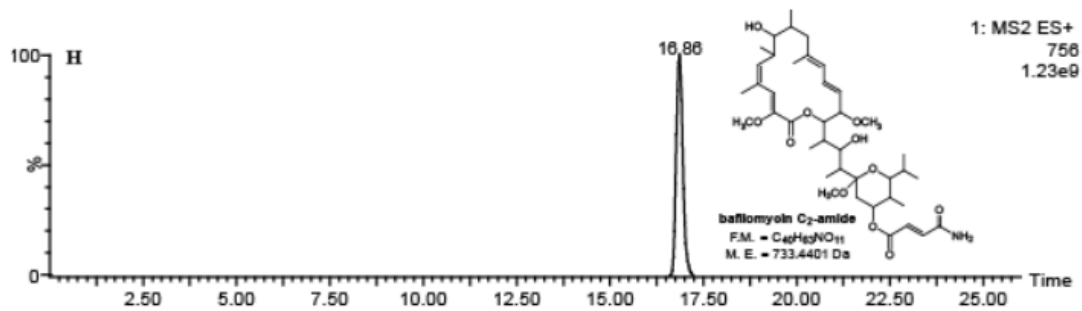
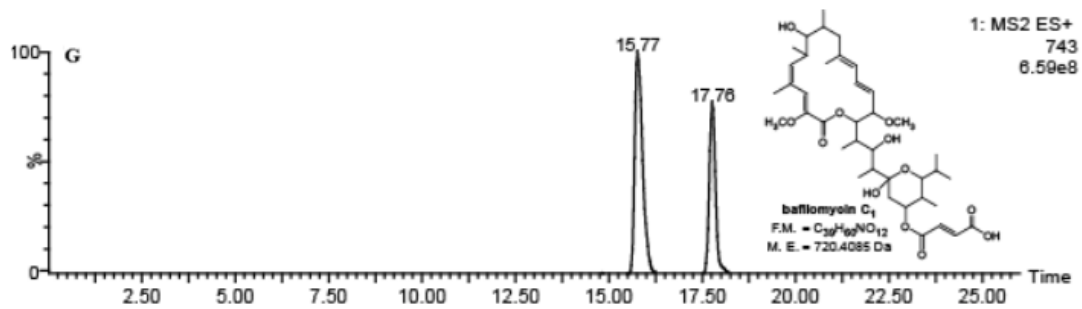
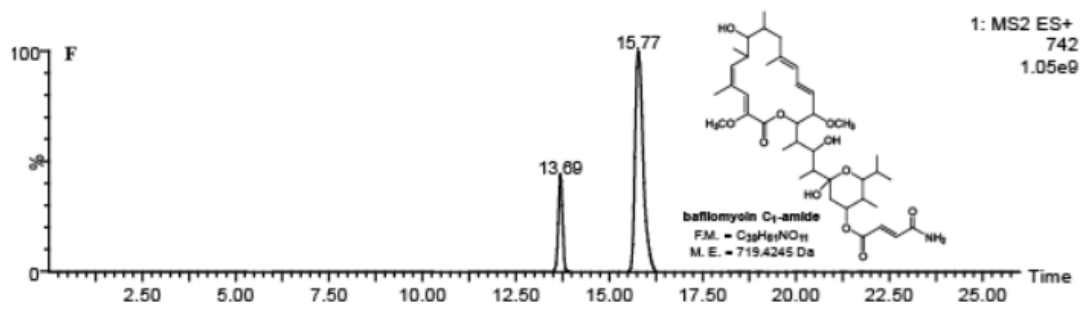
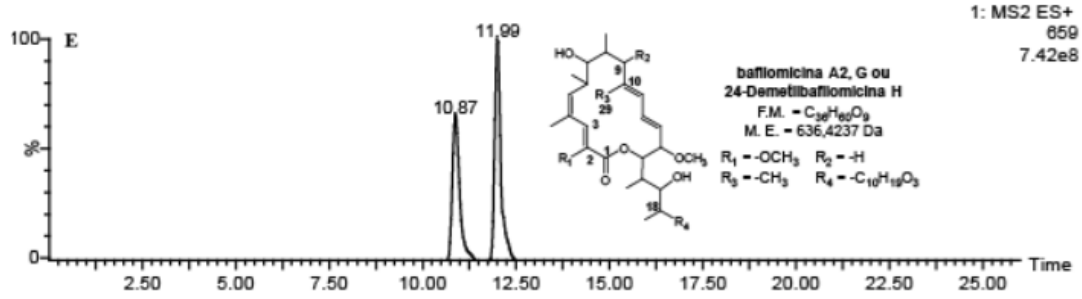
Os ensaios da bioatividade das quatro frações em lâminas escavadas resultaram em ótimas taxas de inibição comparada com o controle (**tabela 7**).

