

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Heloísa Giacomelli Ribeiro

**Bioprospecção de actinobactéria para controle biológico de fungos
fitopatogênicos para o trigo**

Porto Alegre

2024

Heloísa Giacomelli Ribeiro

**Bioprospecção de actinobactéria para controle biológico de fungos
fitopatogênicos para o trigo**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Prof^(a). Dr^(a). Sueli T. Van Der Sand

Porto Alegre

2024

CIP - Catalogação na Publicação

Giacomelli Ribeiro , Heloísa

Bioprospecção de actinobactéria para controle biológico de fungos fitopatogênicos para o trigo / Heloísa Giacomelli Ribeiro . -- 2024.

118 f.

Orientador: Sueli Teresinha Van Der Sand.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Agentes de controle biológico . 2. Bactérias promotoras de crescimento de plantas. 3. Actinobactérias. 4. Atividade antifúngica. 5. Bioinsumos. I. Van Der Sand, Sueli Teresinha, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Pedro Luís Alves Ribeiro e Josiane da Silva Giacomelli, aos meus familiares e aos meus amigos que me acompanharam durante essa jornada. Só tenho de agradecer o apoio e incentivo de todos.

Aos meus colegas de trabalho e amigos João Paulo Duarte Witusk, Gabriela Simões de Oliveira, Camila Zanfelice Müller e Andréia Monique Lermen, que me ensinaram e contribuíram para a execução deste trabalho.

À minha orientadora, professora doutora Sueli Teresinha Van Der Sand, que me instruiu, trabalhou e se dedicou ativamente no desenvolvimento deste trabalho de pesquisa.

A todos os professores e técnicos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul que contribuíram no meu processo de aprendizagem.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, por oportunizar o desenvolvimento deste trabalho, à Embrapa e a UFPel pela colaboração.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Bioprospecção de actinobactéria para controle biológico de fungos fitopatogênicos para o trigo ¹

Autora: Helóisa Giacomelli Ribeiro

Orientadora: Prof^(a). Dr^(a). Sueli T. Van Der Sand

RESUMO

O uso de actinobactérias como agentes de controle biológico é considerado uma estratégia sustentável de manejo de doenças das plantas. As actinobactérias são microrganismos conhecidos por produzirem diversos metabólitos secundários de interesse biotecnológico que podem atuar como antibióticos e como promotores do crescimento vegetal. Neste estudo exploramos as tendências na aplicação de actinobactérias como agentes de controle biológico de fungos fitopatogênicos e suas características de promoção de crescimento de plantas. Foi possível realizar a bioprospecção de uma actinobactéria, identificada como *Streptomyces avidinii*, que possui atividade antifúngica *in vitro*, produz fitormônios, coloniza sementes e é potencialmente endofítica, o que demonstra o interessante potencial de sua aplicação como uma bactéria promotora de crescimento de plantas multifuncional.

¹ Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (118 p.) janeiro, 2024.

Bioprospecting of actinobacteria for biological control of phytopathogenic fungi for wheat ¹

Author: Helóisa Giacomelli Ribeiro

Advisor: Prof. Dr. Sueli T. Van Der Sand

ABSTRACT

The use of Actinobacteria as biological control agents is considered a sustainable strategy for managing plant diseases. Actinobacteria are known for producing several secondary metabolites of biotechnological interest that can act as antibiotics and plant growth promoters. In this study, we explored the trends in the application of Actinobacteria as biological control agents of phytopathogenic fungi and their plant growth-promoting traits. It was possible to bioprospect an Actinobacteria, identified as *Streptomyces avidinii*, which has antifungal activity *in vitro*, produces phytohormones, colonizes seeds and is potentially endophytic, which demonstrates the interesting potential of its application as a multifunctional plant growth-promoting bacteria.

¹ Doctoral Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (118 p.) January, 2024.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2. 1	Objetivo geral	16
2. 2	Objetivos específicos	16
3	REVISÃO DA LITERATURA	17
3. 1	A cultura do trigo	17
3. 2	O cultivo do trigo	20
3. 3	Doenças do trigo causadas por fungos fitopatogênicos	21
3. 4	O fungo fitopatogênico <i>Bipolaris sorokiniana</i>	24
3. 5	Manejo integrado de doenças fúngicas do trigo	26
3. 6	Mecanismos de ação de drogas antifúngicas	27
3. 7	Fungicidas: o emprego de agrotóxicos para o controle de doenças fúngicas das plantas	31
3. 7. 1	A problemática relacionada à má utilização dos agrotóxicos e a dinâmica de consumo no Brasil	34
3. 8	Aplicação do controle biológico no manejo integrado de fungos fitopatogênicos: foco em bactérias promotoras de crescimento de plantas	36
3. 9	A atividade antibiótica da actinobactéria <i>Streptomyces avidinii</i>	39
3. 10	A bioprospecção de actinobactérias para a produção de bioinsumos	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS	44
4. 1	Microrganismos	44
4. 2	Caracterização taxonômica da actinobactéria LMAF	47
4. 2. 1	Caracterização morfológica e fisiológica	47
4. 2. 2	Identificação fenotípica e genotípica	48
4. 3	Características de promoção de crescimento de plantas	50

4. 3. 1	Ensaio de atividade antifúngica	51
4. 3. 2	Efeitos inibitórios das actinobactérias sobre a germinação dos fungos filamentosos	52
4. 3. 3	Produção de ácido indol acético	53
4. 3. 4	Produção de sideróforos	54
4. 3. 5	Solubilização de fosfato	55
4. 3. 6	Microbiolização de sementes de trigo com a actinobactéria LMAF	56
4. 3. 7	Ensaio de controle biológico <i>in vitro</i>	57
4. 4	Características de inibição dos compostos antifúngicos contidos no extrato bruto produzido pela actinobactéria LMAF	58
4. 4. 1	Produção dos compostos antifúngicos	58
4. 4. 2	Ensaio de atividade antifúngica	59
4. 4. 3	Efeitos inibitórios dos compostos antifúngicos produzidos pela actinobactéria LMAF sobre as células de <i>Candida tropicalis</i>	60
4. 4. 4	Concentração inibitória mínima	60
4. 4. 5	Ensaio de proteção do sorbitol e ligação ao ergosterol exógeno	63
4. 4. 6	Ensaio cometa	63
5	ARTIGOS	67
5. 1	Artigo 1: <i>Exploring the Trends in Actinobacteria as Biological Control Agents of Phytopathogenic Fungi: A (Mini)-Review</i>	68
5. 2	Artigo 2	69
5. 3	Resultados não apresentados na forma de artigos	94
6	DISCUSSÃO GERAL	104
7	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	112
8	REFERÊNCIAS	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Microrganismos	45
Tabela 2	Zona de inibição e porcentagem de inibição do crescimento radial do micélio fúngico	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ranking dos países produtores de trigo no ano de 2021	18
Figura 2	Fases do crescimento e desenvolvimento do trigo	19
Figura 3	Sintomas das doenças do trigo causadas por fungos fitopatogênicos	22
Figura 4	Micro morfologia dos conídios e das hifas do fungo <i>Bipolaris sorokiniana</i>	24
Figura 5	Doenças do trigo causadas por <i>Bipolaris sorokiniana</i>	25
Figura 6	Mecanismos de ação dos compostos antifúngicos na célula fúngica	31
Figura 7	Mecanismos de ação das bactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPBs)	38
Figura 8	Micro morfologia dos esporos e das hifas de actinobactérias do gênero <i>Streptomyces</i>	39
Figura 9	Atividade antifúngica de diferentes isolados de actinobactérias	40
Figura 10	Morfologia das colônias das actinobactérias	46
Figura 11	Morfologia das colônias dos fungos patogênicos	47
Figura 12	Metodologia do ensaio de atividade antifúngica	51
Figura 13	Soluções de calibração com diferentes concentrações de ácido indol acético	53
Figura 14	Ilustração de resultados do ensaio de produção de sideróforos	54
Figura 15	Ilustração de resultado positivo para o ensaio de solubilização de fosfato	55
Figura 16	Metodologia do ensaio de microdiluição em caldo	62
Figura 17	Ilustração de resultados para o ensaio cometa	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
MIP	Manejo integrado de pragas
BCA	<i>Biological control agent</i>
PGPB	<i>Plant growth promoting bacteria</i>
LMA	Laboratório de Microbiologia Aplicada
CNPT	Centro Nacional de Pesquisa do Trigo
ATCC	<i>American type culture collection</i>
ISP	<i>International Streptomyces project</i>
ISP ₂	Ágar extrato de levedura-extrato de malte
AC	Amido caseína
ACA	Ágar amido caseína
BD	Batata dextrose
BDA	Ágar batata dextrose
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry</i>
DT	Transferência direta
PCR	Reação em cadeia da polimerase
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
NCBI	<i>National center for biotechnology information</i>
PIRG	<i>Inhibition percentage of the radial growth</i>
CAS	Cromo Azurol-S
CTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
GY	<i>Glucose yeast medium</i>
CSLI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>

CIM	Concentração inibitória mínima
LATOX	Laboratório de pesquisa em Toxicologia Ambiental, Experimental, Ocupacional e Nanotoxicologia
LMW	<i>Low molecular weight</i>

1. INTRODUÇÃO

O trigo é um cereal utilizado como base para a produção de diversos alimentos pois possui alto valor nutricional para a dieta humana, o que o torna uma das culturas mais importantes ao redor do mundo. Como muitas outras culturas, o trigo é suscetível ao ataque de patógenos fúngicos que causam doenças nas plantas e, conseqüentemente, perdas no rendimento da produção. Estima-se que 90% do trigo plantado mundialmente corre o risco de ser acometido por fungos patogênicos que causam doenças conhecidas como manchas e ferrugem e que as perdas causadas por eles podem chegar a 62 milhões de toneladas por ano.

Uma das principais estratégias de manejo de doenças das plantas é a aplicação de agrotóxicos. Agrotóxicos são substâncias químicas tóxicas que devem ser utilizadas de forma controlada como parte de um programa de manejo integrado, tendo em vista que causam poluição ambiental, danos à biodiversidade e são nocivos à saúde dos seres humanos e outros animais.

O controle biológico é uma estratégia agroecológica que pode ser utilizada como parte do manejo integrado de doenças nas lavouras. A aplicação do controle biológico como estratégia de manejo visa reduzir o uso excessivo de agrotóxicos e induzir o uso de organismos ou metabólitos naturais que possuam atividade antagônica contra as pragas e os patógenos vegetais. Neste contexto, as actinobactérias são estudadas como potenciais agentes de controle biológico.

As actinobactérias são conhecidas por produzirem diversos metabólitos secundários de interesse biotecnológico, entre eles compostos antibióticos. Seu forte potencial como agentes promotores de crescimento de plantas não é estimado apenas pela sua capacidade antagônica, mas também pela sua influência positiva sobre o crescimento vegetal. Esses atributos caracterizam-nas como uma

alternativa ecologicamente interessante à prevenção e controle de doenças das plantas.

Sendo assim, este trabalho tem como principal objetivo realizar a bioprospecção de uma actinobactéria com potencial antagônico contra fungos fitopatogênicos para o trigo, que possa ser utilizada como agente de controle biológico.

2. OBJETIVOS

2. 1 Objetivo Geral

Realizar a bioprospecção de uma actinobactéria com potencial antagonico contra fungos fitopatogênicos para o trigo, que possa ser utilizada como agente de controle biológico.

2. 2 Objetivos Específicos

2. 2. 1 Realizar a bioprospecção de uma actinobactéria que possa ser utilizada como agente de controle biológico contra *Bipolaris sorokiniana*.

2. 2. 2 Caracterizar e identificar a actinobactéria.

2. 2. 3 Determinar possíveis características de promoção de crescimento de plantas da actinobactéria.

2. 2. 4 Determinar os mecanismos de ação antifúngica dos metabólitos secundários produzidos pela actinobactéria.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3. 1 A cultura do trigo

O trigo é reconhecido como um cereal de grande importância, sendo uma fonte valiosa de energia. O trigo nos provê carboidratos complexos, consumidos gradualmente pelo nosso organismo, fornece lipídeos, que constituem a estrutura das nossas membranas celulares, fibras, proteínas, vitaminas, antioxidantes e outros nutrientes que são importantes para a manutenção de uma vida saudável (DE SOUSA *et al.*, 2021). Em razão disso, o trigo é utilizado como base para a produção de diversos alimentos como pães, massas e biscoitos, sendo o segundo alimento mais consumido no mundo. No Brasil, estima-se que cada pessoa consuma em média 60 kg de trigo por ano (VEKIC; RESENDE, 2021).

Todos os anos a produção mundial de trigo atinge a quantia de milhões de toneladas. No levantamento dos países produtores de trigo, realizado pela Organização das Nações Unidas Para Alimentação e Agricultura (FAO) em 2021, destaca-se em primeiro lugar a China, responsável por produzir 136.952.000 toneladas de trigo, em segundo lugar a Índia, que produziu 109.590.00 toneladas e em terceiro lugar a Rússia que produziu um total de 76.057.258 toneladas. O Brasil ocupou a vigésima posição, com uma produção de 7.874.525 toneladas, atrás da Argentina, que ocupou a décima segunda posição, com uma produção de 17.644.277 toneladas de trigo. A figura 1 mostra o ranqueamento dos primeiros vinte países produtores de trigo em 2021, de acordo com a [FAOSTAT](#).

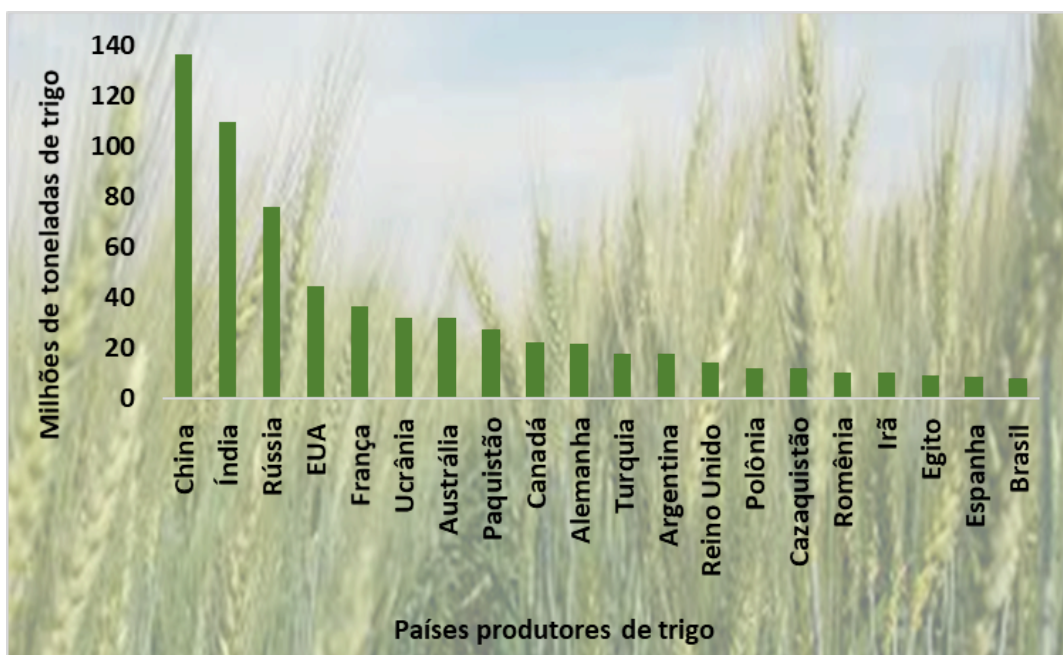


Figura 1. Ranking dos países produtores de trigo no ano de 2021. Imagem criada pela autora.

3. 2 O cultivo do trigo

O ciclo de cultivo do trigo pode ser dividido, resumidamente, em quatro fases: vegetativa, reprodutiva, enchimento dos grãos e maturação (Figura 2). A fase vegetativa, que inicia na sementeira, é caracterizada pela diferenciação dos primórdios foliares. Esta fase compreende a emergência, o afilamento e o alongamento da planta e encerra-se na iniciação floral, que marca o começo da fase reprodutiva. Na fase reprodutiva ocorre a formação das espiguetas (espigamento) e a diferenciação das flores que surgem entre elas. A fase reprodutiva estende-se até a floração, ou antese, onde ocorre a autofecundação através da extrusão das anteras (estruturas do trigo onde se formam os grãos de pólen). A fase reprodutiva termina com o início da fase de enchimento dos grãos, a qual se estende até a maturação, quando os grãos atingem o acúmulo máximo de matéria seca e podem ser colhidos (PIRES *et al.*, 2014; SCHEEREN; DE CASTRO; CAEIRÃO, 2015).

