

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

LAÍS ROCHA DE SÁ

**PRODUÇÃO OTIMIZADA DE ÁCIDO PENICÍLICO PELO FUNGO *Penicillium*
rolfsii COM APLICAÇÃO EM FITOPATÓGENOS CAUSADORES DE DOENÇAS
EM *Phaseolus vulgaris* L.**

CAMPO GRANDE - MS

2024

LAÍS ROCHA DE SÁ

PRODUÇÃO OTIMIZADA DE ÁCIDO PENICÍLICO PELO FUNGO *Penicillium rolfsii* COM APLICAÇÃO EM FITOPATÓGENOS CAUSADORES DE DOENÇAS EM *Phaseolus vulgaris* L.

Dissertação apresentada ao programa Multicêntrico de Bioquímica e Biologia Molecular (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Maria Rita Marques

Coorientadora: Denise Brentan da Silva

CAMPO GRANDE - MS

2024

*Dedico esse trabalho à minha avó Josefa, cuja
força e a sede por conhecimento são uma fonte
constante de inspiração*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer às minhas orientadoras Maria Rita Marques e Denise Brentan da Silva, pela oportunidade, ensinamentos, e por acreditar no meu potencial. O conhecimento e dedicação de ambas foram essenciais para o desenvolvimento deste projeto.

Aos meus colegas do LaPNEM e Micoteca, pelos momentos de descontração e sugestões de melhorias em meus testes, principalmente as técnicas Clarice Rossato e a Nadla Cassemiro, sem vocês não teria conseguido enfrentar e superar as dificuldades desse projeto.

Aos meus pais pelo amor incondicional, pelo apoio em todos os momentos e por acreditarem em mim, mesmo quando estava em momentos de dúvidas.

Aos meus amigos Camila Sório, Brunna Roberta Lopes, Ranielly Garcia, Mariana Calarge, Lucas Vilela e Gabriel Barberiz por todo o suporte emocional, pelo incentivo e pelas distrações necessárias em momentos de dificuldades.

Aos antigos colegas do Laboratório de Genética do Campus do Pantanal (CPAN-UFMS), pelas experiências que me foram ofertadas ao longo dos anos em que fiz iniciação científica e que me preparam para chegar até aqui. Em especial agradeço a Nayara Garcia, pelos ensinamentos e apoio.

À instituição UFMS e a CAPES, por fornecer recursos necessários para a realização desta pesquisa.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, auxiliaram para a realização deste trabalho. A todos vocês, o meu mais sincero muito obrigado.

RESUMO

Com o aumento da demanda por alimentos se faz necessário otimizar a produção de alimento sem aumentar as áreas de plantio. Uma forma de atingir esse objetivo é reduzir as perdas de produção causadas por fitopatógenos de leguminosas, uma das principais fontes de carboidrato, fibras, proteínas e minerais do brasileiro. Entre as espécies mais consumidas está o *Phaseolus vulgaris* L. (feijão comum), que tem a sua produção afetada pelos fungos *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp. e *Colletotrichum lindemuthianum* e pela bactéria *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli*. Os defensivos químicos utilizados para o controle das infecções causadas por esses organismos são classificados como perigosos ao meio ambiente e já há cepas resistentes a esses compostos, por tanto é urgente procurar novos compostos que não prejudique o meio ambiente e consiga inibir a ação dos fitopatógenos. Uma alternativa são os compostos antimicrobianos produzidos por fungos endofíticos, como o ácido penicílico. Neste sentido, o objetivo desse trabalho foi produzir extrato com ácido penicílico pelo fungo endofítico *Penicillium rolfsii* 11P2F2 e avaliar a sua capacidade de inibir o crescimento dos fitopatógenos *M. phaseolina*, *R. solani*, *Fusarium* sp., *C. lindemuthianum* e *X. phaseoli* pv. *phaseoli* em ensaios *in vitro* e *in vivo* nas sementes de feijão. Esse fungo endofítico foi isolado de *Bromelia balansae* Mez. (Bromeliaceae) e em testes de confrontação por antagonismo direto contra os fitopatógenos *M. phaseolina*, *R. solani* e *Fusarium* sp., o fungo *P. rolfsii* se mostrou ineficaz. Contudo seu extrato bruto a partir do meio de cultura (Eb-Pen) contendo 270,4 µg/mL de ácido penicílico foi ativo na inibição do crescimento da bactéria *X. phaseoli* pv. *Phaseoli* e o extrato de acetato de etila (Eb-Pen-Ac) com 142 µg/mL de ácido penicílico inibiu os fungos *C. lindemuthianum*, *Fusarium* sp, e *R. solani* e inibiu a *M. phaseolina* com 284 µg/mL nos testes de microcultivo. E não foi observado inibição de germinação do feijão quando tratado com 142 até 497 µg/mL do ácido. Nos teste de sementes de feijão tratados com Eb-Pen-Ac e contaminadas com os fungos fitopatogênicos foi observado que sementes tratadas não apresentavam sintomas de infecção por *R. solani*, mesmo contaminadas. A partir dos resultados obtidos é possível sugerir o uso de ácido penicílico no combate a doenças causadas por bactérias e fungos através do tratamento de sementes, desde que em baixas concentrações.