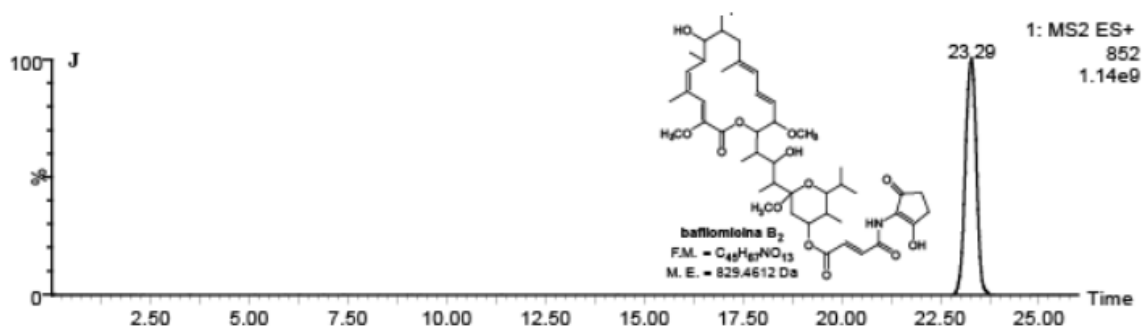
Fração (0,5 mg/ mL)	Taxa de inibição (%)
Hexano	94
Clorofórmio	95
Acetato de etila	90
Água	84

**Tabela 7:** Taxa de inibição de metabólitos de CMAA 894 extraídos com diferentes solventes.

Além disso, com base nos padrões de massa sobre carga (m/z) das frações obtidas a partir de UPLC-MS foi possível realizar uma comparação com informações do banco de dados disponível em CHEMnetBASE: Dictionary of Natural Products resultando na identificação de diversas moléculas da classe das bafilomicinas (**figura 23**).







**Figura 23:** Análise por UPLC-MS do extrato bruto de *S. araujoniae* CMAA 894. A. Cromatograma TIC do extrato bruto de *S. araujoniae* CMAA 894. B-J. Cromatogramas de íons extraídos das bafilomicinas sodiadas  $[M+Na]^+$  com seus respectivos  $m/z$  em modo de análise positivo.

### 5.8.2) Produção de Ácido Indol -Acético por *Streptomyces araujoniae*

O ácido indol-acético (AIA) é um fitohormônio da classe das auxinas com amplo espectro de ação nas plantas, atuando tanto como promotor de crescimento, como também contribuindo para a sua defesa contra fitopatógenos (DUCA *et al*, 2014). Grupos de bactérias, especialmente aquelas Gram positivas como as actinobactérias, possuem numerosos representantes em seu clado que são linhagens conhecidas pela sua capacidade de biossíntese de AIA (GOUDJAL *et al*, 2013). Nesse contexto, o isolado CMAA 894 teve sua capacidade de produção do fitohormônio avaliada.

Assim, com base na curva padrão obtida anteriormente com a fórmula  $y = 0,0126 * x + 0,0477$  e  $R^2 = 0,99$ , foi possível inferir que ao fim de 72 horas, a concentração de AIA no meio de cultura foi de 28,8 ug/ mL, contudo na hora 0 (branco) já era observado uma concentração residual inferior a concentração final do fitormônio, evidenciado a capacidade do isolado, de fato, de produzir AIA.



## 6) DISCUSSÃO

O presente trabalho de pesquisa fez uso de sucessivas etapas de “screening”, realizadas tanto *in vitro* como *in vivo* em condições com ambiente parcialmente controlado, com o intuito de se selecionar um isolado microbiano com um bom desempenho em controlar a ferrugem asiática da soja. A seleção foi composta por três etapas e todos microrganismos selecionados já na primeira triagem foram identificados e tiveram suas outras características exploradas com ênfase em produção de enzimas e outras matrizes de interesse agrônomo, tais como fosfatases, formação de biofilmes etc.

Assim, dentre os 23 isolados com ação antagônica à germinação de uredinósporos de *P. pachyrhizi* selecionados na primeira fase, foi verificada a presença de representantes de grupos de microrganismos já extensivamente utilizados no contexto do controle biológico tais como *Bacillus*, *Trichoderma* e *Streptomyces* (NGALIMAT *et al*, 2021) (SOOD *et al*, 2020) (EBRAHIMI-ZARANDI; SABERI RISEH; TARKKA, 2022). Dessa forma, os isolados bacterianos e fúngicos com os melhores resultados foram, respectivamente, *Streptomyces araujoniae* (CMAA 894) e *Diaporthe sp* (F1NED-F2).

*Diaporthe* é um gênero de fungos com mais de 1200 espécies legitimamente catalogadas segundo o banco de dados Mycobank no ano de 2024 (CROUS *et al*, 2004). Os representantes do gênero são comumente encontrados no ambiente filosférico e estabelecem uma ampla gama de relações ecológicas com os seus hospedeiros, variando desde potenciais fitopatógenos, i.e oportunistas, até microrganismos endofíticos promotores de crescimento de plantas (GOMES *et al*, 2013)(DE ALDANA *et al*, 2021). Nesse sentido, não há relatos na literatura até o presente ano em relação à capacidade representantes do gênero *Diaporthe* em promover a resistência contra a ferrugem asiática. Contudo, sob uma ótica com enfoque no controle biológico, o que se observa é a prevalência de relatos de representantes desse gênero como microrganismos endofíticos generalistas secretores de moléculas bioativas com ação antimicrobiana como visto em Yan *et al* (2018), porém os estudos de proteômica funcional desse grupo de fungos ainda vem sendo explorada como nos trabalhos de Xu *et al* (2021) e Wei *et al* (2023). Por conseguinte, o isolado F1NED-F2 revela-se como um fungo com o potencial como agente de controle biológico ainda a ser investigado, especialmente em relação à sua utilização em outras culturas de importância econômica dada a sua natureza generalista.