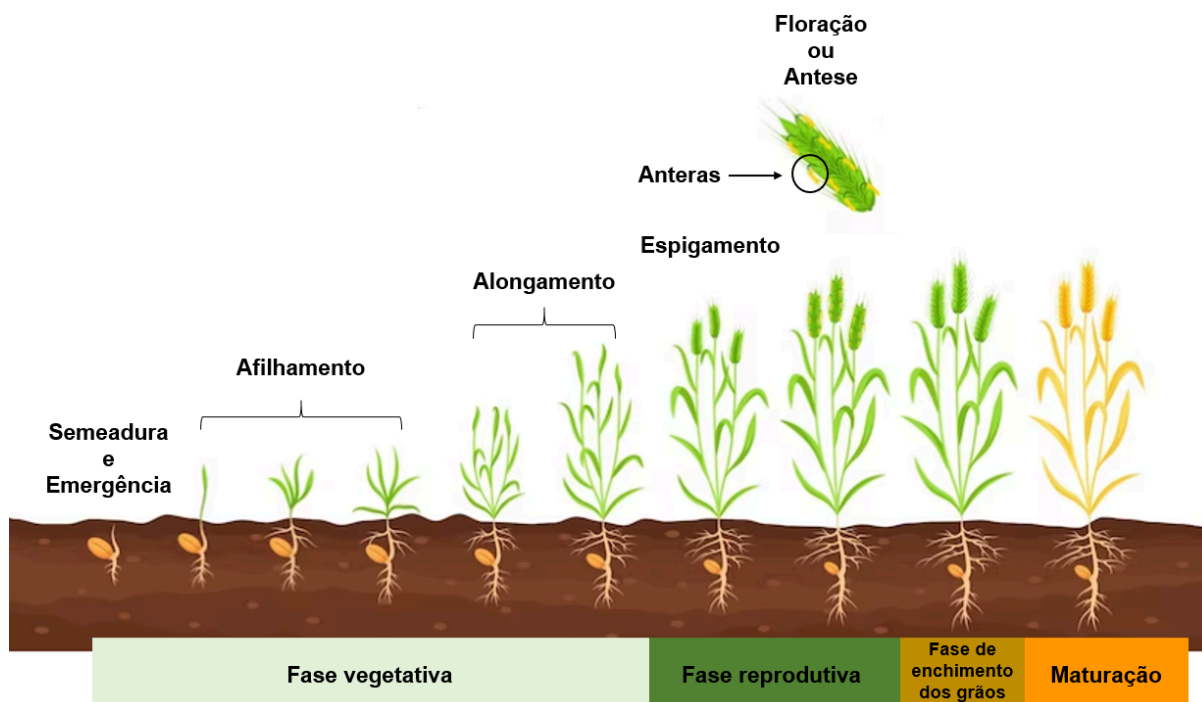


Figura 2. Fases do crescimento e desenvolvimento do trigo. Imagem adaptada pela autora a partir do banco de imagens [Freepik](#)

O trigo pode ser classificado de acordo com a época de sementeira. Em escala global, aproximadamente 80% do trigo plantado é classificado como trigo de inverno. O trigo de inverno é semeado no decorrer do outono, pois as mudas desse tipo de trigo necessitam de temperaturas entre 0°C e 5°C durante um período da fase vegetativa para se desenvolverem. O trigo de primavera, tradicionalmente colhido em regiões do sul da África e do norte da Ásia, é semeado durante a primavera e colhido no final do verão ou início do outono (DE SOUSA *et al.*, 2021).

Dentre as variedades atualmente cultivadas, o trigo para panificação (*Triticum aestivum* L.) e o trigo duro, ou trigo de sêmola, (*Triticum durum* Desf.) representam respectivamente 95% e 5% da produção mundial (DE SOUSA *et al.*, 2021). Segundo os mesmos autores, para alcançar alto teor de proteínas no grão e manter o alto rendimento da produção, estas variedades de trigo requerem a aplicação de uma grande quantidade de fertilizantes químicos e agrotóxicos.

A aplicação de fertilizantes tem como finalidade elevar o teor de nutrientes a quantidades suficientes que propiciem ao trigo expressar seu potencial de rendimento. A adubação do solo é realizada principalmente na semeadura do trigo, porém quando necessário, os fertilizantes podem ser aplicados em outras etapas da fase vegetativa do crescimento. Os fertilizantes químicos tipicamente utilizados no cultivo do trigo podem conter em sua composição os macronutrientes nitrogênio, fósforo e potássio (representados pela sigla NPK) e os micronutrientes zinco, cobre, boro, manganês, cloro, ferro e molibdênio. Também são utilizados na adubação do trigo o enxofre e o gesso agrícola (fonte de cálcio). No caso dos fertilizantes orgânicos, a sua composição é intrínseca à fonte de matéria orgânica (PIRES *et al.*, 2014).

Os agrotóxicos são produtos químicos empregados para o controle de pragas e doenças em diversas culturas agrícolas (TOSTADO; BOLLMOHR, 2022). No cultivo do trigo, os agrotóxicos podem ser empregados em diversas etapas: são aplicados nas sementes antes do plantio, no solo pouco antes da semeadura, após a emergência das plantas, na fase vegetativa do crescimento e nos grãos destinados ao armazenamento após a colheita. Além disso, para promover a uniformidade na maturação dos grãos em lavouras desuniformes, recorre-se à aplicação de herbicidas dessecantes na fase de pré-colheita (VEKIC; RESENDE, 2021).

O trigo é considerado uma cultura de alto rendimento, adaptável a diferentes condições climáticas (DE SOUSA *et al.*, 2021). As condições climáticas prevalentes durante o cultivo do trigo são fatores que influenciam diretamente o rendimento e a qualidade dos grãos. Em regiões subtropicais, a ocorrência de geadas e déficit hídrico durante o florescimento do trigo, assim como, a ocorrência

de excesso de chuvas após a maturação fisiológica e período de colheita representam riscos ao rendimento e à qualidade dos grãos. Em regiões tropicais, a umidade e a temperatura elevada do ar durante o período de florescimento e enchimento dos grãos também representam riscos (PIRES *et al.*, 2014).

Além da influência direta sobre o rendimento e a qualidade dos grãos, as condições climáticas durante o crescimento e desenvolvimento das plantas também influenciam a proliferação de patógenos (RÓŻEWICZ; WYZIŃSKA; GRABIŃSKI, 2021). Regiões quentes e úmidas são ideais para o desenvolvimento de fungos fitopatogênicos. Esses fungos atacam as plantas causando alterações no metabolismo vegetal que levam ao surgimento de doenças (MANAMGODA *et al.*, 2014).

Nas lavouras, as doenças fúngicas limitam o crescimento e desenvolvimento das plantas, deterioram a qualidade nutricional dos grãos e reduzem o rendimento da produção (RÓŻEWICZ; WYZIŃSKA; GRABIŃSKI, 2021). Estudos indicam que os fungos fitopatogênicos são responsáveis por 70 a 80% das doenças agrícolas em todo o mundo (DJEMOUAI *et al.*, 2023). Como resultado, estima-se que as doenças causadas por esses patógenos reduzem o rendimento das produção agrícolas entre 15% e 20%, podendo chegar a até 60% em situações extremas (RÓŻEWICZ; WYZIŃSKA; GRABIŃSKI, 2021).

3. 3 Doenças do trigo causadas por fungos fitopatogênicos

Os fungos fitopatogênicos são capazes de atacar tanto a parte aérea quanto o sistema radicular das plantas de trigo. Doenças como ferrugem da folha (causada por *Puccinia triticina*), oídio (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*), mancha da gluma (*Phaeosphaeria nodorum* - anamorfo *Stagonospora nodorum*), mancha

amarela (*Pyrenophora tritici-repentis* - anamorfo *Drechslera tritici-repentis*) e mancha marrom (*Cochliobolus sativus* - anamorfo *Bipolaris sorokiniana*) (Figura 3a) resultam na diminuição da área fotossintética da planta. A giberela (*Gibberella zeae* - anamorfo *Fusarium graminearum*) e a brusone (*Magnaporthe grisea* - anamorfo *Pyricularia grisea*) também afetam a parte aérea do trigo, causando injúrias as espigas (Figura 3b). Já a podridão comum da raiz (*Cochliobolus sativus* - anamorfo *Bipolaris sorokiniana*) e o mal-do-pé (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) são doenças que acometem o sistema radicular do trigo, afetando a capacidade de absorção de nutrientes pela planta (Figura 3c) (PIRES *et al.*, 2014).

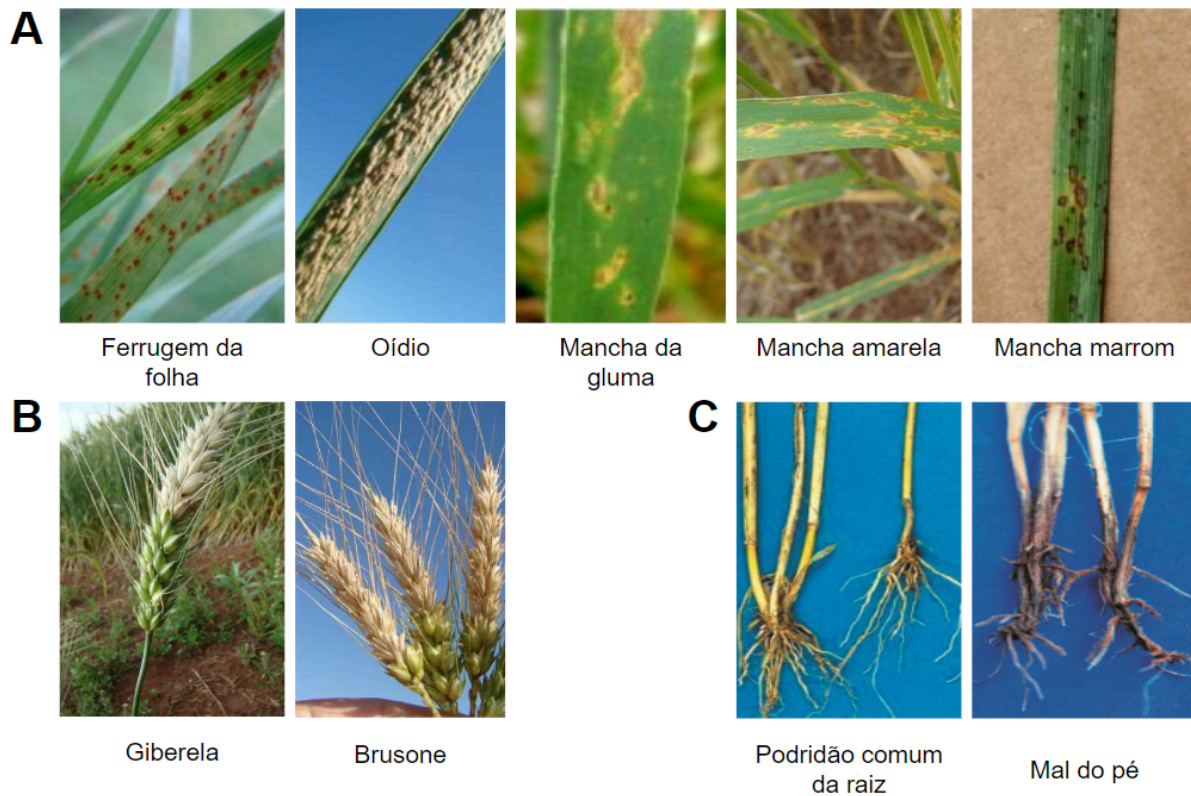


Figura 3. Sintomas das doenças do trigo causadas por fungos fitopatogênicos. Fotos: Flávio Martins Santana, João Leodato Maciel e José Maurício da Cunha Fernandes.

Simón; Struik e Börner (2023) destacam que, dentre as 31 pragas e patógenos associados ao trigo, as doenças fúngicas, como giberela, oídio, ferrugens

e manchas, acarretam as perdas mais significativas. Em um estudo recente, Chai *et al.* (2022) forneceram uma estimativa sobre a vulnerabilidade global do trigo, revelando que cerca de 90% das áreas cultivadas com este cereal estão suscetíveis a um grupo de fungos patogênicos composto por *Puccinia triticina*, *Puccinia striiformis*, *Puccinia graminis*, *Zymoseptoria tritici* e *Fusarium graminearum*. Os autores apontam que as perdas na produção de trigo atribuídas às doenças causadas por esse grupo de patógenos atingem a marca de 62 milhões de toneladas anualmente.

A disseminação de fungos fitopatogênicos nas plantações também pode levar à contaminação do trigo por micotoxinas (metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos toxigênicos). A exposição a essas micotoxinas pode afetar a saúde humana e animal, aumentando o risco de desenvolvimento de síndromes toxicológicas agudas ou crônicas (TIBOLA; FERNANDES, 2020). Além disso, as micotoxinas também têm efeitos fitotóxicos, podendo causar a morte celular, atrofia no crescimento, clorose, interrupção da mitose e alterações no metabolismo protéico vegetal (RÓŻEWICZ; WYZIŃSKA; GRABIŃSKI, 2021).

Entre os fungos fitopatogênicos conhecidos por produzir micotoxinas nas plantações de trigo estão: *Fusarium graminearum* (produtor de micotoxinas como nivalenol e desoxinivalenol - DON), *Fusarium moniliforme* (fumonisina), *Aspergillus flavus* (aflatoxina) e *Penicillium verrucosum* (ocratoxina). No cultivo de trigo, a micotoxina DON é especialmente relevante globalmente devido à sua ampla distribuição em regiões de cultivo de trigo e aos altos níveis encontrados nos grãos (TIBOLA; FERNANDES, 2020).

3. 4 O fungo fitopatogênico *Bipolaris sorokiniana*

Aproximadamente 8 mil espécies de fungos e oomicetos que habitam o solo estão associados a doenças agrícolas (RÓŻEWICZ; WYZIŃSKA; GRABIŃSKI, 2021). Entre eles, destaca-se o fungo *Bipolaris sorokiniana* (Figura 4), que possui grande relevância para o cultivo de diversas culturas, dentre elas o trigo (MANAMGODA *et al.*, 2014).

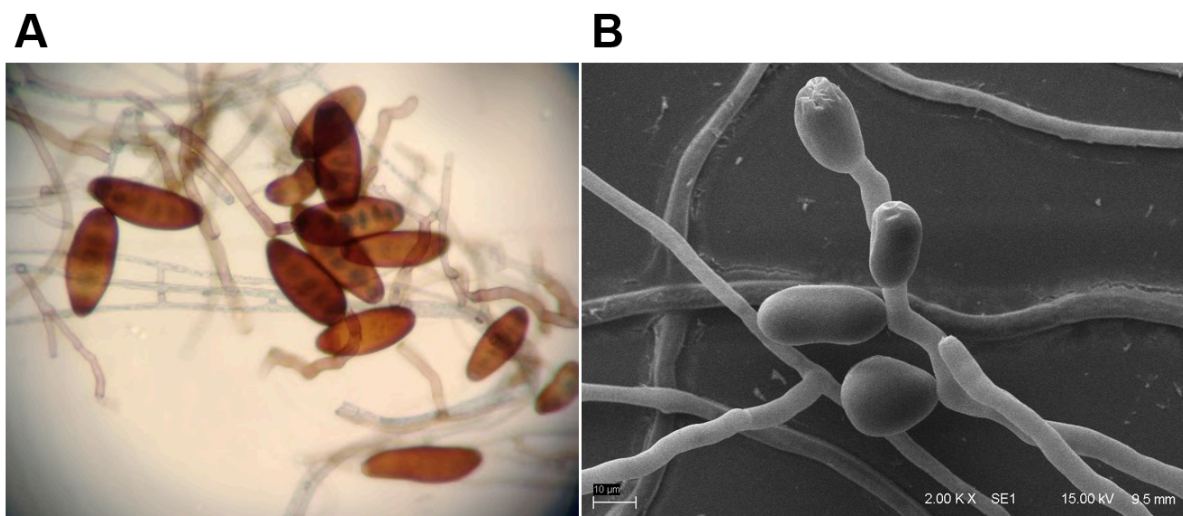


Figura 4. Micro morfologia dos conídios e das hifas do fungo *Bipolaris sorokiniana*. (A) microscopia óptica e (B) microscopia eletrônica de varredura. Fotos da autora.

Conhecido cientificamente como *Bipolaris sorokiniana* (Sorokin) Shoemaker, Canad. J. Bot. 37: 884. 1959 [telemorfo *Cochliobolus sativus* (S. Ito & Kurib.) Drechsler ex Dastur, Indian J. Agric. Res. 12: 733. 1942]; esse fitopatógeno é de ocorrência frequente em sementes e tem a capacidade de persistir em restos culturais, sendo capaz de infectar diversas espécies de cereais e gramíneas. Caracterizado por uma notável diversidade genética dentro de uma mesma população patogênica, *Bipolaris sorokiniana* consegue contornar os mecanismos de resistência vegetal, resultando em infecções bem-sucedidas em seus hospedeiros (MANAMGODA *et al.*, 2014).

Bipolaris sorokiniana é o agente etiológico responsável por causar a helmintosporiose ou mancha marrom nas partes aéreas do trigo, assim como a podridão comum da raiz (MONTEIRO; BORBA; VAN DER SAND, 2017). A mancha marrom (Figura 5A) é caracterizada pelo surgimento de manchas elípticas escuras em folhas, bainhas e colmos, onde é possível observar a esporulação do fungo (Figura 5B). A podridão comum da raiz (Figura 5C) é caracterizada pelo surgimento de lesões necróticas nas raízes que podem causar a murcha e a morte da planta (PIRES *et al.*, 2014). Sementes contaminadas por *Bipolaris sorokiniana* exibem como indicador da infecção pontos pretos na região do embrião. A doença resulta na diminuição do rendimento dos grãos, na redução da germinação das sementes e no comprometimento do crescimento das plântulas de trigo (Figura 5D) (SIMÓN; STRUIK; BÖRNER, 2023). Dependendo da gravidade do ataque, a infecção por *Bipolaris sorokiniana* pode resultar em perdas totais na produção (ALLALI *et al.*, 2019).



Figura 5. Doenças do trigo causadas por *Bipolaris sorokiniana*. (A) mancha marrom (foto: Elizabeth Bush), (B) podridão comum da raiz (foto: Mary Burrows) e (C) conídios e conidióforos de *B. sorokiniana* em lâmina foliar (foto: Elizabeth Bush). Imagens retiradas do banco de imagens [Forestry Images](#). (D) pontos pretos nas sementes de trigo causados pela infecção com *B. sorokiniana* (foto da autora).

3. 5 Manejo integrado de doenças fúngicas do trigo

Para viabilizar uma produção de trigo competitiva e sustentável, é imprescindível compreender os aspectos relacionados ao crescimento e desenvolvimento da planta, as características do solo onde será cultivado e as práticas de manejo adequadas ao cultivo. Entre estas práticas, incluem-se: a seleção da cultivar mais apropriada para a região e época de plantio; o cuidado para garantir que as plantas de trigo tenham espaço suficiente para crescer e que sejam adequadamente nutridas; e a vigilância constante para identificar e controlar o surgimento de pragas e doenças que possam afetar a cultura do trigo (PIRES *et al.*, 2014).

O manejo integrado de doenças nas lavouras demanda a adoção de um conjunto amplo de medidas, que abrangem a preparação adequada do solo, a utilização de sementes saudáveis e o cultivo de variedades geneticamente resistentes aos patógenos (PIRES *et al.*, 2014; RÓŻEWICZ; WYZIŃSKA; GRABIŃSKI, 2021). Segundo Rózewicz; Wyzińska e Grabiński (2021), a gestão apropriada dos fertilizantes, com especial atenção aos compostos nitrogenados, é outro importante aspecto a ser considerado, uma vez que o desequilíbrio nas proporções pode possibilitar a instalação de agentes patogênicos. Além disso, os sistemas de previsão de epidemias, que utilizam como base dados de disseminação de doenças,

emergem como uma valiosa ferramenta no desenvolvimento de estratégias mais eficazes para o controle dos patógenos (CHAI *et al.*, 2022; SIMÓN; STRUIK; BÖRNER, 2023).