Palavras-chave: antimicrobiano; defensivos; endofítico; feijão; tratamento de sementes.

ABSTRACT

With the increasing demand for food, it is necessary to optimize food production without expanding planting areas. One way to achieve this goal is to reduce production losses caused by phytopathogens in legumes, which are one of the main sources of carbohydrates, fiber, proteins, and minerals for Brazilians. Among the most consumed species is *Phaseolus vulgaris* L. (common bean), whose production is affected by the fungi *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp., and *Colletotrichum lindemuthianum* and by the bacterium *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli*. The chemical pesticides used to control infections caused by these organisms are classified as harmful to the environment, and resistant strains to these compounds already exist. Therefore, it is urgent to seek new compounds that do not harm the environment and can inhibit the action of phytopathogens. One alternative is the antimicrobial compounds produced by endophytic fungi, such as penicillic acid. In this context, the aim of this work was to produce an extract containing penicillic acid by the endophytic fungus *Penicillium rolfsii* 1IP2F2 and to evaluate its ability to inhibit the growth of the phytopathogens *M. phaseolina*, *R. solani*, *Fusarium* sp., *C. lindemuthianum*, and *X. phaseoli* pv. *phaseoli* in *in vitro* and *in vivo* assays on bean seeds. This endophytic fungus was isolated from *Bromelia balansae* Mez. (Bromeliaceae), and in direct antagonism confrontation tests against the phytopathogens *M. phaseolina*, *R. solani*, and *Fusarium* sp., the fungus *P. rolfsii* was ineffective. However, its crude extract from the culture medium (Eb-Pen) containing 270.4 µg/mL of penicillic acid was active in inhibiting the growth of the bacterium *X. phaseoli* pv. *phaseoli*, and the ethyl acetate extract (Eb-Pen-Ac) with 142 µg/mL of penicillic acid inhibited the fungi *C. lindemuthianum*, *Fusarium* sp., and *R. solani*, and inhibited *M. phaseolina* at 284 µg/mL in microculture tests. No inhibition of bean germination was observed when treated with 142 to 497 µg/mL of the acid. In the bean seed tests treated with Eb-Pen-Ac and contaminated with the phytopathogenic fungi, it was observed that treated seeds showed no symptoms of infection by *R. solani*, even when contaminated. From the results obtained, it is possible to suggest the use of penicillic acid in the control of diseases caused by bacteria and fungi through seed treatment, as long as it is in low concentrations.

Keywords: : antimicrobial; bean; chemical pesticides; endophytic; seed treatment.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Microescleródios (indicados pela seta) de *Rhizoctonia solani* cultivada em BDA. Fonte: autora..... 18
- Figura 2** - Ácido penicílico em equilíbrio tautomérico em soluções aquosas..... 22
- Figura 3** - Exemplo de placa do teste de antagonismo por confrontação direta do *Penicillium rolfsii* (à direita) e do fitopatógeno *Fusarium* sp. (à esquerda) na placa de Petri com BDA após 8 dias de cultivo..... 28
- Figura 4** - Disposição das sementes de *Phaseolus vulgaris* em gerbox 15x15 cm com ágar 1% utilizadas na avaliação dos extratos..... 36
- Figura 5** - Porcentagem de inibição dos fitopatógenos *R. solani*, *Fusarium* sp. e *M. phaseolina* em teste de antagonismo por confrontação direta com a cepa endofítica *P. rolfsii* 39
- Figura 6** - Registro do teste de confronto direto entre os *R. solani*, *Fusarium* sp. e *M. phaseolina* e o fungo endofítico *P. rolfsii* em BDA, após 8 dias de cultivo. Na esquerda estão as placas controles dos fitopatógenos e na direita as placas de antagonismo em confrontação direta..... 41
- Figura 7** - Produção do ácido penicílico produzido por *P. rolfsii* em 29 dias de cultivo em meios líquidos de Czapek Dox (CCD) e batata dextrose (CBD) monitorados através da análise por CLAE-DAD a 220-280 nm..... 43
- Figura 8** - Curva de calibração do ácido penicílico construída a partir da área do pico obtido em modo de ionização negativa 44
- Figura 9** - Cromatogramas de pico base obtidos em modo de ionização negativa dos extratos EB-Pen e EB-Pen-Ac de *Penicillium rolfsii* 1IP2F2..... 45
- Figura 10** - Sementes de *P. vulgaris* não viáveis. A semente A não apresenta pigmentação no embrião e no cotilédone indicando tecido sem atividade celular e a semente B apresentou cor vermelho vinho sinalizando um possível tecido em necrose..... 49
- Figura 11** - Exemplo de semente *P. vulgaris* viável, como coloração rosada a vermelha de forma uniforme pelo embrião e cotilédone..... 49
- Figura 12** - Gráfico com a média das porcentagens de germinação no 6º dia de cultivo de *P. vulgaris* com os tratamentos 2, 1 e 0,5 mg/mL de Eb-Pen-Ac e o controle. Não houve