Além disso, a partir dos testes *in vivo* realizados com folhas destacadas e tubetes como visto em Li *et al* (2010) foi possível eliminar da triagem linhagens de microrganismos causadores de fitotoxicidade. O principal grupo de microrganismos cujos representantes

específicos foram eliminados por sua ação indesejada nos trifólios de soja foi o dos fungos filamentosos em que sequenciamentos do marcador molecular ITS revelaram que se tratavam de microrganismos fitopatógenos ou com ação de toxicidade já relatadas na literatura como *Fusarium spp*, *Trichoderma spp* e *Talaromyces sp* (XU *et al*, 2023) (ZHAO *et al*, 2019)(ZHAI *et al*, 2016). Nesse contexto, o isolado que apresentou maior fitotoxicidade foi o *Talaromyces domesticus* (F2ASD-F2), cujo gênero de fungos filamentosos possui vários representantes conhecidos por serem produtores de rubratoxinas, micotoxina com ação citotóxica (VOCADLOVA *et al*, 2023) (YILMAZ *et al*, 2014). O isolado F2ASD-F2 durante toda a seleção apresentou alta produção de metabólitos de coloração avermelhada, sugerindo que o mesmo possua a capacidade de produção de rubratoxinas ou outros pigmentos de interesse biotecnológico como azafilona (FRISVAD *et al*, 2013)

O isolado que apresentou notoriamente o melhor desempenho em diminuir a severidade da ferrugem asiática da soja foi o CMAA 894, um actinomiceto identificado como *Streptomyces araujoniae*. Assim, desde sua identificação com o trabalho de Silva *et al* (2013), isolados de *S. araujoniae* têm demonstrado um potencial de controle do desenvolvimento de vários microrganismos fitopatogênicos tais como *Botrytis cinerea* (SILVA *et al*, 2014), *Phytophthora cinnamomi* (SUN *et al*, 2023) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Foc) (ZEYAD *et al*, 2022). A antibiose vem sendo a principal forma de antagonismo relatada pelo qual a actinobacteria selecionada desempenha o seu papel como agente de controle biológico.

Os resultados obtidos com *S. araujoniae* (CMAA 894) nos experimentos com *P. pachyrhizi* no presente estudo vão ao encontro com os dados na literatura. Ao longo do experimentos a inoculação com uma suspensão de *S. araujoniae*, especialmente nos estágios iniciais de triagem, demonstraram um ótimo controle da ferrugem asiática da soja como no ensaio com folhas destacadas em que houve a inibição total do processo de infecção pelo fitopatógeno, evidenciado pela ausência de pontos necróticos, lesões ou surgimento de urédias. Posteriormente, os ensaios em casa de vegetação corroboram com o antagonismo evidenciado promovido por por *S. araujoniae*, a aspensão dos metabólitos (extrato bruto) solubilizados em DMSO a 0,1% na concentração de 0,5 mg/ mL promoveu a diminuição da severidade média da doença comparando com o controle. Entretanto, a eficiência foi ainda maior com a aspensão de células (OD600 = 0,25), tratamento pelo qual todos os parâmetros avaliados “Número de lesões por folha”, “Total de urédias em 10 lesões” e “Área lesionada (%)” demonstraram uma queda de em média 64, 36 e 62% quando comparado com o seu respectivo controle (água destilada esterilizada + Tween80 0,01%). Ademais, em um novo

experimento realizado com duas aplicações do inoculante bacteriano com as mesmas características foi observado um aparente incremento no controle da ferrugem. Os parâmetros citados anteriormente utilizados para avaliar a severidade entre o controle e o tratamento tiveram uma queda média de 85, 24 e 69%. Entretanto, com base no teste Z utilizando os dados do primeiro e do segundo experimento, foi possível concluir que não houve diferença estatística e, portanto, o número de aplicações não culminou em um maior controle da ferrugem asiática da soja. Por fim, os testes demonstraram o ótimo desempenho de *S. araujoniae* em ensaios em casa de vegetação com ambiente parcialmente controlado.

O gênero *Streptomyces* compreende uma diversidade de bactérias com características agronômicas relevantes, dentre as quais se destacam a produção de elicitores que promovem a resistência sistêmica de plantas (YANG *et al*, 2023), antibióticos (DONALD *et al*, 2022) e fitohormônios como o ácido indol-acético (GOUDJAL *et al*, 2013). Nesse contexto, o isolado CMAA 894 teve suas interações ecológicas com o cultivar de soja NEO 610 IPRO e *P. pachyrhizi* exploradas a fim de se elucidar os mecanismos por trás do controle biológico promovido pelo isolado em todos os ensaios realizados.

Assim, por meio de análises com Cromatografia Líquida de Ultra Desempenho acoplada à Espectrometria de Massas (UPLC-MS) foi possível identificar moléculas da classe das bafilomicinas. As bafilomicinas são uma classe de antibióticos com ação antifúngica através da inibição de enzimas como as ATPase vacuolares (V-ATPase), primeiramente identificada em *Streptomyces griseus* sp. sulphurus em 1984 (YU *et al*, 2011) (ZHANG *et al*, 2013). A classe das bafilomicinas, embora tenha sido mais amplamente explorada na área médica, demonstra grande potencial de ser utilizado na agricultura, tendo em vista a sua capacidade de controlar doenças de plantas que acometem culturas agrícolas, incluindo a soja, causadas tanto por fungos do solo como também os que atacam a parte aérea da planta, como já demonstrado em trabalhos de antagonismo *in vitro* com *Rhizoctonia solani* (ZHANG *et al*, 2011) e *Botrytis cinerea* (SILVA *et al*, 2014) e *Sclerotinia sclerotiorum* (LIU *et al*, 2019).