Em relação às doenças das plantas causadas por fungos patogênicos, é importante ressaltar que uma das principais práticas de manejo é a aplicação de agrotóxicos que pertencem a classe dos fungicidas (TOSTADO; BOLLMOHR, 2022). Os fungicidas são indicados para o tratamento de todas as doenças fúngicas do trigo. O tratamento com fungicidas pode ser realizado preventivamente, através da aplicação de fungicidas protetores, ou no surgimento dos primeiros sintomas da infecção. Entre os fungicidas amplamente reconhecidos para o controle das principais doenças fúngicas do trigo, destacam-se os triazóis, tais como ciproconazole, epoxiconazole, tebuconazole e triadimenol (PIRES *et al.*, 2014)

3. 6 Mecanismos de ação de drogas antifúngicas

Os antifúngicos são moléculas empregadas no tratamento de infecções causadas por fungos patogênicos, tendo como principais alvos de ação a parede celular e a membrana plasmática dessas células (ODDS; BROWN; GOW, 2003). A parede celular dos fungos é constituída por diversos polissacarídeos, tais como quitinas, β -D-glucanas e mananas, além de glicoproteínas. A membrana plasmática fúngica é composta por uma bicamada lipídica na qual as proteínas estão intercaladas com moléculas de ergosterol (ODDS; BROWN; GOW, 2003; SZYMAŃSKI *et al.*, 2022). Assim, as diferentes classes de antifúngicos e seus respectivos mecanismos de ação sobre a célula fúngica serão detalhados a seguir, como ilustrado na Figura 6.

- Griseofulvina: é um metabólito natural que foi descoberto e isolado pela primeira vez a partir do fungo *Penicillium griseofulvum* em 1939. Desde que foi introduzida comercialmente, a griseofulvina é utilizada principalmente para o tratamento de infecções causadas por fungos dermatófitos. Na agricultura, é empregada como agrotóxico protetor para prevenir o ataque de fungos fitopatogênicos. A griseofulvina entra na célula fúngica e liga-se aos microtúbulos, interferindo na formação do fuso mitótico (ARIS *et al.*, 2022).
- Flucitosina: atua como inibidor da síntese de ácidos nucleicos. A célula fúngica converte a flucitosina (5-fluorocitosina) em 5-fluorouracil. O fluorouracil é incorporado no RNA do fungo, causando a terminação prematura da cadeia do ácido ribonucleico e também inibe a síntese de DNA, agindo sobre a enzima timidilato sintase (via de biossíntese da timina). Os fungos devem possuir citosina permease para internalizar a flucitosina, citosina desaminase para convertê-la em 5-fluorouracil e uracil fosforribosil transferase para converter 5-fluorouracil em substrato para a síntese de RNA. Como a maioria dos fungos filamentosos não possuem essas enzimas, o espectro de ação da flucitosina fica restrito às leveduras (ODDS; BROWN; GOW, 2003).
- Polienos: são a classe de compostos antifúngicos com o espectro mais amplo. O mecanismo de ação mais conhecido dos polienos é a formação de poros na membrana plasmática dos fungos. Polienos, como a anfotericina B, se ligam ao ergosterol da membrana plasmática fúngica formando poros, o que causa o extravasamento de íons e pequenas moléculas orgânicas e conseqüentemente morte celular. Outros modelos

propostos como mecanismo de ação das polienos sobre as células fúngicas envolvem a adsorção do ergosterol superficial da bicamada lipídica, a absorção do ergosterol em uma formação extra-membranosa denominada “esponja de ergosterol” e o estímulo de danos oxidativos que contribuem para a morte celular (CAROLUS *et al.*, 2020).

- Azóis: em 1958 o clotrimazol foi introduzido no mercado como o primeiro medicamento azólico. Atualmente existem cerca de quarenta medicamentos e candidatos a medicamentos contendo azóis na composição química (SHAFIEI *et al.*, 2020). O principal alvo molecular dos azóis é o citocromo fúngico P450 14 α -demetilase (Erg11p/Cyp51p) que catalisa a remoção oxidativa do grupo 14 α -metil do lanosterol na via de biossíntese do ergosterol. Em algumas espécies, os azóis também podem inibir a enzima Δ 22-desaturase, que também faz parte da via de biossíntese do ergosterol. Com a inibição da síntese do ergosterol ocorre um acúmulo de esteróis incomuns na membrana plasmática fúngica, o que altera a sua permeabilidade e fluidez (ODDS; BROWN; GOW, 2003).
- Alilaminas e fenil morfolidas: a via de biossíntese do ergosterol também é o alvo de ação das alilaminas e fenil morfolidas. As alilaminas inibem a enzima esqualeno epoxidase, responsável por converter esqualeno em lanosterol. Já as fenil morfolidas, representadas pela amorolfina, tem dois alvos de ação no final da via de biossíntese do ergosterol, as enzimas Δ -14-redutase (Erg24p), responsável por converter C14-dimetil lanosterol em fecosterol e a enzima Δ -7-8-isomerase (Erg2p), responsável pela conversão de fecosterol em episterol (ODDS; BROWN; GOW, 2003).

- Equinocandinas: são peptídeos cíclicos produzidos naturalmente por fungos filamentosos. As equinocandinas (caspofungina, micafungina, anidulafungina e rezafungina) se ligam não-competitivamente a subunidade Fks1p da enzima β -1,3-D-glucana sintase (EC 2.4.1.34) inibindo a sua atividade. A inibição da biossíntese de β -1,3-D-glucana causa anormalidades estruturais na parede celular fúngica, resultando na inibição do crescimento ou morte celular por desequilíbrio da pressão osmótica. As equinocandinas são antifúngicos fungicidas contra muitos fungos, incluindo muitas espécies de *Candidas*, porém são fungistáticas para os fungos do gênero *Aspergillus* (SZYMAŃSKI *et al.*, 2022).
- Sordarinas: originalmente isolada do fungo *Sordaria araneosa* em 1969, as sordarinas podem ser obtidas de diversas fontes naturais, principalmente de fungos. As sordarinas inibem a síntese proteica das células fúngicas na etapa de alongamento. Elas não afetam os demais eucariotos, pois agem especificamente sobre o fator de alongamento de tradução eucariótica 2 (eEF2) da maquinaria de tradução dos fungos (SHAO *et al.*, 2022).

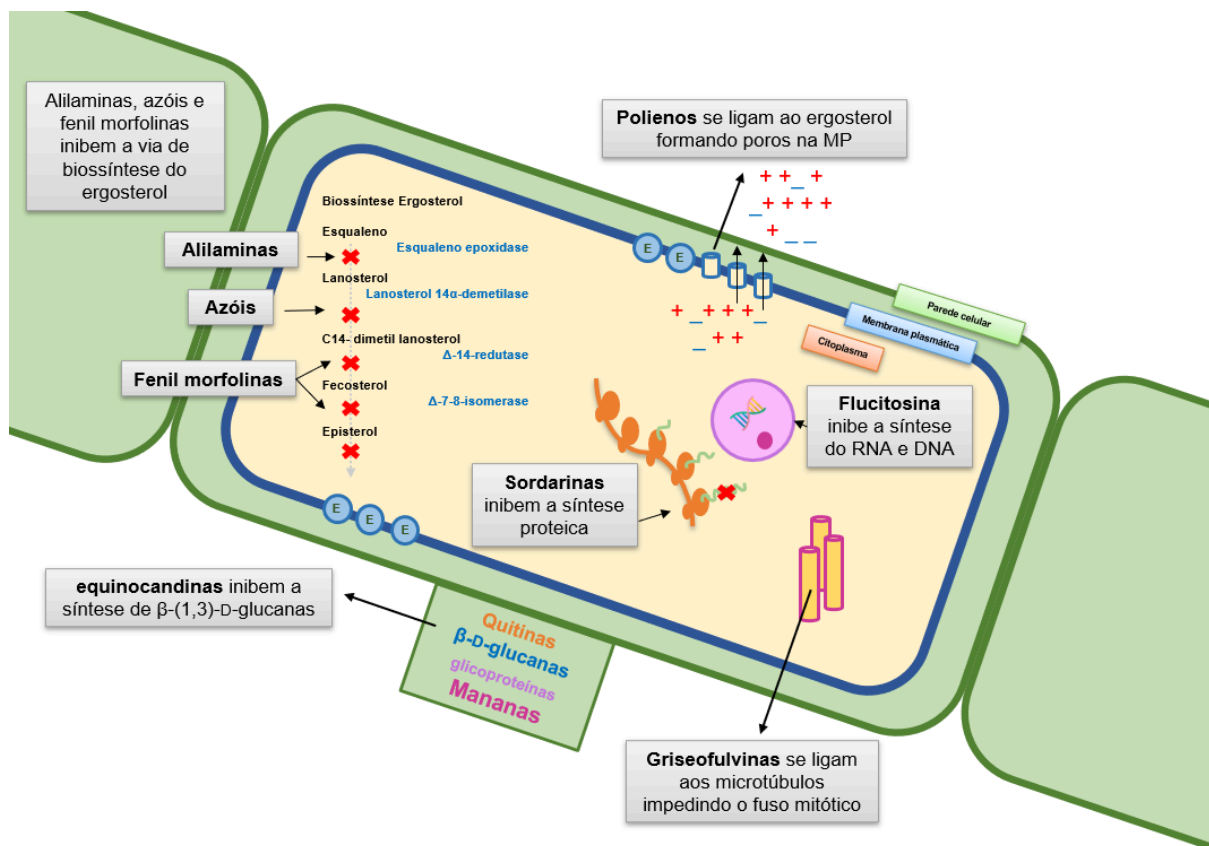


Figura 6. Mecanismos de ação dos antifúngicos na célula fúngica. Imagem criada pela autora.

3. 7 Fungicidas: o emprego de agrotóxicos para o controle de doenças fúngicas das plantas

Os agrotóxicos são produtos químicos utilizados no manejo de pragas e patógenos agrícolas (PEREIRA *et al.*, 2022). No Brasil, a fiscalização desses produtos é realizada por diversos órgãos, incluindo o Ministério da Agricultura, responsável pela produção primária ou plantação, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e as vigilâncias sanitárias estaduais e municipais, que supervisionam o produto acabado, como a farinha de trigo (VEKIC; RESENDE, 2021).

Os agrotóxicos são classificados de diversas maneiras no Brasil. A Anvisa os classifica de acordo com sua toxicologia, variando de I (extremamente tóxico) a V (improvável de causar dano agudo) (PEREIRA *et al.*, 2022). Já o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama) classifica esses produtos segundo sua periculosidade ambiental, variando de I (altamente perigoso) a IV (pouco perigoso) (KARAM *et al.*, 2015).

Outra forma de classificação é com base em seu grupo químico, sendo os principais grupos os organoclorados, piretróides, organofosforados, carbamatos e triazinas. Além disso, os agrotóxicos são classificados de acordo com a praga ou patógeno agrícola a ser combatido, incluindo inseticidas, acaricidas, nematicidas, herbicidas, fungicidas, entre outros, bem como por suas funções, como os reguladores de crescimento. (PEREIRA *et al.*, 2022).

Os fungicidas são indicados para combater as doenças fúngicas das plantas e têm como principal finalidade evitar a infecção do tecido vivo vegetal. O produto comercial é composto por duas partes: o ingrediente ativo, responsável pela ação antifúngica, e o ingrediente inerte, que serve como veículo e diluente do ingrediente ativo (GARCIA, 1999).

Os fungicidas podem atuar de três maneiras: (1) matando os fungos, (2) inibindo temporariamente a germinação dos esporos ou o crescimento vegetativo do micélio fúngico (sendo denominados fungistáticos) e (3) inibindo ou prevenindo a produção de esporos fúngicos sem afetar o crescimento vegetativo micelial (anti-esporulantes) (GARCIA, 1999). Além da classificação de acordo com seu grupo químico, os fungicidas também são comumente classificados de acordo com seu modo de ação, como exemplificado a seguir.

- Protetores ou de contato: são produtos aplicados preventivamente na superfície de folhas e sementes, agindo como uma barreira tóxica. Essa barreira impede a penetração dos fungos no hospedeiro ao inibir a germinação dos esporos e o desenvolvimento do tubo germinativo (GARCIA, 1999). Alguns exemplos de ingredientes ativos utilizados no tratamento do trigo incluem o Clorotalonil (CLOROTALONIL, 2022), do grupo químico isoftalonitrila, indicado para o controle da ferrugem-da-folha (*Puccinia hordei*) e ferrugem-do-colmo (*Puccinia graminis*), o Mancozebe (MANCOZEB, 2022), do grupo químico ditiocarbamato, recomendado para o controle da mancha-amarela (*Drechslera tritici-repentis*) e brusone (*Pyricularia grisea*), entre outros (VEKIC; RESENDE, 2021).
- Sistêmicos: os fungicidas sistêmicos são altamente solúveis em água e possuem um ingrediente ativo que é absorvido pela planta, podendo ser transportado para partes distantes do local de aplicação. Esses produtos suprimem os efeitos da infecção causada por fungos fitopatogênicos ao inibir qualquer desenvolvimento fúngico no interior da planta. Devido ao seu modo de ação, eles precisam ser seletivamente tóxicos aos fungos, enquanto não afetam negativamente as células vegetais (GARCIA, 1999). Entre os exemplos de ingredientes ativos indicados para o tratamento do trigo estão o Tebuconazol (TEBUCONAZOLE CCAB 200 EC®, 2010), do grupo químico triazóis, recomendado para o controle da ferrugem-da-folha (*Puccinia triticina*), ferrugem-do-colmo (*Puccinia graminis*), mancha-amarela (*Drechslera tritici-repentis*), brusone (*Pyricularia grisea*), helmintosporiose ou mancha-marrom (*Bipolaris sorokiniana*), mancha-das-glumas (*Stagonospora nodorum*), septoriose ou mancha-salpicada (*Septoria tritici*), giberela

(*Fusarium graminearum*) e oídio (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*). Outra opção é a Piraclostrobina (COMET®, 2023), do grupo químico estrobilurinas, indicada para o controle da ferrugem-da-folha (*Puccinia triticina*), mancha amarela (*Drechslera tritici-repentis*), helmintosporiose ou mancha-marrom (*Bipolaris sorokiniana*), mancha-das-glumas (*Stagonospora nodorum*) e septoriose ou mancha-salpicada (*Septoria tritici*), entre outros (VEKIC; RESENDE, 2021).

- Erradicantes: Os fungicidas protetores e sistêmicos têm a capacidade de agir também como fungicidas erradicantes, que eliminam patógenos da superfície das plantas ou do solo (no caso dos protetores) e eliminam estruturas fúngicas da superfície ou do interior das plantas (no caso dos sistêmicos). Esses fungicidas são considerados altamente tóxicos para todas as formas de vida e também são utilizados no controle de insetos, nematoides e ervas daninhas. A eficácia de um fungicida erradicante está diretamente relacionada à sua capacidade de reduzir o inóculo, ou seja, a quantidade de patógenos presentes no ambiente. (GARCIA, 1999).

3. 7. 1 A problemática relacionada à má utilização dos agrotóxicos e a dinâmica de consumo no Brasil

O avanço tecnológico no campo revolucionou a agricultura. A interação entre fertilizantes químicos e agrotóxicos emergiu como uma estratégia eficaz para aumentar o rendimento das safras. O controle de pragas e patógenos tornou-se mais eficiente, levando muitos produtores a adotarem o cultivo de monoculturas (TOSTADO; BOLLMOHR, 2022).

A prática da monocultura é considerada a principal causa de doenças nas lavouras. Esse modelo de plantio aumenta o risco de acúmulo de patógenos no solo, o que, por sua vez, contribui para o aumento da dependência da agricultura em relação a altas doses de agrotóxicos (RÓŻEWICZ; WYZIŃSKA; GRABIŃSKI, 2021; TOSTADO; BOLLMOHR, 2022). Estima-se que o uso global desses produtos químicos tenha aumentado cerca de 80% entre 1990 e 2017, com o consumo mundial atual alcançando quatro milhões de toneladas. Metade desse total é representada pelo uso de herbicidas, cerca de 30% por inseticidas e 17% por fungicidas (TOSTADO; BOLLMOHR, 2022).

Devido à sua natureza tóxica, os agrotóxicos devem ser utilizados como uma das várias ferramentas adotadas em estratégias integradas no manejo de doenças das plantas (PIRES *et al.*, 2014). No entanto, ao longo da história, os agrotóxicos têm sido utilizados de forma indiscriminada, resultando em graves consequências ao meio ambiente, contaminando o solo, a água e o ar (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018; TOSTADO; BOLLMOHR, 2022).

A toxicidade dos agrotóxicos têm impactos negativos na diversidade da microbiota do solo, das plantas e flores, dos organismos aquáticos e dos insetos polinizadores (TOSTADO; BOLLMOHR, 2022). Além disso, é conhecido que os patógenos agrícolas podem desenvolver resistência aos ingredientes ativos dos agrotóxicos, e que o uso desses produtos químicos está associado à contaminação de grãos e da água potável (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018; RÓŻEWICZ; WYZIŃSKA; GRABIŃSKI, 2021). De acordo com Tostado e Bollmohr (2022), em 2017, 92% das amostras de água potável do Brasil apresentaram algum tipo de contaminação com agrotóxicos.

Os agrotóxicos também causam danos aos sistemas reprodutivo, endócrino e principalmente neural dos seres humanos, estando relacionados a muitos casos de envenenamento. Aproximadamente 11 mil pessoas morrem por envenenamento não intencional com agrotóxicos ao redor do mundo todos os anos. A maior parte dos casos fatais ocorrem no continente asiático (TOSTADO; BOLLMOHR, 2022).