detecção de diferença estatística pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)..... 51

Figura 13 - Gráfico com a média das medidas em cm da parte aérea e da raiz primária da plântula de *P. vulgaris* no 7º dia de cultivo em ágar 1% com os tratamentos 2, 1 e 0,5 mg/mL de Eb-Pen-Ac e o controle. As letras indicam diferença estatística entre as médias pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). As medidas da raiz e da parte aérea foram analisadas separadamente na estatística..... 52

Figura 14 - Gráfico com a média do peso verde em g da plântula de *P. vulgaris* no 7º dia de cultivo em ágar 1%. Não houve diferença estatística detectada pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).. 53

Figura 15 - Gráfico com a porcentagem de germinação de *P. vulgaris* no 6º dia de cultivo em ágar 1% em relação aos tratamentos controle (CO), contaminado com os patógenos *R. solani* (R), *Fusarium* sp. (F) e *C. lindemuthianum* (C) e com as sementes contaminadas com os patógenos e que passaram pelo tratamento com Eb-Pen-Ac (patógeno + T). As letras diferentes indicam diferença estatística entre as médias pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).....54

Figura 16 - Gráfico das medidas em cm da parte aérea e da raiz primária de plântulas de *P. vulgaris* no 7º dia de cultivo em ágar 1% em relação aos tratamentos controle (CO), contaminado com os patógenos *R. solani* (R), *Fusarium* sp. (F) e *C. lindemuthianum* (C) e com as sementes contaminadas com os patógenos e que passaram pelo tratamento com Eb-Pen-Ac (patógeno + T). Os dados da raiz e da parte aérea foram analisados estatisticamente de forma separada, as letras indicam diferença estatística entre as médias pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)..... 56

Figura 17 - Gráfico do peso úmido em g das plântulas de *P. vulgaris* no 7º dia de cultivo em ágar 1% em relação aos tratamentos controle (CO), contaminado com os patógenos *R. solani* (R), *Fusarium* sp. (F) e *C. lindemuthianum* (C) e com as sementes inoculadas com os patógenos e que passaram pelo tratamento com Eb-Pen-Ac (patógeno + T). As letras indicam diferença estatística entre as médias pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)..... 57