O gênero *Streptomyces* é sabidamente um grupo de microrganismos possuidores do cluster de genes codificadores de bafilomicinas e o seu papel já vem sendo explorado na medicina graças a sua ação antibiótica e citotóxica, potencializando tratamentos quimioterápicos (HWANG *et al*, 2013) (GUO *et al*, 2016). A ação das bafilomicinas se deve principalmente pela sua estrutura com dezesseis anéis de lactona, conformação que permite que a molécula interaja com V-ATPases responsáveis por processos que são essenciais à células como a autofagia e regulação do pH de vesículas lisossomais (LI; LU; SHEN, 2010) (RIVERA\_GIL *et al*, 2012). Atualmente, nenhum estudo realizou uma avaliação do

mecanismo de ação por trás da inibição das células de *P. pachyrhizi* por bafilomicinas, contudo SU *et al* (2018) conduziu estudos para averiguação da ação da molécula sobre células de *Candida albicans*, revelando que a bafilomicina C1 atua diminuindo a expressão de genes relacionados com a biossíntese de ergosterol, componente que por sua vez modula diretamente as V-ATPases através de um mecanismo conservado em fungos e, conseqüentemente, é responsável pela virulência do fungo (ZHANG *et al*, 2010).

O ácido indolacético (AIA) é um fitohormônio da classe das auxinas comumente produzido por rizobactérias, incluindo as do gênero *Streptomyces* (HARIKRISHNAN; SHANMUGAIAH; BALASUBRAMANIAN, 2014) e como demonstrado no presente trabalho, pelo isolado CMAA 894. O fitohormônio AIA desempenha uma série de funções essenciais para o desenvolvimento da planta, especialmente no que concerne ao desenvolvimento de suas raízes laterais (WOODWARD; BARTEL, 2005), e embora os seus efeitos na planta não constituam diretamente uma forma de antibiose no contexto do controle biológico, estudos como de Ghanashyam e Jain (2009), Hoffman *et al* (2013) e Mainali e Nyaupane (2023) sugerem que a promoção de crescimento mediada por microrganismos promotores de crescimento vegetal produtores de AIA esteja correlacionada com o aumento de resistência da planta a estresses bióticos.

A indução de resistência sistêmica (IRS) é um estado fisiológico vegetal pelo qual através de estímulos por elicitores, uma planta é capaz de desenvolver hipersensibilidade (priming) responsável pelo desencadeamento de uma resposta mais rápida e intensa frente à infecção de um fitopatógeno (YU *et al*, 2022). Os estímulos que desencadeiam a IRS incluem os elicitores de origem bacteriana primariamente atuantes na ativação de vias de sinalização do jasmonato, etileno e ácido salicílico culminando na ativação de mecanismos de defesa como a produção de ROS, fenilpropanóides e quitinases e, conseqüentemente, levando a um aumento da imunidade vegetal (VOS; PIETERSE; VAN WEES, 2013) (DE PAULA *et al*, 2021). Nesse sentido, o gênero *Streptomyces* possui diversos representantes produtores de elicitores já explorados como nos trabalhos de Salla; Astarita; Santarém (2016), Dias *et al* (2017), Vergnes *et al* (2020), Sophie *et al* e Han *et al* (2021); conseqüentemente o isolado CMAA 894 demonstra um possível mecanismo ainda a ser explorado em relação ao seu papel como microrganismo indutor da resistência sistêmica vegetal.

Assim, o controle biológico promovido por *S. araujoniae* (CMAA 894) observado ao longo de todos os experimentos pode ser atribuído a uma série de características que atuam conjuntamente para gerar o resultado, ou seja, diminuição da severidade da ferrugem asiática da soja. Dessa maneira, a partir das várias etapas de seleção, pôde-se selecionar um

microrganismo e elucidar os mecanismos que o tornam tão efetivo no controle doença, contudo futuros estudos ainda devem ser feitos em relação ao escalonamento tanto de sua produção em maior escala em biorreatores, como também a sua utilização em campos experimentais e com outros cultivares de soja. Assim, o presente estudo pôde galgar os primeiros passos rumo ao desenvolvimento de um possível inoculante agrícola que possa enfim promover um controle efetivo não só da ferrugem asiática, como também de outras possíveis doenças fúngicas.