O Brasil se destaca como um dos maiores exportadores de produtos agrícolas do mundo, enquanto também lidera o ranking dos países importadores e consumidores de agrotóxicos. Grande parte dos agrotóxicos importados pelo Brasil são produzidos por empresas europeias. Entre os dez principais agrotóxicos importados dessas empresas para o Brasil, quatro foram banidos dentro dos países da União Europeia: atrazina (herbicida), acefato (inseticida), clorotalonil (fungicida) e clorpirifós (inseticida). Em 2020, foram importadas para o Brasil 33.300 toneladas de atrazina, 29.900 toneladas de acefato, 24.100 toneladas de clorotalonil e 8.800 toneladas de clorpirifós. Nesse mesmo ano, o Brasil registrou 493 novos agrotóxicos e consumiu um total de 685.745 toneladas desses produtos, correspondendo a uma receita de 28 milhões de euros (TOSTADO; BOLLMOHR, 2022).

3. 8 Aplicação do controle biológico no manejo integrado de fungos fitopatogênicos: foco em bactérias promotoras de crescimento de plantas

Com o aumento da população mundial e as mudanças nos hábitos alimentares, estima-se que até 2050 será necessário aumentar a produção de alimentos em 50%. Esse cenário indica que a produção de trigo também deve expandir, uma vez que esse cereal é responsável por fornecer 20% das calorias necessárias para a dieta humana (SIMÓN; STRUIK; BÖRNER, 2023).

Para atender a essa crescente demanda por alimentos de forma sustentável, é necessário desenvolver tecnologias que promovam a adaptação às mudanças climáticas recentes, bem como a redução do consumo de água e outros recursos naturais na atividade agrícola e também intensificar a integração de estratégias de manejo de doenças e pragas nas lavouras (SIMÓN; STRUIK; BÖRNER, 2023). Dentro desse contexto, o controle biológico emerge como uma prática agroecológica no manejo integrado de doenças, sendo empregado para combater patógenos vegetais e auxiliar na redução do uso excessivo e generalizado de agrotóxicos nas lavouras (BORO *et al.*, 2022).

Em fitopatologia, o controle biológico pode ser definido como a inter-relação de muitos fatores ambientais, com o objetivo de diminuir o efeito nocivo de organismos prejudiciais e favorecer o crescimento de organismos benéficos. Esse controle pode ser realizado por organismos ou microrganismos que têm ação antagônica contra os patógenos vegetais, assim como pela aplicação de produtos e compostos químicos provenientes de fontes naturais, como extratos vegetais e metabólitos secundários (SYED AB RAHMAN *et al.*, 2018).

Os agentes de controle biológico ou *Biological Control Agents* (BCAs) são organismos naturais ou modificados utilizados para combater as pragas e os patógenos agrícolas. O efeito protetivo dos BCAs contra os fitopatógenos é considerado uma característica de promoção indireta do crescimento de plantas, uma vez que a inibição dos fitopatógenos permite com que as plantas cresçam de forma saudável. Considera-se também que os BCAs auxiliam na manutenção da saúde e da biodiversidade do solo e favorecem o crescimento de insetos benéficos para as lavouras, como os insetos polinizadores (BORO *et al.*, 2022).

Os agentes microbianos de controle biológico podem ser bactérias, fungos, vírus, protozoários, nematoides ou microartrópodes que exercem atividade antagônica contra os patógenos vegetais. Bactérias que atuam como BCAs contra fitopatógenos também são conhecidas como bactérias promotoras de crescimento de plantas ou *Plant Growth Promoting Bacteria* (PGPB) (BORO *et al.*, 2022).

As PGPBs têm a capacidade de reprimir ou suprimir fisicamente organismos fitopatogênicos, secretar sideróforos, compostos antibióticos e enzimas líticas, induzir respostas imunológicas e induzir a resistência sistêmica das plantas, como exemplificado na figura 7 (ALLALI *et al.*, 2019; BORO *et al.*, 2022). No que diz respeito a indução da resistência sistêmica, destacam-se as PGPBs endofíticas. Essas bactérias colonizam os tecidos das plantas vivas, estabelecendo uma relação íntima com elas e, portanto, são consideradas importantes agentes indutores da resistência sistêmica (PATEL; MADAAN; ARCHANA, 2018).

Mecanismo de ação das PGPBs	
Sideróforos	Os sideróforos são moléculas de baixo peso molecular ligantes específicas de Fe (III). As PGPBs que produzem sideróforos capturaram íons de ferro sob condições limitantes, tornando-os indisponíveis aos microrganismos patogênicos que habitam a rizosfera. A produção de sideróforos também melhora a biodisponibilidade do Fe para as plantas, pois os sideróforos influenciam a mobilidade e a solubilidade do Fe no solo.
Compostos antibióticos	Os compostos antibióticos são metabólitos secundários secretados pelas PGPBs. Em termos de controle biológico de fungos fitopatogênicos, os metabólitos secundários apresentam alta aplicabilidade, pois atuam inibindo processos metabólicos primários essenciais dos microrganismos patogênicos.
Enzimas líticas	As PGPBs podem secretar enzimas líticas que clivam moléculas que compõem a parede celular dos fungos (ex.: quitinases e β -1,3-glucanases)
Respostas imunológicas	As PGPBs pode induzir respostas imunológicas sistêmicas nas plantas, que são mediadas pela produção vegetal do ácido jasmônico e etileno. As PGPBs também induzem a resistência sistêmica das plantas, mediada pela produção vegetal do ácido salicílico. A ativação destes mecanismos de proteção das plantas por bactérias benéficas torna as respostas imunológicas aos fitopatógenos mais rápida.

Figura 7. Mecanismos de ação das bactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPBs). Imagem criada pela autora.

3. 9 A atividade antibiótica da actinobactéria *Streptomyces avidinii*

As actinobactérias são bactérias Gram-positivas que constituem um dos maiores filos dentro do domínio Bacteria. São bactérias ubíquas, em sua maioria filamentosas (Figura 8), aeróbias, quimioheterotróficas e de vida livre, conhecidas por produzir diversos metabólitos secundários de interesse biotecnológico, entre eles, muitos compostos antibióticos (BARKA *et al.*, 2016).

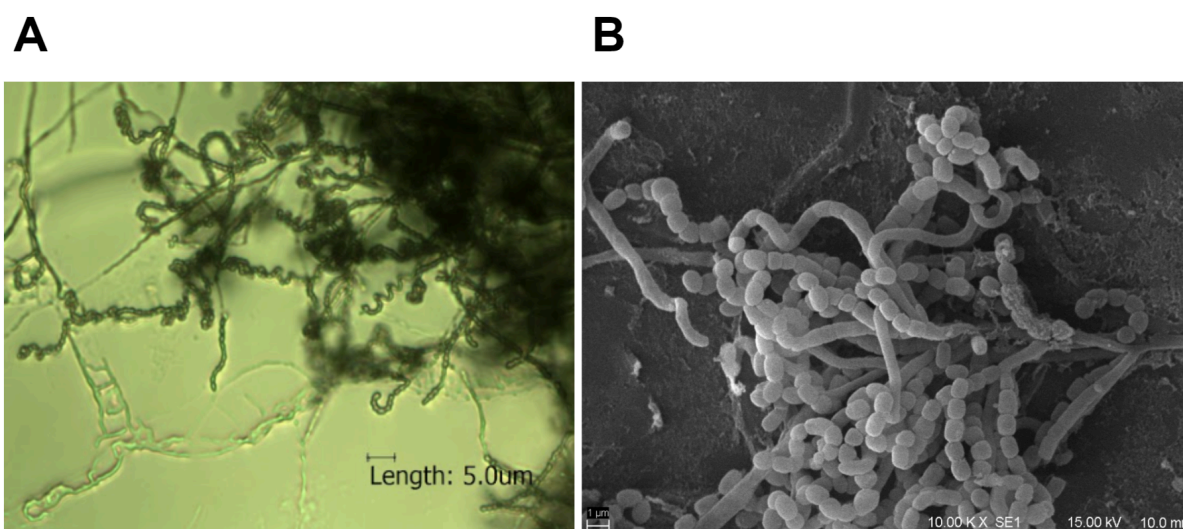


Figura 8. Micro morfologia dos esporos e das hifas de actinobactérias do gênero *Streptomyces*. Fotos da autora

Os metabólitos secundários bioativos são secretados pelas actinobactérias durante a fase de crescimento. Embora não sejam estritamente necessários para o crescimento ou reprodução, podem dar às actinobactérias uma vantagem competitiva, conferindo-las a capacidade de inibir o crescimento de outros microrganismos, dentre eles, microrganismos fitopatogênicos (Figura 9) (QUINN *et al.*, 2020).

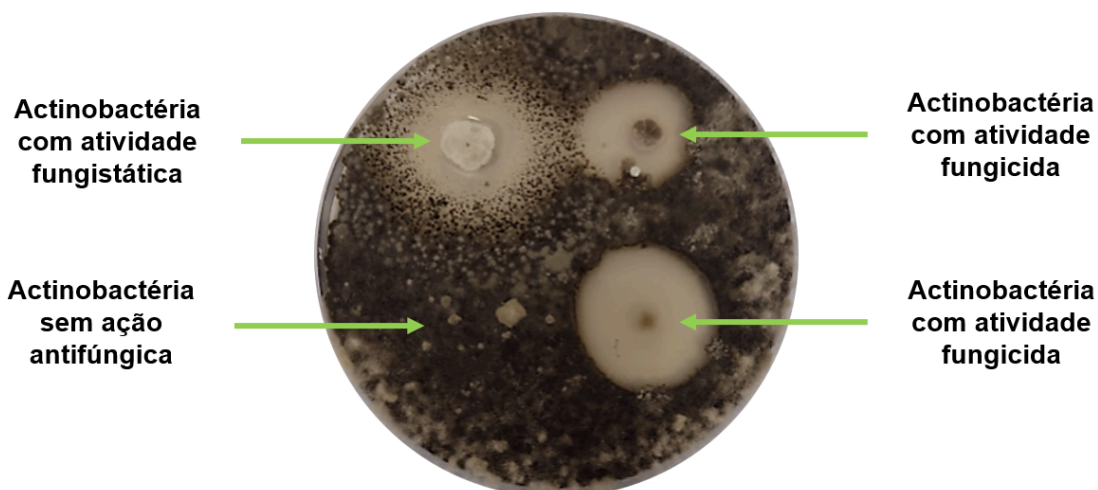


Figura 9. Atividade antifúngica de diferentes isolados de actinobactérias. Foto da autora.

Streptomyces avidinii é reconhecida principalmente pela produção da estreptavidina, uma proteína da família das avidinas, originalmente isolada por sua atividade antibiótica (CHALET; WOLF, 1964). As avidinas são proteínas que se ligam fortemente à biotina. Essas proteínas são secretadas por bactérias do solo como parte de seus mecanismos de competição ou defesa contra outros organismos, como fitopatógenos microbianos e nematóides que atacam as raízes das plantas (LAITINEN *et al.*, 2021). Além disso, *Streptomyces avidinii* também é objeto de estudo devido à produção de outros metabólitos secundários com propriedades antibióticas (IVANOVA *et al.*, 2010; TREGULOVA *et al.*, 2023).

Streptomyces avidinii cepa SB9 (IVANOVA *et al.*, 2010) produziu o composto antibiótico 2-amino-3-dodecanol, que inibiu o crescimento das bactérias *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces viridochromogenes* e *Escherichia coli* e dos fungos *Candida tropicalis*, *Candida albicans* e *Mucor miehei*. A cepa SB9 também produziu o composto di (2-etilhexil)

ftalato (DEHP), conhecido como um fator de agregação celular. Já *Streptomyces avidinii* cepa INA 01467 (TEREGULOVA *et al.*, 2023) foi capaz de inibir o crescimento dos fungos *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* e *Fusarium oxysporum*. Neste caso, os autores atribuem a atividade antifúngica da cepa INA 01467 a sua excelente atividade quitinolítica.

3. 10 A bioprospecção de actinobactérias para a produção de bioinsumos

Em 2023 o Brasil bateu recorde na exportação de produtos, o que gerou uma receita de mais de 310 bilhões de dólares e saldo positivo do produto interno bruto (PIB), sendo a indústria agrícola a responsável por aproximadamente metade deste valor ([Jornal Nacional - G1 - Globo](#)). Concomitantemente, a indústria agrícola brasileira é dependente da importação de uma grande quantidade de insumos, como fertilizantes e agrotóxicos, que elevam os custos da produção ([Forbes Agro](#)).

O Programa Nacional de Bioinsumos tem como objetivo ampliar e fortalecer o setor de produção de bioinsumos brasileiro (VIDAL *et al.*, 2021). O Decreto nº 10.375, de 26 de maio de 2020, marco regulatório que criou o Programa Nacional de Bioinsumos, define os bioinsumos como:

... 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, p. 105).

Quando voltado para o desenvolvimento da agroecologia, o Programa Nacional de Bioinsumos tem como objetivo promover a inovação biotecnológica para oferecer alternativas sustentáveis ao uso contínuo de grandes quantidades de insumos quimicamente sintetizados que são fortes poluidores ambientais e causam danos à saúde animal e humana. A produção nacional de bioinsumos vai ao encontro com o desenvolvimento da bioeconomia no Brasil, que evolui a partir da produção nacional de compostos bioativos e suas indústrias de transformação (agrícola, farmacêutica, cosmética, entre outras) (VIDAL; DIAS, 2023).

A bioprospecção de actinobactérias para o desenvolvimento de bioinsumos para controle de patógenos agrícolas e promoção do crescimento das plantas está alinhada com os objetivos deste importante programa. As actinobactérias são agentes de biocontrole promissores, pois além de produzirem uma variedade de compostos antibióticos (GÓMEZ; RAMOS; SINUCO, 2021), também são capazes de fornecer fitohormônios às plantas (ALLALI *et al.*, 2019) e/ou solubilizar nutrientes e minerais (THAMPI; BHAI, 2017), tornando-os disponíveis para serem absorvidos por elas. Por essas razões, as actinobactérias são consideradas PGPBs multifuncionais, sendo poderosas aliadas no manejo integrado de doenças das plantas e no fortalecimento da agricultura sustentável (MITRA *et al.*, 2022;).

Objetivando aprofundar o conhecimento sobre as actinobactérias como agentes de biocontrole de fungos fitopatogênicos e assim prospectar um novo agente de controle biológico, explorou-se na literatura os mecanismos de ação antifúngica desempenhados por várias espécies de actinobactérias, principalmente do gênero *Streptomyces*, bem como outras características de promoção de crescimento de plantas. Os achados culminaram no primeiro manuscrito

proveniente deste trabalho de pesquisa, intitulado “*Exploring the Trends in Actinobacteria as Biological Control Agents of Phytopathogenic Fungi: A (Mini)-Review*”, publicado em 12 de janeiro de 2024, pela revista [Indian Journal of Microbiology](#), e pode ser acessado para leitura no seguinte link <https://doi.org/10.1007/s12088-023-01166-6>.

1. MATERIAIS E MÉTODOS

4. 1 Microrganismos

As actinobactérias antifúngicas *Streptomyces* sp. R(18)6 e *Streptomyces* sp. 6(4) (DE OLIVEIRA; DA SILVA; VAN DER SAND, 2010) pertencem à coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA) da UFRGS e foram utilizadas como controle. A actinobactéria LMAF é o objeto de estudo desta tese e foi gentilmente cedida pela Professora Doutora Marisa da Costa para a coleção de microrganismos do LMA.

Para realizar a análise da atividade antifúngica foram utilizados isolados patogênicos de fungos filamentosos e leveduras (Tabela 1). Os fungos filamentosos também pertencem à coleção de microrganismos do LMA, assim como à coleção de microrganismos do Centro Nacional de Pesquisa do Trigo (CNPT) da Embrapa Trigo (unidade Passo Fundo, Rio Grande do Sul). As leveduras pertencem à coleção de microrganismos Norte-Americana ou *American Type Culture Collection* (ATCC) e foram gentilmente cedidas pelo Professor Doutor Alexandre Meneghello Fuentefria.

As características morfológicas das colônias de alguns dos microrganismos utilizados neste estudo estão ilustradas nas figuras 10 e 11.

Tabela 1. Microrganismos

Microrganismo	Identificação	Código	Coleção	Localização de origem	Ambiente de coleta
Fungo filamentoso	<i>Aspergillus niger</i>	ASN1	LMA	Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil	
	<i>Aspergillus niger</i>	ASN2	LMA	Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil	
	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	BIS98007P	LMA	Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil	Trigo
	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	BIS98034P	LMA	Vitória, Paraná, Brasil	Trigo
	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	BISA20P	LMA	Saskatoon, Saskatchewan, Canadá	
	<i>Fusarium graminearum</i>	FUG2	CNTP	Arapuá/Coamo, Rio Grande do Sul, Brasil	Trigo
	<i>Fusarium graminearum</i>	FUG4	CNTP	Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil	Trigo
	<i>Fusarium graminearum</i>	FUG 09M134	LMA	Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.	
	<i>Macrophomina phaseolina</i>	MAP1	LMA	Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.	
	<i>Rhizopus</i> sp.	RIP_1	LMA	Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.	

Levedura	<i>Candida tropicalis</i>	750	ATCC		Paciente broncomicose
	<i>Candida tropicalis</i>	950	ATCC		
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i> sp.	R(18)6	LMA	Rio Grande do Sul, Brasil.	Endofítico raízes tomateiro
	<i>Streptomyces</i> sp.	6(4)	LMA	Rio Grande do Sul, Brasil.	Endofítico raízes tomateiro
		LMAF	LMA	UFRGS campus centro, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.	Rizosfera pitangueira

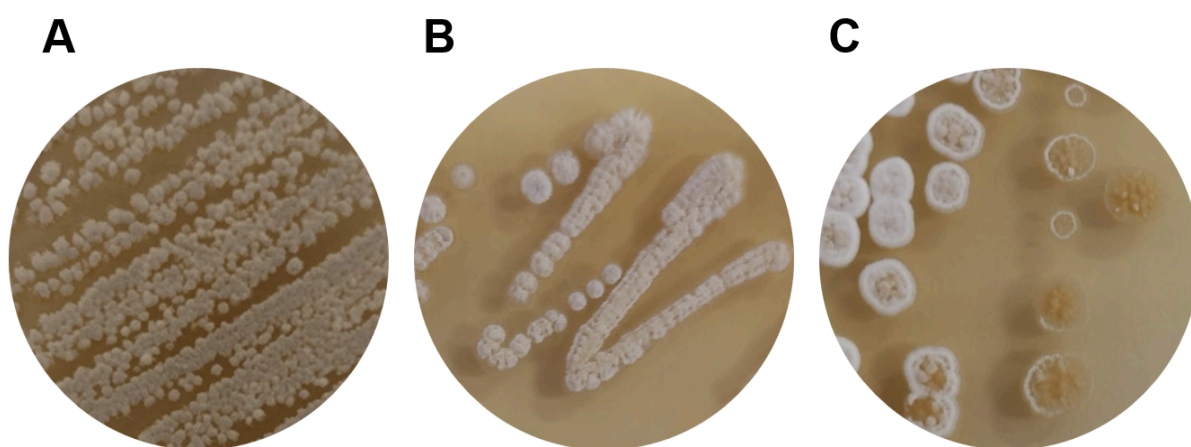


Figura 10. Morfologia das colônias das actinobactérias. (A) *Streptomyces* sp. R(18)6 (meio de cultura ágar amido caseína). (B) *Streptomyces* sp. 6(4) e (C) actinobactéria LMAF (meio de cultura ágar extrato de levedura-extrato de malte). Fotos da autora.

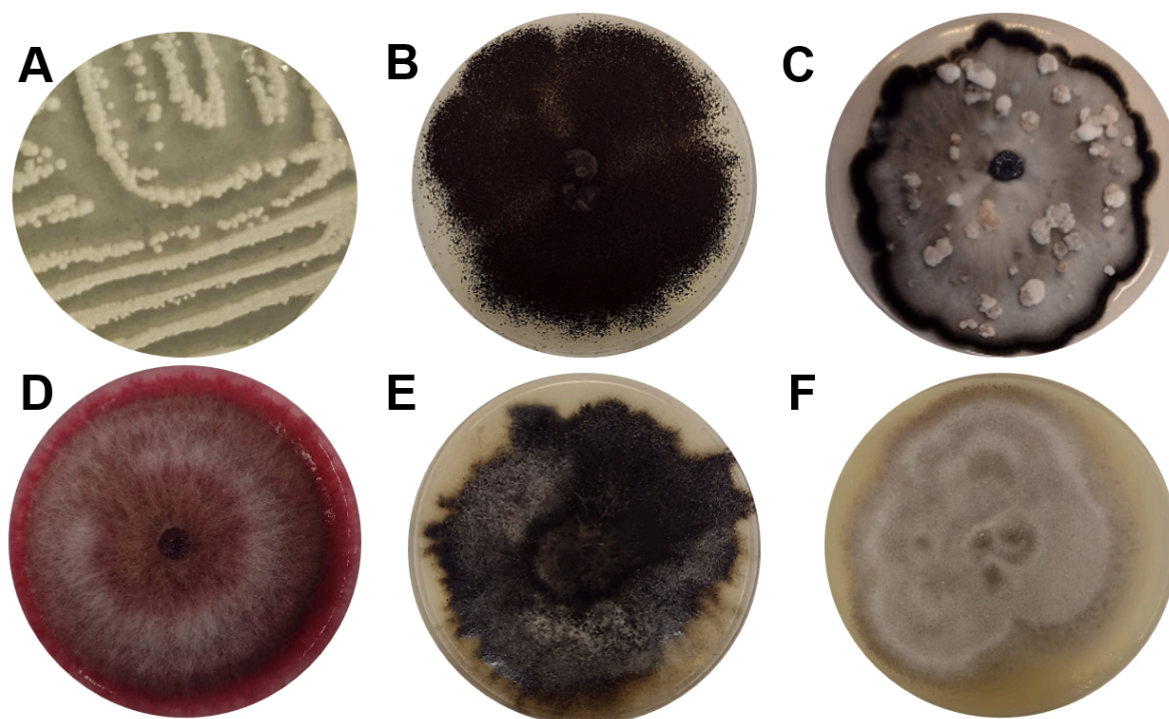


Figura 11. Morfologia das colônias dos fungos patogênicos. (A) *Candida tropicalis* (meio de cultura ágar sabouraud). (B) *Aspergillus niger*, (C) *Bipolaris sorokiniana*, (D) *Fusarium graminearum*, (E) *Macrophomina phaseolina* e (F) *Rhizopus* sp. (meio de cultura ágar batata dextrose). Fotos da autora.

4. 2 Caracterização taxonômica da actinobactéria LMAF

4. 2. 1 Caracterização morfológica e fisiológica

A caracterização morfológica da actinobactéria LMAF foi realizada de acordo com as diretrizes do Projeto Internacional de *Streptomyces* ou *International Streptomyces Project* (ISP) (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966).

A textura das colônias e a coloração do micélio da actinobactéria LMAF foram examinadas após cultivo por sete a quatorze dias a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ nos meios: ágar extrato de levedura-extrato de malte (ISP₂), ágar água (20% p/v), ágar amido caseína (ACA) (2 g KNO₃, 2 g NaCl, 2 g K₂HPO₄, 0,05 g MgSO₄.7H₂O, 0,01 g FeSO₄, 0,02 g CaCO₃, 10 g amido, 0,3 g caseína, 15 g ágar, 1000 mL água destilada) e

ágar batata dextrose (BDA) (caldo de 140 g de batata branca cozida com casca, 10 g dextrose, 15 g ágar, 1000 mL água destilada).

A determinação das características micromorfológicas gerais das hifas portadoras de esporos foi realizada por microscopia óptica da superfície da actinobactéria LMAF, cultivada em câmara úmida nas mesmas condições de incubação descritas anteriormente.

A micromorfologia das hifas portadoras de esporos, da superfície dos esporos e das cadeias de esporos foi observada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Zeiss EVO MA10) e interpretada de acordo com Ipek Kurtböke (2022). As amostras para MEV foram preparadas de acordo com o protocolo de preparação de amostras biológicas disponibilizado pelo [Centro de Microscopia e Microanálise BR-Sul UFRGS – UFSM](#).

A habilidade da actinobactéria LMAF em crescer em diferentes temperaturas (4, 25, 28, 30, 37 e 45°C), pH (5, 7, 9 e 11) e concentrações de NaCl (0, 2, 4, 6, 8 10% p/v) foi determinada de acordo com Kouomou *et al.* (2019). Brevemente, a actinobactéria LMAF foi cultivada por sete a quatorze dias em meio ISP₂ nas diferentes temperaturas e por seis semanas a 4°C. Para os ensaios de tolerância à pH e salinidade foram crescidas em temperatura de 28°C ± 2°C.

4. 2. 2 Identificação fenotípica e genômica

A actinobactéria LMAF foi submetida a identificação fenotípica através de espectrometria de massa por MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry). A actinobactéria LMAF foi cultivada em ACA por quatro dias a 28°C ± 2°C e as amostras para espectrometria foram preparadas por transferência direta (DT) de acordo com o “modo de preparo

de amostras por transferência direta” descrito no site [LabMaldi – Instituto de Ciências Básicas da Saúde - UFRGS](#). Os espectros foram analisados utilizando a versão quatro da biblioteca BDAL da Biotyper. O ponto de corte utilizado para identificação em nível de espécie foi ≥ 1.8 conforme sugerido por Yarbrough; Lainhart e Burnham (2017).

Para realizar a identificação molecular, a actinobactéria LMAF foi cultivada em ACA por sete dias a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, as hifas portadoras de esporos foram recuperadas da placa de cultivo por fricção e o DNA genômico foi extraído com kit PowerSoil® (MOBIO Laboratories, Inc). A qualidade do DNA genômico foi verificada por eletroforese em gel de agarose (0.8% p/v). Foram utilizados 4 μL de DNA genômico corados com 0,5 μL de GelRed (quatro G Biotecnologia). A corrida de eletroforese foi realizada por um período de 40 min a 100 V, 80 mA e 80W e a banda foi observada em um transluminador UV (Major Science). A concentração do DNA genômico foi mensurada em um nano espectrofotômetro (K23-0002 versão 01/13 KASVI).

A amplificação do gene 16S do RNA ribossomal (16S rRNA) (1500 pb) foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores pA (sense) (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') e pH (anti-sense) (5' AGG AGG TGA TCC AGC CGC AC 3') (EDWARDS *et al.*, 1989). A solução da reação em cadeia da polimerase (PCR) e as condições de amplificação foram adaptadas de, De Oliveira; Da Silva e Van Der Sand (2010). Reação da PCR (volume final 25 μL): 3,2 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 12,5 μL de Master Mix PCR Convencional (quatro G Biotecnologia), 30 ng de DNA genômico e água ultra pura. Condições de amplificação: 10 min de desnaturação a 94°C , seguida por 35 ciclos de 1 min a 94°C , 1 min a 56°C e 1 min a 72°C e extensão final por 10 min a 72°C (ProFlex™

3x32-Well PCR System, Applied Biosystems). A amplificação do gene 16S rRNA foi verificada em gel de agarose (1,5% p/v) utilizando os mesmos parâmetros de corrida de eletroforese descritos acima.

O sequenciamento de Sanger foi realizado pela empresa [ACTGene Análises Moleculares](#). Para o sequenciamento foram utilizados os oligonucleotídeos pA e pH (descritos acima) e os oligonucleotídeos 16S (sense) (5' GGA TGA GCC CGC GGC CTA 3'), F (anti-sense) (5' ACG AGC TGA CGA CAG CCA TG 3') e 2F (sense) (5' CGG TGT ACA GGT GGT GCA T 3').

A sequência resultante foi analisada utilizando-se o programa [Basic Local Alignment Search Tool](#) (BLAST). A análise filogenética foi realizada com base na metodologia descrita por Kouomou *et al.* (2019). Brevemente, vinte e nove sequências depositadas na base de dados do [National Center for Biotechnology Information](#) (NCBI) foram alinhadas com a sequência da actinobactéria LMAF através do programa Clustal W. A árvore filogenética foi construída no software MEGA X (versão 11) e inferida a partir do método de *Neighbour-Joining*. O teste de *Bootstrap* foi realizado baseado em 1000 repetições. As distâncias evolutivas foram calculadas através do modelo de Kimura 2-parâmetros.

4. 3 Características de promoção de crescimento de plantas

Neste tópico são apresentados os ensaios realizados para determinar a habilidade da actinobactéria LMAF em promover indiretamente o crescimento das plantas, por meio da inibição do crescimento de fungos filamentosos causadores de doenças no trigo. Além disso, foram realizados ensaios para determinar se a actinobactéria LMAF é capaz de promover diretamente o crescimento das plantas. Essas características são importantes para a seleção de bactérias promotoras de crescimento de plantas com múltiplas funções

4. 3. 1 Ensaio de atividade antifúngica

A atividade antifúngica das actinobactérias frente aos fungos filamentosos fitopatogênicos foi avaliada através do método convencional de inoculação pontual (JING *et al.*, 2020). Os fungos e as actinobactérias foram previamente cultivados por sete dias a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em BDA e ACA, respectivamente. Um disco de 4 mm de diâmetro foi recortado do crescimento fúngico e então inoculado no centro de uma placa de Petri (90 mm de diâmetro) contendo meio BDA. Quatro discos de cada actinobactéria, também com 4 mm de diâmetro, foram recortados e inoculados simetricamente a 25 mm do centro da mesma placa (Figura 12A). Como controle, um disco de cada fungo foi inoculado separadamente (Figura 12B).

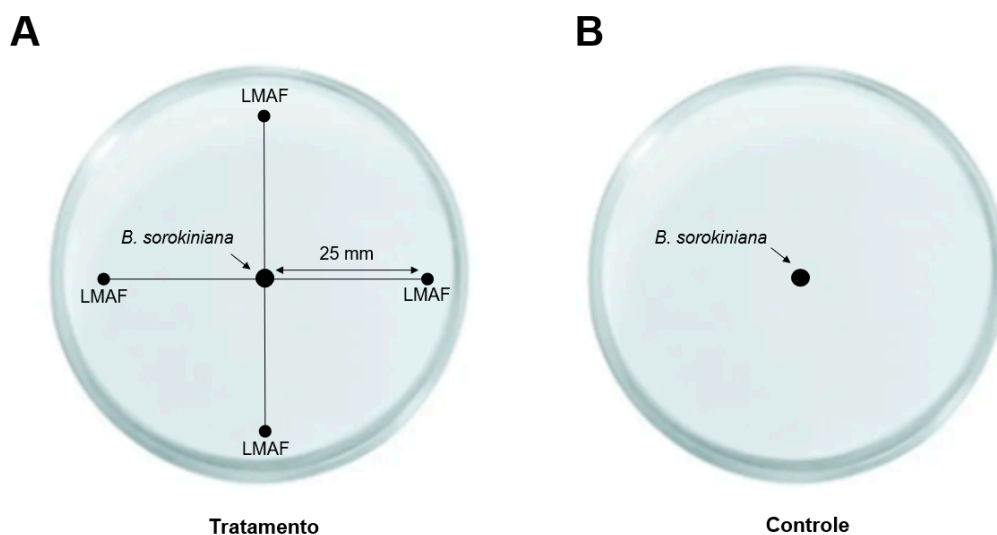


Figura 12. Metodologia do ensaio de atividade antifúngica. (A) tratamento e (B) controle do ensaio. Imagem criada pela autora

As placas foram incubadas por sete dias a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e a zona de inibição foi calculada através da medição da distância entre a borda do micélio fúngico e o disco de actinobactéria. A porcentagem de inibição do crescimento radial ou *Inhibition Percentage of the Radial Growth* (PIRG) foi calculada através da seguinte fórmula:

$$PIRG = \left[\frac{(C-T)}{T} \right] \times 100$$

Onde C e T representam o raio do crescimento do micélio fúngico do controle e do tratamento, respectivamente.

4. 3. 2 Efeitos inibitórios das actinobactérias sobre a germinação dos conídios dos fúngicos

A avaliação do efeito inibitório dos esporos das actinobactérias *Streptomyces* sp. R(18)6 e LMAF sobre a germinação de *Bipolaris sorokiniana* e *Fusarium graminearum* foi realizada com base na metodologia descrita por Perelló *et al.* (2003). As actinobactérias foram cultivadas sob agitação por sete dias a 28°C ± 2°C em caldo AC. Os inóculos bacterianos foram ajustados para a concentração de 1,5 x 10⁸ esporos/mL em um densitômetro de McFarland (bioSan). Os isolados fúngicos foram cultivados por sete dias a 28°C ± 2°C em BDA. Os conídios foram recuperados das placas de cultivo por fricção e os inóculos fúngicos foram ajustados para a concentração de 1 x 10⁴ conídios/mL em uma câmara de Neubauer. Os inóculos de actinobactéria e fungo foram misturados (1:1) e 25 µL desta mistura foram pipetados sobre uma fatia de BDA (4 mm de diâmetro). Os efeitos inibitórios causados pela atividade das actinobactérias sobre a superfície das células fúngicas, cultivadas em câmaras úmidas a 28°C ± 2°C por sete a dez dias, foram observados através de microscopia óptica e eletrônica de varredura. Os ensaios foram realizados em triplicata e como controle as actinobactérias e os fungos foram cultivados separadamente.

4. 3. 3 Produção de ácido indol acético

O teste de produção de ácido indol acético (AIA) foi adaptado de Monteiro; Borba e Van Der Sand (2017). A actinobactéria LMAF foi incubada sob agitação a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em caldo King B (4 g peptona, 0,23 g K_2HPO_4 , 0,3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 g glicerol, 1000 mL água destilada, pH 6,2) suplementado com triptofano (0,5 g). Em 96, 120, 144 e 168 horas alíquotas de 2 mL foram transferidas para microtubos e então centrifugadas a $11337 \times g$ por 5 min. Quinhentos microlitros do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo contendo 500 μL de reagente de Salkowski (0,96 g de FeCl_3 dissolvidas em 47 ml de água, acrescido de 33,6 mL H_2SO_4). Os microtubos foram incubados por 30 min à temperatura ambiente em ausência de luz e a intensidade colorimétrica resultante da produção de AIA foi determinada por espectrofotometria ($\lambda = 520 \text{ nm}$). Uma curva de calibração foi preparada utilizando diferentes concentrações de AIA (1, 5, 10, 15 e 20 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 13).

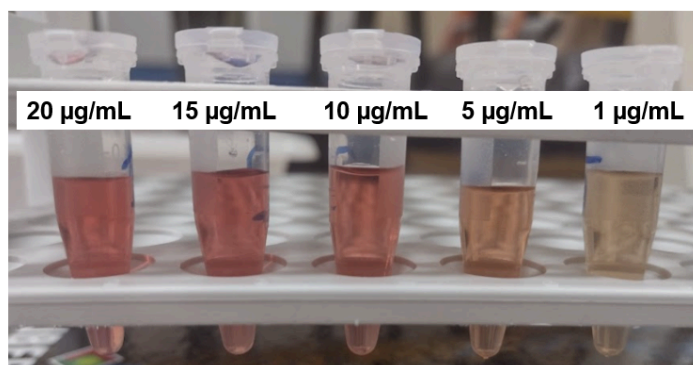


Figura 13. Soluções de calibração com diferentes concentrações de ácido indol acético (AIA). Foto da autora.

4. 3. 4 Produção de sideróforos

O ensaio de produção de sideróforos foi adaptado de Monteiro; Borba e Van Der Sand (2017). O corante Cromo Azurol-S (CAS) é um agente complexante de Ferro (III). O corante mantém a cor azul na presença do íon Fe^{3+} e sofre alteração para tons de amarelo quando este íon é sequestrado, o que atesta a presença de sideróforos (SCHWYN; NEILANDS, 1987). Para preparar CAS é necessário:

- 1) Misturar uma solução de 60,5 mg de CAS dissolvido em 50 mL de água destilada a 10 mL de solução de $FeCl_3$.
- 2) Adicionar lentamente uma solução de 72,9 mg de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) dissolvido em 40 mL de água destilada.
- 3) Autoclavar o corante por 15 min.

A actinobactéria LMAF foi cultivada sob agitação por seis dias a $28^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$ em caldo King B (pH 6,2). Alíquotas de 1 mL foram transferidas para microtubos e então centrifugadas a $11337 \times g$ por 5 min. Quinhentos microlitros do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo contendo 500 μL de CAS. O ensaio foi realizado em duplicata e a produção de sideróforos foi considerada positiva mediante alteração de cor (azul para amarelo) após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente em ausência de luz (Figura 14).