## REFERÊNCIAS

- AIME, M. C. *et al.* An overview of the higher level classification of Pucciniomycotina based on combined analyses of nuclear large and small subunit rDNA sequences. **Mycologia**, v. 98, n. 6, p. 896-905, 2006.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- AMICHOT, M. *et al.* Natural products for biocontrol: review of their fate in the environment and impacts on biodiversity. *Environmental Science and Pollution Research*, p. 1-36, 2024.
- ARAÚJO, S. C. Nitrogênio na soja: uma estratégia vitoriosa. *AgroANALYSIS*, v. 42, n. 9, p. 22-23, 2022.
- BEYER, S. F. *et al.* The Arabidopsis non-host defence-associated coumarin scopoletin protects soybean from Asian soybean rust. **The Plant Journal**, v. 99, n. 3, p. 397-413, 2019.
- BLUM, M. M. C. *et al.* *In vitro* effect of substrate, temperature and photoperiod on *Phakopsora pachyrhizi* urediniospore germination and germ tube growth. **Summa Phytopathologica**, v. 41, p. 101-106, 2015.
- BONDE, M. R. *et al.* Evaluation of virulence of *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia* isolates. **Plant Disease**, v. 90, n. 6, p. 708-716, 2006.
- BOTELHO, A. A. A.; MONTEIRO, Antonio Carlos. Sensibilidade de fungos entomopatogênicos a agroquímicos usados no manejo da cana-de-açúcar. **Bragantia**, v. 70, p. 361-369, 2011.
- CROUS, P. W. *et al.* MycoBank: an online initiative to launch mycology into the 21st century. **Studies in mycology**, v. 50, n. 1, p. 19-22, 2004.
- DA COSTA, R. V.; DA SILVA, D. D.; COTA, L. V. Efeito protetor de fungicidas no controle da ferrugem Polissora (*Puccinia polysora*) do milho. 2013.
- DE ALDANA, B. R. V. *et al.* Screening fungal endophytes from a wild grass for growth promotion in tritordeum, an agricultural cereal. **Plant Science**, v. 303, p. 110762, 2021.
- DE PAULA, S. *et al.* Potential of resistance inducers for soybean rust management. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 43, n. sup2, p. S298-S307, 2021.
- Decreto nº 10.375, de 26 de maio de 2020 (2020). Institui o Programa Nacional de Bioinsumos e o Conselho Estratégico do Programa Nacional de Bioinsumos. Disponível em: [https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2019-2022/2020/decreto/d10375.html](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/d10375.html). Acesso em: 7 dez. 2024.
- DJORDJEVIC, D.; WIEDMANN, M.; MCLANDSBOROUGH, L. A. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 6, p. 2950-2958, 2002.

DIAS, M. P. *et al.* Plant growth and resistance promoted by *Streptomyces spp.* in tomato. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 118, p. 479-493, 2017.

DONALD, L. *et al.* *Streptomyces*: Still the biggest producer of new natural secondary metabolites, a current perspective. **Microbiology Research**, v. 13, n. 3, p. 418-465, 2022.

DORIGHELLO, D. V. *et al.* Controlling Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) with *Bacillus spp.* and coffee oil. **Crop Protection**, v. 67, p. 59-65, 2015.

DUCA, D. *et al.* Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 106, p. 85-125, 2014.

EBRAHIMI-ZARANDI, M.; SABERI RISEH, R.; TARKKA, M. T. Actinobacteria as effective biocontrol agents against plant pathogens, an overview on their role in eliciting plant defense. **Microorganisms**, v. 10, n. 9, p. 1739, 2022.

EL-HASAN, A. *et al.* New approaches to manage Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) using *Trichoderma spp.* or their antifungal secondary metabolites. **Metabolites**, v. 12, n. 6, p. 507, 2022.

ESCHER, F.; WILKINSON, J.. A economia política do complexo Soja-Carne Brasil-China. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, v. 57, p. 656-678, 2019.

FAO. The Future of Food and Agriculture—Drivers and Triggers for Transformation. **The Future of Food and Agriculture**, no. 3, 2022.

FIALLOS, F. R. G.; FORCELINI, C. A. Controle comparativo da ferrugem asiática da soja com fungicida triazol ou mistura de triazol+ estrobilurina. **Biosci. j.(Online)**, p. 805-815, 2013.

FESSIA, A. *et al.* In vitro studies of biofilm-forming *Bacillus* strains, biocontrol agents isolated from the maize phyllosphere. **Biofilm**, v. 4, p. 100097, 2022.

FONTES, E. M. G.; VALADARES-INGLIS, M. C. Controle biológico de pragas da agricultura. 2020.

FRANKENBERGER JR, W. T. *et al.* L-Tryptophan transaminase of a bacterium isolated from the rhizosphere of *Festuca octoflora* (Graminae). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 20, n. 3, p. 299-304, 1988.

FREIRE, M. *et al.* Evolutionary history of *Phakopsora pachyrhizi* (the Asian soybean rust) in Brazil based on nucleotide sequences of the internal transcribed spacer region of the nuclear ribosomal DNA. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 920-931, 2008.

FRISVAD, J. C. *et al.* *Talaromyces atroroseus*, a new species efficiently producing industrially relevant red pigments. **PLoS one**, v. 8, n. 12, p. e84102, 2013.

FURTADO, G. Q. *et al.* Influência do estágio fenológico e da idade dos trifólios de soja na infecção de *Phakopsora pachyrhizi*. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, p. 118-122, 2009.

GALLEGO-SÁNCHEZ, L. M. *et al.* Rust: A robust, user-friendly script tool for rapid measurement of rust disease on cereal leaves. **Plants**, v. 9, n. 9, p. 1182, 2020.

GARDES, M.; BRUNS, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular ecology**, v. 2, n. 2, p. 113-118, 1993.

GAUTHIER, N. W. *et al.* Mycoparasitism of *Phakopsora pachyrhizi*, the soybean rust pathogen, by *Simplicillium lanosoniveum*. **Biological Control**, v. 76, p. 87-94, 2014.

GERUM, A. F. A. A.; SANTANA, M. A.; BALDAS, M. A. S.; SANTOS, G. S. Bioinsumos: Tendência de crescimento no Brasil. *Embrapa*, 2023. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/busca-de-noticias/-/noticia/85620702/bioinsumos-tendencia-de-crescimento-no-brasil>. Acesso em: 7 dez. 2024.

GHANASHYAM, C.; JAIN, M. Role of auxin-responsive genes in biotic stress responses. **Plant signaling & behavior**, v. 4, n. 9, p. 846-848, 2009.

GOELLNER, K. *et al.* *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. **Molecular plant pathology**, v. 11, n. 2, p. 169-177, 2010.

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

GOUDJAL, Y. *et al.* Endophytic actinomycetes from spontaneous plants of Algerian Sahara: indole-3-acetic acid production and tomato plants growth promoting activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 1821-1829, 2013.

GUO, W. *et al.* Inhibiting autophagy increases epirubicin's cytotoxicity in breast cancer cells. **Cancer Science**, v. 107, n. 11, p. 1610-1621, 2016.

HALL, T. *et al.* BioEdit: an important software for molecular biology. **GERF Bull Biosci**, v. 2, n. 1, p. 60-61, 2011.

HAN, L. *et al.* A novel glycoprotein from *Streptomyces sp.* triggers early responses of plant defense. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 171, p. 104719, 2021.

HARTMAN, G. L.; MILES, M. R.; FREDERICK, R. D. Breeding for resistance to soybean rust. **Plant disease**, v. 89, n. 6, p. 664-666, 2005.

HELFER, S. Rust fungi and global change. **New phytologist**, v. 201, n. 3, p. 770-780, 2014.

HOSSAIN, M. M. *et al.* Understanding *Phakopsora pachyrhizi* in soybean: comprehensive insights, threats, and interventions from the Asian perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1304205, 2024.

HOFFMAN, M. T. *et al.* Endohyphal bacterium enhances production of indole-3-acetic acid by a foliar fungal endophyte. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e73132, 2013.

HWANG, J. Y. *et al.* Organization and characterization of a biosynthetic gene cluster for bafilomycin from *Streptomyces griseus* DSM 2608. **Amb Express**, v. 3, p. 1-9, 2013.

IGARASHI, W. T. *et al.* Duração e porcentagem de molhamento foliar determinados pelo espaçamento entrelinhas, e influência sobre a ferrugem asiática da soja. **Summa Phytopathologica**, v. 40, p. 123-127, 2014.

JACINTHO, H. Como o Brasil se tornou líder mundial em bioinsumos. *Forbes*, 2022. Disponível em: <https://www.forbes.com>. Acesso em: 7 dez. 2024.

JAMIOŁKOWSKA, A. Natural compounds as elicitors of plant resistance against diseases and new biocontrol strategies. *Agronomy*, v. 10, n. 2, p. 173, 2020.

KHAN, A. *et al.* Credibility assessment of cold adaptive *Pseudomonas jesenni* MP1 and *P. palleroniana* N26 on growth, rhizosphere dynamics, nutrient status, and yield of the kidney bean cultivated in Indian Central Himalaya. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1042053, 2023.

KHURANA, H. *et al.* Genomic insights into the phylogeny of *Bacillus* strains and elucidation of their secondary metabolic potential. **Genomics**, v. 112, n. 5, p. 3191-3200, 2020.

KOSKELLA, B. The phyllosphere. *Current Biology*, v. 30, n. 19, p. R1143-R1146, 2020.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**, 1991.

LANGENBACH, C. *et al.* Fighting Asian soybean rust. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 797, 2016.

LEVEAU, J. H. J.; LINDOW, S. E. Appetite of an epiphyte: quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 6, p. 3446-3453, 2001.

LI, J.; LU, C.; SHEN, Y. Macrolides of the bafilomycin family produced by *Streptomyces sp.* CS. **The Journal of Antibiotics**, v. 63, n. 10, p. 595-599, 2010.

LI, X. *et al.* Effects of light on urediniospore germination, appressorium formation and infection efficiency of *Phakopsora pachyrhizi*, causal agent of soybean rust. **Canadian journal of plant pathology**, v. 32, n. 2, p. 153-161, 2010.

LINDOW, S. E.; BRANDL, M. T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 4, p. 1875-1883, 2003.

LIU, C. *et al.* Community structures and antifungal activity of root-associated endophytic actinobacteria of healthy and diseased soybean. *Microorganisms*, v. 7, n. 8, p. 243, 2019.

LIU, H.; BRETTELL, L. E.; SINGH, B. Linking the phyllosphere microbiome to plant health. **Trends in Plant Science**, v. 25, n. 9, p. 841-844, 2020.

MAINALI, R. P.; NYAUPANE, S. Auxin in Plant Defense Reactions: New Insights and Potential Applications for Resistance Breeding Programmes. **Journal of the Institute of Agriculture and Animal Science**, p. 102-112, 2023.

MARTIN, T. N. *et al.* Microrganismos Promotores de Crescimento, Fixadores de Nitrogênio e Solubilizadores na Cultura da Soja. *Tecnologias Aplicadas para o Manejo Rentável e Eficiente da Cultura da Soja*, p. 69, 2022.

MELO, I. S.; SANHUEZA, R. M. V. Métodos de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos: manual técnico. 1995.

MERCIER, J.; LINDOW, S. E. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. **Applied and environmental Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 369-374, 2000.

MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. Bioinsumos na cultura da soja. Brasília: Embrapa. 550 p. 2022.