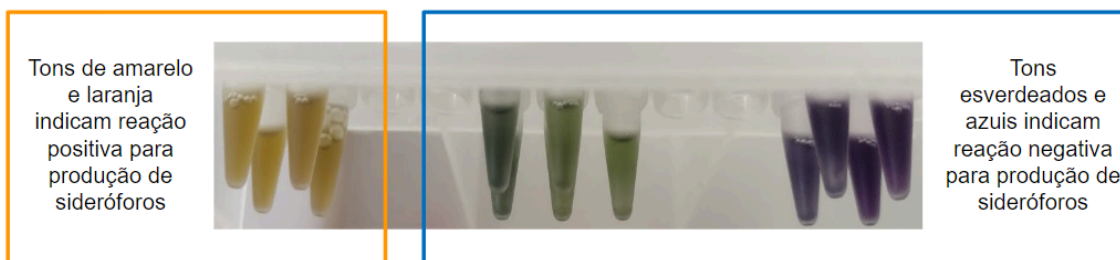


Figura 14. Ilustração de resultados para o ensaio de produção de sideróforos. Foto da autora.

4. 3. 5 Solubilização de fosfato

A capacidade de solubilizar fosfato foi avaliada de acordo com Beneduzi *et al.* (2008). A actinobactéria LMAF foi previamente incubada por sete dias a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ no meio de cultura glicose levedura ou *glucose yeast medium* (GY) (10 g glicose, 2 g extrato de levedura, 15 g ágar, 1000 mL água destilada) (SYLVESTER-BRADLEY *et al.*, 1982). Em seguida, a actinobactéria LMAF foi incubada, nas mesmas condições de cultivo, em GY suplementado com duas soluções que produzem hidrogenofosfato de cálcio (CaHPO_4), um precipitado de fosfato inorgânico. Solução (a) 5 g K_2HPO_4 , 50 mL água destilada e solução (b) 10 g CaCl_2 , 100 mL água destilada. As soluções foram esterilizadas separadamente e adicionadas ao meio GY pouco antes de ser distribuído nas placas de Petri. O ensaio foi realizado em triplicata e a solubilização de fosfato foi considerada eficiente quando sob as colônias formaram-se halos de consumo/zonas claras (Figura 15).

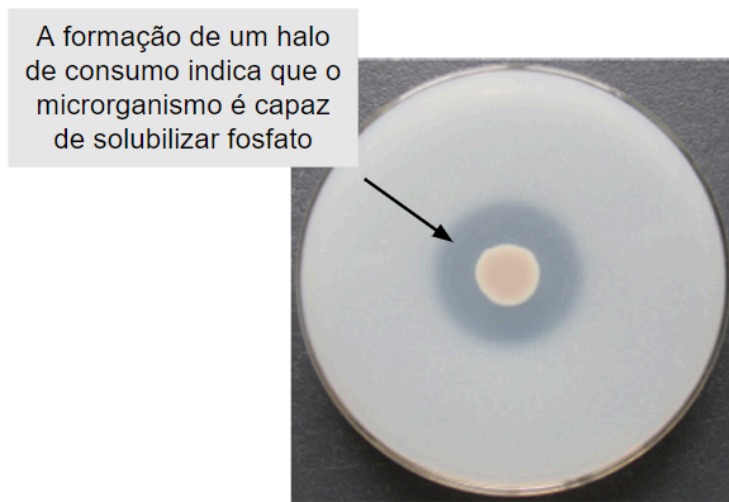


Figura 15. Ilustração de resultado positivo para o ensaio de solubilização de fosfato.

Imagem adaptada de (ZENG *et al.*, 2017)

4. 3. 6 Microbiolização de sementes de trigo com a actinobactéria LMAF

Para avaliar a habilidade da actinobactéria LMAF em colonizar sementes de trigo, adaptamos os protocolos descritos por Monteiro; Borba e Van Der Sand (2017). Sementes de trigo (cultivar BRS reponte) foram desinfetadas por imersão em álcool 70% por 5 min, seguida por imersão em hipoclorito de sódio 2,5% por 5 min e por três lavagens consecutivas com água destilada estéril. As sementes foram secas com papel filtro estéril e submetidas a microbiolização com a cepa LMAF sob agitação a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em caldo AC. Em 24, 48, 72 e 96 horas as sementes submetidas a microbiolização foram:

- 1) Para avaliar a influência da microbiolização sobre a germinação das sementes: 50 sementes foram incubadas por sete dias a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (12 horas fotoperíodo) em câmaras úmidas revestidas com papel filtro estéril e em BDA.
- 2) Para investigar o comportamento endofítico da cepa LMAF: sementes foram lavadas três vezes com água destilada estéril, secadas a temperatura ambiente por no mínimo uma hora, cortadas simetricamente e observadas por microscopia eletrônica de varredura. Sementes seccionadas também foram incubadas por sete dias a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em BDA.

Como controle foram utilizadas sementes desinfetadas que foram imersas em água destiladas estéril em oposição a microbiolização. O ensaio foi realizado em duplicata.

4. 3. 7 Ensaio de controle biológico *in vitro*

A capacidade da actinobactéria LMAF controlar o desenvolvimento da podridão das sementes causada por *Bipolaris sorokiniana* foi testada *in vitro*. Adaptamos os ensaios de controle biológico descritos por Monteiro; Borba e Van Der Sand (2017) e Allali *et al.* (2019). O ensaio foi realizado em câmaras úmidas revestidas com papel filtro estéril. Cinco sementes de trigo (cultivar BRS reponte) foram distribuídas por câmara, de acordo com cada um dos tratamentos. As sementes foram incubadas por sete dias a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (12 horas fotoperíodo).

A actinobactéria LMAF (concentração do inóculo $1,5 \times 10^8$ esporos/mL) foi cultivada sob agitação por setes dias a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em caldo AC e um isolado de *Bipolaris sorokiniana* (BIS98034P) (concentração do inóculo 1×10^4 conídios/mL) foi cultivado por quatro dias em caldo BD nas mesmas condições. Todas as sementes foram previamente desinfetadas como descrito no tópico 4. 3. 6. Foram realizados quatro tratamentos diferentes, conforme descrito abaixo:

- 1) Sementes não tratadas (controle de sanidade): 50 sementes foram imersas em água destilada estéril e então incubadas sob agitação durante a noite a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- 2) Sementes não tratadas e contaminadas com *Bipolaris sorokiniana* (controle da doença): 50 sementes foram imersas no crescimento fúngico e incubadas sob agitação durante a noite a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- 3) Sementes tratadas com o fungicida difenoconazol (Forth fungicida) 0,06% (p/v): 50 sementes foram imersas em difenoconazol por três minutos, secas à temperatura ambiente, imersas no crescimento fúngico e incubadas sob agitação durante a noite a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

- 4) Microbiolização das sementes de trigo com a actinobactéria LMAF: 50 sementes foram imersas no crescimento bacteriano e incubadas sob agitação por quatro horas a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, secas à temperatura ambiente, imersas no crescimento fúngico e incubadas sob agitação durante a noite a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

4. 4 Características de inibição dos compostos antifúngicos contidos no extrato bruto produzido pela actinobactéria LMAF

Neste tópico é apresentado o ensaio realizado para determinar o potencial de inibição dos compostos antifúngicos excretados pela actinobactéria LMAF contra o isolado de *Bipolaris sorokiniana* BIS98034P e contra as cepas de *Candida tropicalis* 750 e 950. Devido à dificuldade de manipulação do fungo *Bipolaris sorokiniana*, os ensaios que visavam determinar os efeitos inibitórios causados pelo extrato bruto sobre as células, a concentração inibitória mínima e os mecanismos de ação antifúngica dos compostos contidos no extrato foram avaliados apenas contra cepas de leveduras.

4. 4. 1 Produção dos compostos antifúngicos

As condições de crescimento utilizadas para a produção dos compostos antifúngicos foram adaptadas de, De Oliveira; Da Silva e Van Der Sand (2010). A actinobactéria LMAF foi cultivada em ACA por sete dias a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Uma colônia pura foi retirada do crescimento e inoculada em 125 mL de caldo AC (pH 7). A incubação foi realizada por sete dias a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ sob agitação de 90 rpm em uma incubadora *shaker* (Oxylab). O extrato bruto foi recuperado por centrifugação e

posteriormente liofilizado. Em todos os ensaios subsequentes, o extrato bruto foi suspenso em água ultra pura e filtrado (filtro de 0,22 μm) logo antes do uso.

4. 4. 2 Ensaio de atividade antifúngica

O ensaio de atividade antifúngica do extrato bruto produzido pela actinobactéria LMAF foi realizado pelo método de difusão em poços, com base na metodologia descrita por De Oliveira; Da Silva e Van Der Sand (2010). O isolado de *Bipolaris sorokiniana* BIS98034P foi cultivado por sete dias a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em BDA. Os conídios foram recuperados da placa de cultivo por fricção e o inóculo fúngico foi ajustado para a concentração de 1×10^4 conídios/mL em uma câmara de Neubauer. As cepas de *Candida tropicalis* 750 e 950 foram cultivadas em ágar Sabouraud (Himedia) por 24 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. O inóculo foi ajustado em um densitômetro de McFarland (bioSan) para 1 a 5×10^6 células/mL. Placas de petri contendo BDA e ágar Sabouraud foram semeadas por espalhamento com os inóculos de *B. sorokiniana* e *C. tropicalis*, respectivamente. Poços de 4 mm de diâmetro foram perfurados nas placas semeadas. Cinquenta microlitros de extrato bruto (100 mg/mL) foram depositados dentro dos poços. As placas foram incubadas durante a noite a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ para permitir a difusão dos metabólitos no ágar e posteriormente incubadas por sete dias a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (*B. sorokiniana*) e por 48 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (*C. tropicalis*). Após a incubação, avaliou-se a formação de halos de inibição do crescimento fúngico ao redor dos poços. O ensaio foi realizado em triplicata.

4. 4. 3 Efeitos inibitórios dos compostos antifúngicos produzidos pela actinobactéria LMAF sobre as células de *Candida tropicalis*

As lesões causadas pelos compostos antifúngicos nas células de levedura foram avaliadas por microscopia óptica e eletrônica de varredura (MEV) (Zeiss EVO MA10). O inóculo fúngico (1 a 5×10^6 células/mL) foi misturado ao extrato bruto (100 mg/mL) na proporção de 1:1 e posteriormente incubado por 48 horas a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. Para comparação visual, os inóculos fúngicos também foram misturados separadamente na proporção de 1:1 com caspofungina (Sigma-Aldrich) (64 $\mu\text{g/mL}$, diluição em água ultra pura), anfotericina B (European pharmacopeia reference standard) (64 $\mu\text{g/mL}$, diluição em dimetilsulfóxido - DMSO) e solução salina estéril (0,85%). A caspofungina é um antifúngico da classe das equinocandinas que inibe a síntese do β -1,3-D-glucano, um componente essencial da parede celular de vários fungos filamentosos e leveduras (SZYMAŃSKI *et al.*, 2022). A anfotericina B é um antifúngico da classe dos polienos que se liga ao ergosterol da membrana celular fúngica formando poros, o que permite a saída do conteúdo intracelular (CAROLUS *et al.*, 2020). Após 48 horas, as misturas foram pipetadas em lamínulas e deixadas secar à temperatura ambiente. As amostras para MEV foram preparadas conforme descrito no tópico 4. 2. 1. O ensaio foi realizado em duplicata.

4. 4. 4 Concentração inibitória mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) do extrato bruto produzido pela actinobactéria LMAF foi mensurada através do método de microdiluição em caldo de acordo com orientações do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais ou *Clinical*

Laboratory Standards Institute (CSLI). A microdiluição foi realizada com base nas diretrizes do protocolo M27-A3 para leveduras.

Para a microdiluição foi utilizado caldo Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Sigma-Aldrich), tamponado a pH 7 com MOPS (Sigma-Aldrich). Para preparar RPMI 1640:

- 1) Foram adicionados 34g de MOPS em caldo RPMI 1640.
- 2) O pH do caldo foi ajustado para 7 com solução de NaOH preparada logo antes do uso (4g NaOH para 100 mL de água destilada).
- 3) O caldo foi esterilizado por filtração.

As cepas de *Candida tropicalis* 750 e 950 foram cultivadas em ágar Sabouraud por 24 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Os inóculos foram ajustados em um densitômetro de McFarland (bioSan) para 1 a 5×10^3 células/mL. Para ajustar a concentração do inóculo:

- 1) Retirou-se colônias puras do crescimento em ágar Sabouraud para um tubo contendo 5 mL de salina estéril (0,85%) e posteriormente foi realizada a homogeneização.
- 2) Realizou-se a leitura espectrofotométrica e ajustou-se o inóculo para a concentração de 1 a 5×10^6 células/mL.
- 3) A primeira diluição foi realizada na proporção 1/50 (v/v) em salina estéril (0,85%).
- 4) A segunda diluição foi realizada na proporção 1/20 (v/v) em caldo RPMI 1640.

Para a realização do ensaio foram utilizadas microplacas estéreis de 96 poços com fundo em U. Foram adicionados 100 μL de caldo RPMI 1640 em cada poço, com exceção do primeiro, ao qual foi adicionado 100 μL do extrato bruto (100

mg/mL - solução 2x concentrada). Para realizar a microdiluição seriada, foram transferidos 100 µl do primeiro poço para o segundo poço e assim sucessivamente, descartando-se o volume final após o décimo poço. Posteriormente, aos poços foram adicionados 100 µl de inóculo, com exceção do décimo segundo poço, que foi utilizado para o controle de esterilidade do meio (apenas caldo RPMI 1640). O décimo primeiro poço foi utilizado para o controle positivo do crescimento fúngico (caldo RPMI 1640 + inóculo) (Figura 16). As microplacas foram incubadas por 48 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em ausência de luz. A CIM foi avaliada visualmente e foi definida como a menor concentração capaz de inibir totalmente o crescimento das leveduras. Caspofungina ($64 \mu\text{g/mL}$ - solução 2x concentrada) foi utilizada como antifúngico controle. O ensaio foi realizado em duplicata.

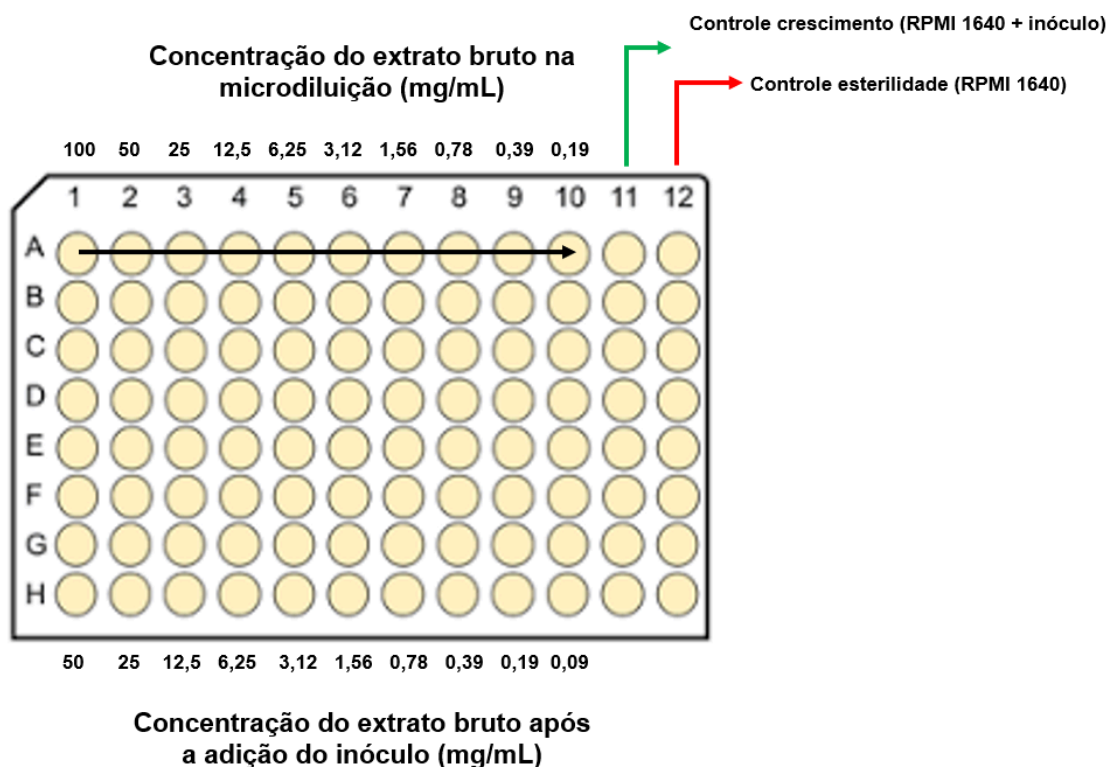


Figura 16. Metodologia do ensaio de microdiluição em caldo. Imagem adaptada pela autora.

4. 4. 5 Ensaio de proteção do sorbitol e ligação ao ergosterol exógeno

Para investigar a ação dos compostos antifúngicos produzidos pela actinobactéria LMAF sobre a parede celular e a membrana fúngica, a CIM foi avaliada contra as cepas de *Candida tropicalis* na ausência e na presença de sorbitol, protetor osmótico da parede celular, e de ergosterol exógeno. Em um meio de cultura enriquecido com sorbitol ou ergosterol espera-se que a CIM aumente, uma vez que, os compostos antifúngicos contidos no extrato bruto tenderão a se ligar com mais facilidade a estas substâncias, atingindo menos as células fúngicas, o que permitirá a multiplicação das leveduras. Os ensaios de proteção do sorbitol e ligação ao ergosterol exógeno foram realizados de acordo com Escalante *et al.* (2008).

O caldo RPMI 1640 foi suplementado separadamente com sorbitol (0.8 M) (Vetec) e ergosterol (250 µg/mL) (Sigma-Aldrich). A CIM foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, conforme descrito no tópico 4. 4. 4. Para o ensaio de proteção do sorbitol utilizou-se caspofungina (64 µg/mL - solução 2x concentrada) como controle positivo. Para o ensaio de ligação ao ergosterol exógeno utilizou-se anfotericina B (64 µg/mL - solução 2x concentrada) como controle positivo. Este ensaio foi realizado em duplicata.

4. 4. 6 Ensaio cometa

O ensaio cometa foi realizado para investigar a ação dos compostos antifúngicos produzidos pela actinobactéria LMAF sobre o DNA de *Candida tropicalis*. Este ensaio é utilizado para detectar danos primários ao DNA causados por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes, bem como danos indiretos causados por metilação e adutos. Os danos ao DNA são quantificados medindo a

porcentagem de DNA na cauda do cometa (WINGERT *et al.*, 2019), conforme ilustra a figura 17. O ensaio cometa foi realizado em parceria com o Laboratório de pesquisa em Toxicologia Ambiental, Experimental, Ocupacional e Nanotoxicologia (LATOX) da UFRGS (<https://www.instagram.com/latox.ufrgs/>) de acordo com a metodologia descrita por Conte *et al.* (2022) com algumas modificações.

Candida tropicalis 950 foi cultivada em ágar Sabouraud por 48 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. O inóculo fúngico (1 a 5×10^6 células/mL) foi misturado com o extrato bruto (100 mg/mL) na proporção 1:1 e subseqüentemente incubado por 48 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Como controle negativo, o inóculo fúngico foi incubado com solução salina estéril (0,85%). Após a incubação as células fúngicas foram separadas por centrifugação e lavadas com solução salina estéril.

As células fúngicas foram recuperadas com tripsina/EDTA (0,5%) e centrifugadas a $400 \times g$ por 5 min (4°C). Os pellets foram suspensos em 150 μL de agarose de baixo ponto de fusão (0,75%) e alíquotas de 100 μL foram pipetadas em duas lâminas pré-revestidas com agarose padrão (1%). As lâminas foram incubadas em solução de lise, por pelo menos 24 horas, a 4°C no escuro. Para preparar a solução de lise é necessário:

- 1) Pesar 146,1 g NaCl (2.5 M), 37,2 g EDTA (100 mM) e 1,2 g Tris (10 mM).
- 2) Adicionar 700 mL de água destilada e ajustar o pH com NaOH ou HCl para 10 - 10,5
- 3) Completar o volume para 1000 mL de água destilada e armazenar a solução a 4°C por até um mês.
- 4) No momento do uso (para cada 100 mL) misturar em 89 mL de solução, 1 mL de Triton X-100 (1%) e 10 mL DMSO (10%).

Previamente à eletroforese, as lâminas foram então incubadas em tampão alcalino (EDTA 1 mM e NaOH 300 mM - pH 13) por 20 min a 4°C. Posteriormente foi realizada a eletroforese, por 20 min a 25 V e 300 mA. Em seguida, as lâminas foram neutralizadas com Tris-HCl 0,4 M por 15 min no escuro. O DNA foi fixado em álcool absoluto por 5 min e deixado secar durante a noite. Para análise microscópica, as lâminas foram coradas com GelRed® (20 µg/mL). Em um microscópio de fluorescência (Olympus IX71), equipado com filtro de excitação de 510-550 nm, a migração de DNA foi observada em pelo menos 100 células. As imagens foram avaliadas pelo Comet Score™ e a porcentagem de DNA na cauda do cometa foi mensurada.

Para avaliar a citotoxicidade, foi utilizado o teste de difusão de DNA de baixo peso molecular ou *low molecular weight (LMW) DNA diffusion test*. Ele detecta quebras pré-letais de DNA causadas por compostos citotóxicos, ajudando a verificar se as respostas dos cometas são afetadas apenas pela citotoxicidade, evitando resultados falsos negativos/positivos devido à formação de compostos citotóxicos (WINGERT *et al.*, 2019). Para tanto, uma lâmina de cometa idêntica foi preparada conforme descrito acima, lisada, imediatamente fixada e corada, sem passar pela eletroforese.

Os géis foram preparados em três experimentos independentes com cada concentração testada em duas réplicas dentro de cada experimento. A normalidade da distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. A significância foi aceita em $p < 0,05$. As comparações estatísticas entre os grupos foram realizadas por ANOVA unidirecional quando os dados seguiram distribuição normal, ou pelo teste de Kruskal-Wallis, no caso de distribuição não normal dos dados.

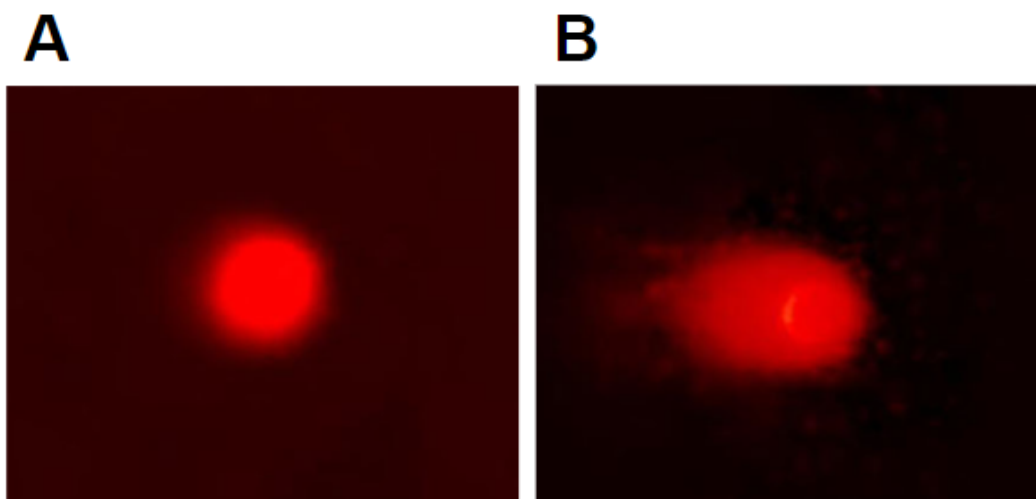


Figura 17. Ilustração de resultados para o ensaio cometa. (A) célula controle e (B) danos ao DNA da célula resultam na formação de uma cauda que se assemelha à forma de um cometa. Imagem adaptada de (MAHENDRAN *et al.*, 2021).

5. ARTIGOS

O artigo 1 desta tese (tópico 5. 1), intitulado “*Exploring the Trends in Actinobacteria as Biological Control Agents of Phytopathogenic Fungi: A (Mini)-Review*”, publicado em 12 de janeiro de 2024 pela revista [Indian Journal of Microbiology](#), têm como tema as espécies de actinobactérias que vem sendo estudadas nos últimos anos como agentes de controle biológico contra fungos fitopatogênicos e os mecanismos de atividade antifúngica por elas desenvolvidos. O manuscrito pode ser acessado para leitura no seguinte link <https://doi.org/10.1007/s12088-023-01166-6>.

O artigo 2 desta tese (tópico 5. 2) concentra-se na classificação taxonômica e nos ensaios de bioprospecção de uma nova cepa de actinobactéria com atividade contra fungos fitopatogênicos para o trigo, principalmente contra o fungo *Bipolaris sorokiniana*.

No tópico 5. 3, são apresentados os resultados que não foram incluídos no formato de artigo. Nesse tópico, foram incluídos resultados preliminares referentes aos ensaios de predição dos mecanismos de ação do extrato bruto secretado pela actinobactéria LMAF. Esses dados serão fundamentais para a síntese do artigo 3.

6. DISCUSSÃO GERAL

Os malefícios da utilização de agrotóxicos como única estratégia de manejo de doenças nas lavouras já são bem conhecidos. O controle biológico é uma estratégia agroecológica que ganha destaque, principalmente, frente à preocupação gerada pelas grandes mudanças climáticas. Os estudos envolvendo actinobactérias como agentes de controle biológico de fungos fitopatógenos vem aumentando com o passar dos anos. É cada vez mais evidente que a preservação do meio ambiente como um todo é crucial para que possamos nos adaptar e perseverar às novas condições ambientais que surgirão daqui para frente.

De acordo com Boro *et al.* (2022), utilizar microrganismos e seus metabólitos como estratégia de promoção de crescimento de plantas tem suas vantagens e desvantagens. Os agentes de controle biológico microbianos são considerados alvo específico. Os seus metabólitos podem ser utilizados em menor quantidade e também são degradados mais rapidamente. No entanto, as populações patogênicas podem se adaptar ao uso contínuo das mesmas espécies de agentes de controle microbiano e assim tornarem-se resistentes aos seus mecanismos de ação antagônicos. As características latentes de alguns agentes de controle biológico e a sua suscetibilidade às condições abióticas podem diminuir a sua eficiência e principalmente, os custos mais elevados dos biofertilizantes microbianos em comparação aos fertilizantes químicos podem tornar essa estratégia menos atrativa.

Os impactos ambientais causados pelos agrotóxicos, as perdas econômicas relacionadas às doenças fúngicas nas lavouras, as mudanças climáticas recentes e tanto as vantagens quanto às desvantagens atreladas ao uso

de agentes de controle biológico e seus metabólitos naturais como estratégia de manejo de doenças justificam o contínuo estudo sobre biocontrole.

Neste trabalho buscamos uma nova cepa de actinobactéria para ser utilizada como agente de controle biológico contra fungos fitopatogênicos para o trigo. A actinobactéria, isolada da rizosfera de uma pitangueira, que vive dentro do campus centro da nossa universidade, demonstrou um potencial muito interessante para ser utilizada como uma bactéria promotora de crescimento.

A actinobactéria LMAF, caracterizada morfológicamente como uma *Streptomyces* e identificada como pertencente à espécie *Streptomyces avidinii*, inibiu dois importantes fungos patogênicos para o trigo. Atualmente, o fungo *Fusarium graminearum* é o principal patógeno fúngico do trigo na região Sul do Brasil, que concentra 90% da produção de trigo do nosso país (TIBOLA; FERNANDES, 2020). O fungo *Bipolaris sorokiniana* continua sendo um potente patógeno de sementes de trigo (SIMÓN; BÖRNER; STRUIK, 2021).

A actinobactéria *S. avidinii* cepa LMAF se adaptou bem às condições de crescimento no laboratório. Ela cresceu muito bem no mesmo meio de cultura (água batata dextrose) e nas mesmas temperaturas (25, 28 e 30°C) em que os fungos fitopatogênicos são cultivados, o que foi positivo para a seleção inicial. A morfologia e a micromorfologia da actinobactéria *S. avidinii* cepa LMAF é característica de actinobactérias do gênero das *Streptomyces* e tanto a identificação fenotípica (MALDI TOF), quanto a identificação genotípica (16s rRNA), culminaram no mesmo resultado. Determinar a espécie da actinobactéria LMAF foi muito importante para as análises decorrentes.

A actinobactéria *S. avidinii* cepa LMAF não produziu sideróforos e não foi capaz de solubilizar fosfato em condições laboratoriais, entretanto foi capaz de

produzir auxinas. Por este resultado, acreditamos que *S. avidinii* cepa LMAF tem potencial para ser utilizada como uma bactéria multifuncional, tanto por sua atividade antagônica frente aos fungos patogênicos quanto pela capacidade de produzir compostos que estimulam o crescimento das plantas.

Em relação ao controle biológico, outros microrganismos patogênicos (fungos e bactérias) podem ser testados contra *S. avidinii* cepa LMAF e mais análises de solubilização de minerais devem ser realizadas. Quanto mais exploramos sua maquinaria enzimática, melhor iremos conduzir sua aplicação à campo.

Os efeitos inibitórios causados pelas actinobactérias aos conídios e as hifas dos fungos *Fusarium graminearum* e *Bipolaris sorokiniana* foram visualmente diferentes. A ação das actinobactérias *Streptomyces* sp. R(18)6 e *Streptomyces avidinii* cepa LMAF causaram intumescimento e deformações superficiais no micélio de *B. sorokiniana*. Em *F. graminearum* observamos a formação de esferas na superfície das hifas. Essas esferas, vistas através da microscopia eletrônica de varredura, são os pontos negros visualizados na microscopia óptica, e podem ser resultado da granulação do citoplasma da célula fúngica (JING *et al.*, 2020).

Com base em que a atividade antimicrobiana das actinobactérias está geralmente relacionada com a produção de metabólitos secundários com ação antibiótica (MITRA *et al.*, 2022) podemos pensar sobre algumas hipóteses. A primeira é que as *Streptomyces* produzem mais de um composto com ação antifúngica e por esse motivo os efeitos sobre as microestruturas fúngicas são diferentes. A segunda hipótese é que a atividade dos compostos antifúngicos produzidos pelas actinobactérias tem relação direta com a espécie do fungo, uma vez que ambas *Streptomyces* causaram um tipo de deformação no micélio de *B.*

sorokiniana e outro tipo de deformação no micélio de *F. graminearum*. Como até o presente momento o nosso grupo de pesquisa não conseguiu identificar a espécie da *Streptomyces* sp. R(18)6, não pudemos confirmar a hipótese de que diferentes espécies de *Streptomyces* causam o mesmo efeito em uma determinada espécie fúngica.

Como o fungo *Bipolaris sorokiniana* é um fitopatógeno de ocorrência frequente em sementes, priorizamos realizar a microbiolização das sementes de trigo, buscando uma medida protetiva para a contaminação fúngica. Neste trabalho realizamos a microbiolização das sementes com a actinobactéria *S. avidinii* cepa LMAF por quatro horas e a contaminação com o isolado de *B. sorokiniana* BIS98034P por dezesseis horas. O ensaio de microbiolização realizado não foi capaz de inibir a infecção das sementes. O isolado BIS98034P é bem agressivo e por esse motivo foi escolhido para o ensaio. No entanto, os tempos utilizados para realizar a microbiolização das sementes com actinobactérias e posteriormente contaminá-las com fungos patogênicos divergem entre os autores (ALLALI *et al.*, 2019; MONTEIRO; BORBA; VAN DER SAND, 2017). Como este ensaio ainda não está bem delineado, optamos por fazer uma pausa e investigar primeiramente a dinâmica de colonização das sementes de trigo pela actinobactéria *S. avidinii* cepa LMAF.

Por meio de uma curva de microbiolização observamos que *S. avidinii* cepa LMAF pode ser uma actinobactéria endofítica de trigo. A curva de microbiolização das sementes de trigo foi executada entre 24 a 96 horas e em cada ponto avaliamos o interior das sementes. No ponto 96 horas observamos o crescimento de colônias características de *Streptomyces* em ágar batata e também, através da microscopia eletrônica de varredura, observamos o surgimento de uma

estrutura micelial entre os cloroplastos das sementes. Para definirmos se *S. avidinii* cepa LMAF é de fato endofítica precisamos aumentar o tempo de microbiolização das sementes e também avaliar sua presença em outros tecidos das plantas de trigo. Caso *S. avidinii* cepa LMAF possua essa característica os ensaios protetivos devem ser delineados objetivando uma nova proposta para a sua aplicação como agente de controle biológico, uma vez que bactérias endofíticas são consideradas importantes elicitores do sistema de defesa imunológico das plantas (PATEL; MADAAN; ARCHANA, 2018).

Na segunda etapa deste trabalho, confirmamos que a actinobactéria *S. avidinii* cepa LMAF secreta metabólitos com atividade antifúngica. A actinobactéria foi cultivada em condições que foram atestadas anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa como boas para produção de metabólitos secundários (caldo amido caseína, temperatura de 28°C) (DE OLIVEIRA; DA SILVA; VAN DER SAND, 2010). A curva de tempo para determinar o início da secreção dos metabólitos antifúngicos foi realizada por outro estudante do grupo de pesquisa, em seu trabalho de mestrado (dados ainda não publicados). O extrato bruto exibiu atividade antifúngica a partir do sexto dia e definimos sete dias como tempo de incubação padrão.

A atividade antifúngica do extrato bruto formou um halo de inibição de crescimento contra *Bipolaris sorokiniana*. Entretanto, não conseguimos realizar nenhuma avaliação sobre os mecanismos de ação dos metabólitos contra esse fungo. Acreditamos que houveram erros na execução dos ensaios ou talvez as metodologias precisem sofrer adaptações. Testamos a atividade do extrato bruto frente aos isolados de *Candida tropicalis* 750 e 950 e também observamos inibição do crescimento dessas leveduras. De acordo com Ordaya; Clement e Vergidis (2023) 90% das infecções humanas causadas por fungos leveduriformes provém de

um grupo com cinco representantes: *Candida albicans*, *Nakaseomyces glabrata* (anteriormente denominada *Candida glabrata*), *Candida parapsilosis*, *Pichia kudriavzevii* (anteriormente denominada *Candida krusei*) e *Candida tropicalis*. Logo, os metabólitos produzidos pela actinobactéria *S. avidinii* cepa LMAF demonstraram atividade contra uma espécie patogênica de grande importância clínica.

A biotina, também denominada vitamina H, é uma vitamina solúvel em água que funciona como grupo prostético (co-fator não-proteico) de carboxilases. A biotina é um nutriente essencial para a maioria das espécies de leveduras (PIRNER; STOLZ, 2006). A espécie *Streptomyces avidinii* é conhecida por produzir a estreptavidina, uma molécula ligante de biotina que foi originalmente isolada como um composto antibiótico (LAITINEN *et al.*, 2021), uma vez que a captura da biotina pela estreptavidina torna a vitamina indisponível para os microrganismos (CHALET; WOLF, 1964). Acreditamos que a actinobactéria *S. avidinii* cepa LMAF possivelmente produza estreptavidina e que esse seja um mecanismo de ação antifúngica executado por ela contra *Candida tropicalis* e também contra os outros fungos fitopatogênicos que por ela foram inibidos.

Sabendo que o tamanho da estreptavidina é 60 kDa (CHALET; WOLF, 1964) podemos definir o tamanho da coluna cromatográfica de separação e purificação para isolar a estreptavidina e assim confirmar sua expressão. Como as actinobactérias são conhecidas por produzirem uma gama de metabólitos secundários que possuem atividade antibiótica e como acreditamos que *S. avidinii* cepa LMAF pode produzir outros compostos antibióticos além da estreptavidina, utilizamos três ensaios de predição de mecanismos da ação antifúngica do extrato bruto, com o objetivo de relacionar a atividade antifúngica do extrato bruto com

antifúngicos de classes já conhecidas. Com base nos resultados desses ensaios poderíamos definir o tamanho de outras colunas cromatográficas.