MONIER, J.-M.; LINDOW, S. E. Differential survival of solitary and aggregated bacterial cells promotes aggregate formation on leaf surfaces. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 26, p. 15977-15982, 2003.

MORALES, G. *et al.* Environmental and inoculum effects on epidemiology of bacterial spot disease of stone fruits and development of a disease forecasting system. **European Journal of Plant Pathology**, v. 152, p. 635-651, 2018.

MORRIS, C. E.; MONIER, J.; JACQUES, M. A technique to quantify the population size and composition of the biofilm component in communities of bacteria in the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n. 12, p. 4789-4795, 1998.

MUELLER, D. S.; BUCK, J. W. Effects of light, temperature, and leaf wetness duration on daily rust. **Plant Disease**, v. 87, n. 4, p. 442-445, 2003.

MURITHI, H. M. *et al.* Soybean production in eastern and southern Africa and threat of yield loss due to soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi*. **Plant pathology**, v. 65, n. 2, p. 176-188, 2016.

NGALIMAT, M. S. *et al.* A review on the biotechnological applications of the operational group *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microorganisms*, v. 9, n. 3, p. 614, 2021.

NEWTON, A. C.; GRAVOUIL, C.; FOUNTAINE, J. M. Managing the ecology of foliar pathogens: ecological tolerance in crops. *Annals of Applied Biology*, v. 157, n. 3, p. 343-359, 2010.

OLIVEIRA, G. L. T; SCHNEIDER, M. The politics of flexing soybeans: China, Brazil and global agroindustrial restructuring. **The Journal of Peasant Studies**, v. 43, n. 1, p. 167-194, 2016.

POVEDA, J.; EUGUI, D. Combined use of *Trichoderma* and beneficial bacteria (mainly *Bacillus* and *Pseudomonas*): Development of microbial synergistic bio-inoculants in sustainable agriculture. **Biological Control**, v. 176, p. 105100, 2022.

ROSA, C. R. E.; SPEHAR, C. R.; LIU, J. Q. Asian soybean rust resistance: an overview. **Journal of Plant Pathology and Microbiology**, v. 6, n. 307, p. 2, 2015.

RIVERA\_GIL, P. *et al.* pH-sensitive capsules as intracellular optical reporters for monitoring lysosomal pH changes upon stimulation. **Small**, v. 8, n. 6, p. 943-948, 2012.

SALLA, T. D.; ASTARITA, L. V.; SANTARÉM, E. R. Defense responses in plants of *Eucalyptus* elicited by *Streptomyces* and challenged with *Botrytis cinerea*. **Planta**, v. 243, p. 1055-1070, 2016.

SANTOS, S. N. *et al.* Genome sequence of *Streptomyces caatingaensis* CMAA 1322, a new abiotic stress-tolerant actinomycete isolated from dried lake bed sediment in the Brazilian Caatinga biome. **Genome announcements**, v. 3, n. 5, p. 10.1128/genomea.01020-15, 2015.

SIMON, E. D. T. *et al.* Doenças da Cana-de-açúcar. **Embrapa Clima Temperado-Capítulo em livro técnico (INFOTECA-E)**, 2016.

SCHERM, H. *et al.* Quantitative review of fungicide efficacy trials for managing soybean rust in Brazil. **Crop Protection**, v. 28, n. 9, p. 774-782, 2009.

SILVA, L. J. *et al.* *Streptomyces araujoniae* sp. nov.: an actinomycete isolated from a potato tubercle. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 103, p. 1235-1244, 2013.

SILVA, L. J. *et al.* *Streptomyces araujoniae* produces a multiantibiotic complex with ionophoric properties to control *Botrytis cinerea*. **Phytopathology**, v. 104, n. 12, p. 1298-1305, 2014.

SILVA, L. J. *et al.* Actinobacteria from Antarctica as a source for anticancer discovery. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 13870, 2020.

SOOD, M. *et al.* *Trichoderma*: The “secrets” of a multitasking biocontrol agent. **Plants**, v. 9, n. 6, p. 762, 2020.

SOUSA, P. F. C.; ALVES, E.; CASTRO, H. A. Influência da temperatura no desenvolvimento de teliosporos de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de soja. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 227-231, 2006.

STONE, B. W. G.; WEINGARTEN, E. A.; JACKSON, C. R. The role of the phyllosphere microbiome in plant health and function. **Annual plant reviews online**, p. 533-556, 2018.

SU, H. *et al.* Bafilomycin C1 exert antifungal effect through disturbing sterol biosynthesis in *Candida albicans*. **The Journal of Antibiotics**, v. 71, n. 4, p. 467-476, 2018.

SUN, Z. *et al.* Secondary Metabolites from *Streptomyces araujoniae* S-03 Show Biocontrol Potential against *Rhododendron* Root Rot Caused by *Phytophthora cinnamomi*. **Forests**, v. 14, n. 10, p. 2054, 2023.

THIEBAUT, F. *et al.* The impact of non-nodulating diazotrophic bacteria in agriculture: understanding the molecular mechanisms that benefit crops. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 19, p. 11301, 2022.

TWIZEYIMANA, M.; HARTMAN, G. L. Culturing *Phakopsora pachyrhizi* on detached leaves and urediniospore survival at different temperatures and relative humidities. **Plant disease**, v. 94, n. 12, p. 1453-1460, 2010.