Visualmente, os metabólitos antifúngicos produzidos por *S. avidinii* cepa LMAF causaram efeitos mais parecidos com os efeitos causados pela caspofungina (um antifúngico da classe das equinocandinas que age sobre a parede celular dos fungos) do que os efeitos causados pela anfotericina B (um antifúngico da classe dos polienos que age sobre o ergosterol da membrana celular fúngica). De acordo com (SZYMAŃSKI *et al.*, 2022) as equinocandinas são fungistáticas para os fungos do gênero *Aspergillus* e no ensaio de atividade antifúngica (actinobactéria vs fungos fitopatogênicos) a actinobactéria *S. avidinii* cepa LMAF não apresentou atividade contra os isolados de *Aspergillus niger*. Logo, acreditamos que, mesmo com efeitos visualmente parecidos com os causados pela caspofungina, os metabólitos com atividade antifúngica produzidos por *S. avidinii* cepa LMAF não pertencem à classe das equinocandinas.

Os ensaios de proteção do sorbitol e ligação ao ergosterol exógeno demonstraram que os metabólitos antifúngicos produzidos por *S. avidinii* LMAF não tem como alvo a parede ou o ergosterol da membrana celular fúngica. Aqui podemos levantar algumas hipóteses.

Ensaio de proteção do sorbitol - os metabólitos podem sim ter efeito sobre a parede celular das leveduras, levando em consideração a comparação visual da caspofungina com o extrato bruto, porém não são produzidos em concentrações suficientes para serem detectados pelo teste de proteção com sorbitol, ou os metabólitos não tem nenhum efeito sobre a parede celular fúngica e as deformações nas células fúngicas observadas por microscopia óptica não estão relacionadas com ação sobre a parede.

Ensaio de ligação ao ergosterol exógeno - a concentração inibitória mínima da anfotericina B foi menor na presença de ergosterol do que na ausência dele, o que demonstra que a concentração de ergosterol exógeno utilizada no ensaio (250 µg/mL) não foi suficiente para proteger as células das leveduras da ação da anfotericina B. Como a anfotericina B é utilizada como controle desse teste, o ideal seria aumentar a concentração de ergosterol até conseguirmos obter o efeito protetivo. Infelizmente, até a defesa deste trabalho não conseguimos repetir esta análise. Em circunstância onde ignoramos o controle do teste e avaliamos apenas a concentração inibitória mínima do extrato bruto, podemos inferir que o extrato bruto não tem ação sobre o ergosterol da membrana, visto que a concentração inibitória mínima se manteve igual na ausência e na presença do ergosterol exógeno.

Através do ensaio cometa, inferimos que o extrato bruto não causou danos ao DNA das células de *Candida tropicalis*. Embora a quantidade de células seja menor no tratamento com o extrato bruto, muito provavelmente por sua ação antifúngica, os metabólitos antifúngicos produzidos por *S. avidinii* cepa LMAF não parecem ter ação genotóxica. Esse resultado é promissor, pois exclui antifúngicos com ação sobre o DNA, dinamicamente mais difíceis de serem aplicados nos tratamentos clínicos.

Por fim, os resultados dos ensaios de predição de mecanismos de ação antifúngica do extrato bruto poderão ser utilizados para a produção de um terceiro manuscrito, mas para que a discussão possa ser robusta precisamos repetir o ensaio de ligação ao ergosterol exógeno com diferentes concentrações de ergosterol e também realizar mais ensaios sobre o tema.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho conseguimos realizar a bioprospecção de uma nova actinobactéria com ação antifúngica *in vitro* contra fungos patogênicos para o trigo, incluindo *Bipolaris sorokiniana*. Também verificamos que a actinobactéria secreta metabólitos que inibem o crescimento de *Candida tropicalis*, uma levedura patogênica de grande importância clínica.

Identificamos a actinobactéria LMAF como *Streptomyces avidinii*. Uma espécie de *Streptomyces* conhecida por produzir estreptavidina, uma molécula que possui atividade antibiótica. Além da atividade antifúngica, *Streptomyces avidinii* cepa LMAF produz ácido indol acético, o que demonstra seu potencial para ser aplicada como uma bactéria promotora de crescimento de plantas multifuncional.

Até o presente momento, não conseguimos identificar os mecanismos de ação dos metabólitos antifúngicos secretados por *S. avidinii* cepa LMAF. Novas análises devem ser realizadas pelo nosso grupo de pesquisa. Os próximos passos envolvem o sequenciamento do genoma desta cepa, visto que *Streptomyces avidinii* cepa LMAF vem apresentando excelentes resultados em relação a inibição de microrganismos patogênicos e produção de metabólitos secundários de interesse biotecnológico em trabalhos desenvolvidos paralelamente.

8. REFERÊNCIAS

Allali K, *et al.* 2019. *Nocardiosis dassonvillei* strain MB22 from the Algerian Sahara promotes wheat seedlings growth and potentially controls the common root rot pathogen *Bipolaris sorokiniana*. *Journal of plant pathology: an international journal of the Italian Phytopathological Society*. 101(4):1115–1125. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00347-x>.

Aris P, *et al.* 2022. Griseofulvin: an updated overview of old and current knowledge. *Molecules*. 27(20). <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27207034>.

Barka EA, *et al.* 2016. Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*. 80(1):1–43. <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>.

Beneduzi A, *et al.* 2008. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in south Brazil. *Applied soil ecology: a section of Agriculture, Ecosystems & Environment*. 39(3):311–320. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2008.01.006>

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 10.375, de 26 de maio de 2020. Institui o Programa Nacional de Bioinsumos e o Conselho Estratégico do Programa Nacional de Bioinsumos. *Diário Oficial da União*. 27 de maio de 2020, p. 105 a 106.

Boro M, *et al.* 2022. Microorganisms in biological control strategies to manage microbial plant pathogens: a review. *Archives of microbiology*. 204(11):666. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-022-03279-w>.

Carolus H, *et al.* 2020. Amphotericin B and other polyenes-discovery, clinical use, mode of action and drug resistance. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*. 6(4). <http://dx.doi.org/10.3390/jof6040321>.

Chai Y, *et al.* 2022. Multi-peril pathogen risks to global wheat production: a probabilistic loss and investment assessment. *Frontiers in plant science*. 13: 1034600. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2022.1034600>.

Chalet L, WOLF J. 1964. The properties of streptavidin, a biotin-binding protein produced by *Streptomyces*. *Archives of biochemistry and biophysics* (106):1–5.

CLOROTALONIL. Clorotalonil. Registrante/Formulador NORTOX S/A. 2022. Bula de defensivo agrícola. Disponível em: https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/2023-05/clorotalonil_nortox.pdf. Acesso em: 20 fev. 2024.

COMET®. Piraclostrobrina. Registrante/Formulador BASF S.A. 2023. Bula de defensivo agrícola. Disponível em: https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/2023-05/comet.pdf. Acesso em: 20 fev. 2024.

Conte FM, *et al.* 2022. Toxicity of pesticides widely applied on soybean cultivation: synergistic effects of fipronil, glyphosate and imidacloprid in HepG2 cells. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA.* 84:105446. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2022.105446>.

de Oliveira MF, da Silva, MG, Van Der Sand, ST. 2010. Anti-phytopathogen potential of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in southern Brazil, and characterization of *Streptomyces* sp. R18(6), a potential biocontrol agent. *Research in microbiology.*61(7):565–572. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2010.05.008>.

de Sousa T, *et al.* 2021. The 10,000-Year Success Story of Wheat!. *Foods* (Basel, Switzerland). 10(9). <http://dx.doi.org/10.3390/foods10092124>.

Djemouai N, *et al.* 2023. Actinobacteria: an underestimated source of potential microbial biocontrol agents against *Fusarium*-related diseases in cultivated crops. *European journal of plant pathology / European Foundation for Plant Pathology.* <https://doi.org/10.1007/s10658-023-02737-5>.

Edwards U, *et al.* 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic acids research.* 17(19):7843–7853. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/17.19.7843>.

Escalante A, *et al.* 2008. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. *Journal of natural products.* 71(10):1720–1725. <http://dx.doi.org/10.1021/np070660i>.

FORBES. Agro brasileiro vê PIB encolher em 2023, mas exportações encaminham para recorde. 2023. Disponível em:<Agro brasileiro vê PIB encolher em 2023, mas exportações caminham para recorde - Forbes>. Acesso em 15 jan. 2024.

Garcia A. 1999. Fungicidas I: utilização no controle químico de doenças e sua ação contra fitopatógenos. EMBRAPA-CPAF. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/704072/1/FOL59930001.pdf>>. Acesso em: 12 fev. 2024.

Gómez ÁG, Ramos FA, Sinuco DC. 2021. Screening of volatile organic compounds from actinobacteria for the control of phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Biocontrol science and technology.* 31(10):1067–1079. <https://doi.org/10.1080/09583157.2021.1918635>.

Ipek Kurtböke D. 2022. Correct interpretation of actinomycete imagery using scanning electron microscopy. *Microbiology Australia.* 43(1):28–31. <http://dx.doi.org/10.1071/MA22009>.

Ivanova V, *et al.* 2010. Structural elucidation of a bioactive metabolites produced by *Streptomyces Avidinii* SB9 strain, isolated from permafrost soil in Spitsbergen, Arctic. *Biotechnology, biotechnological equipment.* 24(4):2092–2095.

<https://doi.org/10.2478/V10133-010-0080-9>.

Jing T, *et al.* 2020. Newly isolated *Streptomyces* sp. JBS5-6 as a potential biocontrol agent to control banana *Fusarium* wilt: genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles. *Frontiers in microbiology*. 11:602591. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.602591>.

JORNAL NACIONAL. **Recorde de exportações impulsiona outros números da economia do Brasil, dizem os especialistas**. 2023. Disponível em:<Recorde de exportações impulsiona outros números da economia do Brasil, dizem especialistas | Jornal Nacional | G1 (globo.com)>. Acesso em 15 jan 2024.

Karam D, *et al.* 2015. Agrotóxicos. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Milho e Sorgo. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <doc192.pdf (embrapa.br)>. Acesso em: 29 fev. 2024

Kouomou PFD, *et al.* 2019. Evaluation of antagonistic activities against *Pythium myriotylum* and plant growth promoting traits of *Streptomyces* isolated from cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott) rhizosphere. *Australian journal of crop science*. 13(6):920–933. <https://doi: 10.21475/ajcs.19.13.06.p1670>.

Laitinen OH, *et al.* 2021. Bacterial avidins are a widely distributed protein family in Actinobacteria, Proteobacteria and Bacteroidetes. *BMC ecology and evolution*. 21(1):53. <http://dx.doi.org/10.1186/s12862-021-01784-y>.

Lopes CVA, Albuquerque GSC de. 2018. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. *Saúde em Debate*. 42(117):518–534. <https://doi.org/10.1590/0103-1104201811714> .

Mahendran D, *et al.* 2021. Efficient antibacterial/biofilm, anti-cancer and photocatalytic potential of titanium dioxide nanocatalysts green synthesised using *Gloriosa superba* rhizome extract. *Journal of Experimental Nanoscience*. 16(1):11–30. <https://doi.org/10.1080/17458080.2021.1872781>.

Manamgoda DS, *et al.* 2014. The genus *Bipolaris*. *Studies in mycology*. 79:221–288. <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2014.10.002>.

MANCOZEB. Mancozeb. Registrante/Formulador NORTOX S/A. 2022. Bula de defensivo agrícola. Disponível em: <https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/2023-03/mancozebnortox.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2024.

Mitra D, *et al.* 2022. Actinobacteria-enhanced plant growth, nutrient acquisition, and crop protection: advances in soil, plant, and microbial multifactorial interactions. *Pedosphere*. 32(1):149–170. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1002016021600425>.

Monteiro P, Borba M, Van Der Sand ST. 2017. Evaluation of the antifungal activity of *Streptomyces* sp. on *Bipolaris sorokiniana* and the growth promotion of wheat plants. *Journal of Agricultural Science*. 9(12):229. <https://doi.org/10.5539/jas.v9n12p229>

Odds FC, Brown AJP, Gow NAR. 2003. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends in microbiology*. 11(6):272–279. [http://dx.doi.org/10.1016/s0966-842x\(03\)00117-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0966-842x(03)00117-3).

Ordaya EE, Clement J, Vergidis P. 2023. The role of novel antifungals in the management of candidiasis: a clinical perspective. *Mycopathologia*. 188(6):937–948. <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-023-00759-5>.

Patel JK, Madaan S, Archana G. 2018. Antibiotic producing endophytic *Streptomyces* spp. colonize above-ground plant parts and promote shoot growth in multiple healthy and pathogen-challenged cereal crops. *Microbiological research*. 215:36–45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2018.06.003>.

Pereira BFM, *et al.* 2022. Contaminação no lençol freático, rios, lagos e lagoas do Brasil por agrotóxicos. *Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação*. 8(7):863–874. <http://dx.doi.org/10.51891/rease.v8i7.6235>.

Perelló A, *et al.* 2003. Biocontrol efficacy of *Trichoderma* isolates for tan spot of wheat in Argentina. *Crop protection*. 22(9):1099–1106. doi: 10.3390/pathogens12070936.

Pires JLF, *et al.* 2014. Sistema de Produção Cultivo de Trigo. EMBRAPA. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1155370>>. Acesso em: 29 fev. 2024

Pirner HM, Stolz J. 2006. Biotin sensing in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by a conserved DNA element and requires the activity of biotin-protein ligase. *The Journal of biological chemistry*. 281(18):12381–12389. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M511075200>.

Quinn GA, *et al.* 2020. *Streptomyces* from traditional medicine: sources of new innovations in antibiotic discovery. *Journal of medical microbiology*. 69(8):1040–1048. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.001232>.

Różewicz M, Wyzińska M, Grabiński J. 2021. The most important fungal diseases of cereals—problems and possible solutions. *Agronomy*. 11(4):714. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040714>.

Scheeren PL, de Castro RL, Caeirão E. 2015. Botânica, morfologia e descrição fenotípica. *Em: trigo: do plantio à colheita*. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1022686>: UFV, 2015. p. cap. 2, p. 35–55>. Acesso em: 29 fev. 2024.

Schwyn B, Neilands JB. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry*. 160(1): 47–56. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9).

Shafiei M, *et al.* 2020. History of the development of antifungal azoles: a review on structures, SAR, and mechanism of action. *Bioorganic chemistry*. 104:104240. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104240>.

- Shao Y, *et al.* 2022. Sordarin - An anti-fungal antibiotic with a unique modus operandi. *British journal of pharmacology*. 179(6):1125–1145. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.15724>.
- Shirling EB, Gottlieb D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International journal of systematic bacteriology*. 16(3): 313–340. <https://doi.org/10.1099/00207713-16-3-313>
- Simón MR, Börner A, Struik PC. 2021. Editorial: fungal wheat diseases: etiology, breeding, and integrated management. *Frontiers in plant science*. 12:671060. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2021.671060>.
- Simón MR, Struik PC, Börner A. 2023. Editorial: fungal wheat diseases: etiology, breeding, and integrated management, volume II. *Frontiers in plant science*. 14:1247327. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls, 2023.1247327>.
- Syed Ab Rahman SF, *et al.* 2018. Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant science: an international journal of experimental plant biology*. 267:102–111. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci, 2017.11.012>.
- Sylvester-Bradley R, *et al.* 1982. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. *ACTA AMAZÔNICA*. 12(1):15–22. <http://dx.doi.org/10.1590/1809-43921982121015> .
- Szymański M, *et al.* 2022. Echinocandins - structure, mechanism of action and use in antifungal therapy. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 37(1):876–894. <http://dx.doi.org/10.1080/14756366.2022.2050224>.
- TEBUCONAZOLE CCAB 200 EC®. Tebuconazole. Registrante/Formulador CCAB AGRO S.A. Bula de defensivo agrícola. Disponível em: <https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/2020-10/tebuconazole_ccab_ec_240719.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2024.
- Teregulova GA, *et al.* 2023. Evaluation of chitinolytic and antibiotic activity of *Streptomyces avidinii* Ina 01467 and *Micromonospora aurantiaca* INA 01468. *Eurasian Soil Science*. 56(5):611–618. <https://doi.org/10.1134/S1064229323600094>
- Thampi A, Bhai RS. 2017. Rhizosphere actinobacteria for combating *Phytophthora capsici* and *Sclerotium rolfsii*, the major soil borne pathogens of black pepper (*Piper nigrum* L.). *Biological control: theory and applications in pest management*. 109:1–13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.03.006>.
- Tibola CS, Fernandes JMC (org.). 2020. Micotoxinas no trigo: estratégias de manejo para minimizar a contaminação. EMBRAPA. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1131324>>. Acesso em: 24 fev. 2024.
- Tostado L, Bollmohr S. 2022. Pesticide Atlas 2022. Heinrich-Böll-Stiftung. Disponível em: <[Pestizidatlas 2022 | Heinrich-Böll-Stiftung \(boell.de\)](https://www.pestizidatlas.de/)>. Acesso em: 24 fev. 2024.

Vekic AM, Resende DO. 2021. Cartilha do agricultor. O uso correto dos agrotóxicos na cultura do trigo. Associação brasileira da indústria do Trigo. Disponível em: <<https://www.abitrigo.com.br/wp-content/uploads/2019/08/cartilha-Agroquimico-2021.pdf>>. Acesso em: 24 fev. 2024

Vidal MC, *et al.* 2021. Bioinsumos: a construção de um programa nacional pela sustentabilidade do agro brasileiro. *International review of law and economics*. 12(3):557–574. <https://doi.org/10.31501/ealr.v12i3.12811>.

Vidal MC, Dias RP. 2023. O Programa Nacional de Bioinsumos no âmbito da Política Nacional de Agroecologia e produção orgânica : origem, contribuições e potencialidades. Ipea. <https://doi.org/10.33240/rba.v18i1.23735>.

Wingert NR, *et al.* 2019. In vitro toxicity assessment of rivaroxaban degradation products and kinetic evaluation to decay process. *Drug and chemical toxicology*. 42(5):509–518. <http://dx.doi.org/10.1080/01480545.2018.1452931>.

Yarbrough ML, Lainhart W, Burnham C-AD. 2017. Identification of *Nocardia*, *Streptomyces*, and *Tsukamurella* using MALDI-TOF MS with the Bruker Biotyper. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 89(2):92–97. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.06.019>.

Zeng Q, *et al.* 2017. Phosphate solubilization and gene expression of phosphate-solubilizing bacterium *Burkholderia multivorans* WS-FJ9 under different levels of soluble phosphate. *Journal of microbiology and biotechnology*. 27(4):844–855. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1611.11057>.