USDA. World Agricultural Production. Foreign Agricultural Service. 2024. Disponível em: <[https://ipad.fas.usda.gov/cropexplorer/cropview/commodityView.aspx?cropid=2222000&sel\\_year=2023&rankby=Production](https://ipad.fas.usda.gov/cropexplorer/cropview/commodityView.aspx?cropid=2222000&sel_year=2023&rankby=Production)> Acesso em: 28 set. 2024.

VERGNES, S. *et al.* Phyllosphere colonization by a soil *Streptomyces sp.* promotes plant defense responses against fungal infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 33, n. 2, p. 223-234, 2020.

VIDAL, M. C.; SALDANHA, R.; VERISSIMO, M. A. A. Bioinsumos: o programa nacional e a sua relação com a produção sustentável. Sanidade vegetal: uma estratégia global para eliminar a fome, reduzir a pobreza, proteger o meio ambiente e estimular o desenvolvimento econômico sustentável./Organizadores Diego Medeiros Gindri, Patrícia Almeida Barroso Moreira, Mario Alvaro Aloisio Verissimo.–1. ed. Florianópolis: CIDASC, p. 382-409, 2020.

VIDAL, M. C. *et al.* Bioinsumos: a construção de um Programa Nacional pela Sustentabilidade do Agro Brasileiro. **Economic Analysis of Law Review**, v. 12, n. 3, p. 557-574, 2021.

VOCADLOVA, K. *et al.* Crude Extracts of Talaromyces Strains (Ascomycota) Affect Honey Bee (*Apis mellifera*) Resistance to Chronic Bee Paralysis Virus. **Viruses**, v. 15, n. 2, p. 343, 2023.

VOS, I. A.; PIETERSE, Corné MJ; VAN WEES, Saskia CM. Costs and benefits of hormone-regulated plant defences. **Plant Pathology**, v. 62, p. 43-55, 2013.

WEI, W. *et al.* Potential of secondary metabolites of *Diaporthe* species associated with terrestrial and marine origins. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 4, p. 453, 2023.

WHITE, T. J. *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

WOODWARD, A. W.; BARTEL, B.. Auxin: regulation, action, and interaction. **Annals of botany**, v. 95, n. 5, p. 707-735, 2005.

XU, T. *et al.* Bioactive secondary metabolites of the genus *Diaporthe* and anamorph *Phomopsis* from terrestrial and marine habitats and endophytes: 2010–2019. **Microorganisms**, v. 9, n. 2, p. 217, 2021.

XU, F. *et al.* First Report of *Fusarium falciforme* Causing Root Rot of Soybean (*Glycine max*) in Henan, China. **Plant disease**, v. 107, n. 7, p. 2244, 2023.

YAN, D. *et al.* Antifungal activities of volatile secondary metabolites of four Diaporthe strains isolated from *Catharanthus roseus*. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 2, p. 65, 2018.

YANG, M. *et al.* Induced defense response in soybean to *Sclerotinia sclerotiorum* using wuyiencin from *Streptomyces albulus* CK-15. **Plant Disease**, v. 107, n. 1, p. 107-115, 2023.

YILMAZ, N. *et al.* Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 175-341, 2014.

YIN, W. *et al.* Biofilms: the microbial “protective clothing” in extreme environments. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 14, p. 3423, 2019.

YOON, S. *et al.* Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 67, n. 5, p. 1613, 2017.

YORINORI, J. T.; NUNES JÚNIOR, J.; LAZZAROTTO, J. J. Ferrugem" asiática" da soja no Brasil: evolução, importância econômica e controle. 2004.

YORINORI, J. T.; PAIVA, W. M. Ferrugem da soja: *Phakopsora pachyrhizi* Sydow. 2002.

YU, Z. *et al.* Bafilomycins produced by an endophytic actinomycete *Streptomyces sp.* YIM56209. **The Journal of antibiotics**, v. 64, n. 1, p. 159-162, 2011.

YU, Y. *et al.* Induced systemic resistance for improving plant immunity by beneficial microbes. **Plants**, v. 11, n. 3, p. 386, 2022.

ZEYAD, M. T. *et al.* Bio-priming with a consortium of *Streptomyces araujoniae* strains modulates defense response in chickpea against *Fusarium* wilt. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 998546, 2022.

ZHAI, M. *et al.* The bioactive secondary metabolites from *Talaromyces* species. **Natural products and bioprospecting**, v. 6, p. 1-24, 2016.

ZHANG, Y. *et al.* Requirement for ergosterol in V-ATPase function underlies antifungal activity of azole drugs. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 6, p. e1000939, 2010.

ZHANG, D. *et al.* Bafilomycin K, a new antifungal macrolide from *Streptomyces flavotricini* Y12-26. **The Journal of antibiotics**, v. 64, n. 5, p. 391-393, 2011.

ZHANG, W. *et al.* Characterization of the bafilomycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces lohii*. **Chembiochem: a European journal of chemical biology**, v. 14, n. 3, p. 301, 2013.

ZHAO, D. *et al.* Potent phytotoxic harziane diterpenes from a soft coral-derived strain of the fungus *Trichoderma harzianum* XS-20090075. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 13345, 2019.

ZUCCHI, T. D.; MORAES, L. A. B.; MELO, I. S. *Streptomyces sp.* ASBV-1 reduces aflatoxin accumulation by *Aspergillus parasiticus* in peanut grains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 6, p. 2153-2160, 2008.