Figura 18 - Registro de plântulas do teste do efeito dos extratos de *P. rolfsii* sobre as sementes de *P. vulgaris* contaminadas com *R. solani*. A semente da plântula da esquerda não foi submersa em Eb-Pen-Ac e apresenta sintomas de infecção por *R. solani*, com manchas escuras no caule, plúmula e cotilédone. A plântula da direita passou pelo tratamento com Eb-Pen-Ac e foi contaminada com *R. solani*..... 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Escala de notas de porcentagens de inibição em teste de confrontação direta segundo Bell et al. (1982).....	29
Tabela 2 - Anotação dos metabólitos presentes nos extratos EB-Pen e EB-Pen-Ac analisados por CLAE-DAD-EM.....	45
Tabela 3 - Avaliação do extrato EB-Pen-Ac de <i>P. rolfsii</i> no ensaio de inibição do crescimento dos fungos fitopatogênicos.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ágar Aveia
AN	Ágar Nutriente
BDA	Batata Dextrose Ágar
CBD	Caldo Batata Dextrose
CCD	Caldo Czapek Dox
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos
CLAE-DAD-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas
CN	Caldo Nutriente
Eb	Extrato bruto
Eb-Pen	Extrato bruto de <i>Penicillium rolfsii</i> 1IP2F2
Eb-Pen-Ac	Extrato bruto de <i>Penicillium rolfsii</i> 1IP2F2 em acetato de etila
FBN	Fixação biológica de nitrogênio
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
TTC	Cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1. Feijão.....	16
2.2. Fitopatógenos.....	17
2.3. Tratamento de sementes.....	20
2.4. Metabólitos secundários de microrganismos endofíticos.....	21
2.4.1. Ácido penicílico.....	22
3. OBJETIVOS.....	24
3.1. Objetivo geral.....	24
3.2. Objetivos específicos.....	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1. Material biológico.....	25
4.2. Manutenção dos microrganismos.....	25
4.2.1. Manutenção dos fungos fitopatogênicos.....	25
4.2.2. Manutenção da bactéria <i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>phaseoli</i>	26
4.3. Identificação molecular da cepa fúngica obtida de <i>Bromelia balansae</i>	26
4.4. Testes de antagonismo por confrontação direta.....	27
4.5. Otimização da produção de ácido penicílico por <i>Penicillium rolfsii</i> 1IP2F2.....	29
4.5.1. Análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas (CLAE-DAD-EM).....	30
4.5.2. Cultivo e obtenção dos extratos de <i>Penicillium rolfsii</i> 1IP2F2.....	30
4.5.2.1. Obtenção do extrato acetato de etila de <i>Penicillium rolfsii</i> 1IP2F2.....	31
4.5.3. Análises químicas dos extratos Eb-Pen e Eb-Pen-Ac de <i>Penicillium rolfsii</i> 1IP2F2 por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas (CLAE-DAD-EM).....	31
4.6. Avaliações dos efeitos de inibição do crescimento de bactérias e fungos fitopatogênicos.....	32
4.6.1. Bactéria fitopatogênica <i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>phaseoli</i>	32
4.6.1.1. Inóculo da bactéria fitopatogênica.....	32

4.6.1.2. Avaliação dos extratos sobre a bactéria <i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>phaseoli</i>	33
4.6.2. Fungos fitopatogênicos.....	33
4.6.2.1. Inóculos dos fungos fitopatogênicos.....	33
4.6.2.2. Avaliação dos extratos em testes de inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos.....	34
4.7. Ensaios <i>in vivo</i> em sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i>	34
4.7.1. Avaliação da viabilidade das sementes <i>Phaseolus vulgaris</i>	34
4.7.2. Efeito fitotóxico dos extratos de <i>Penicillium rolfsii</i> 1IP2F2 sobre <i>Phaseolus vulgaris</i>	35
4.7.3. Efeito dos extratos de <i>Penicillium rolfsii</i> 1IP2F2 sobre as sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i> contaminadas com fitopatógenos.....	36
4.8. Análises estatísticas.....	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1. Identificação molecular da cepa fúngica obtida de <i>Bromelia balansae</i>	38
5.2. Testes de antagonismo por confrontação direta.....	38
5.3. Otimização da produção do ácido penicílico pela cepa <i>Penicillium rolfsii</i> 1IP2F.....	42
5.4. Extratos de <i>Penicillium rolfsii</i> 1IP2F2.....	43
5.4.1. Análises químicas dos extratos de <i>Penicillium rolfsii</i> 1IP2F2 por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas (CLAE-DAD-EM).....	43
5.4.2. Avaliação dos extratos em testes de inibição do crescimento de bactérias e fungos fitopatogênicos.....	47
5.4.2.1. Inibição do crescimento da bactéria fitopatogênica <i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>phaseoli</i>	47
5.4.2.2. Inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos.....	47
5.5. Avaliações em sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i>	48
5.5.1. Avaliação da viabilidade das sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i>	48
5.5.2. Efeito fitotóxico dos extratos de <i>Penicillium rolfsii</i> 1IP2F2 sobre <i>Phaseolus vulgaris</i>	50

5.5.3. Efeito dos extratos de <i>Penicillium rolfsii</i> 1IP2F2 sobre as sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i> contaminadas com fitopatógenos.....	53
6. CONCLUSÃO.....	59
7. REFERÊNCIAS.....	60

1. INTRODUÇÃO

Com o crescimento populacional, a demanda por alimentos tem aumentado significativamente. Em países em desenvolvimento, as leguminosas estão entre as principais fontes de proteínas, sendo uma opção de baixo custo para aumentar a disponibilidade de nutrientes para a população (LAKSHMEESHA *et al.*, 2020).

Os vegetais da família Fabaceae (leguminosas), além de fonte de proteína, são fonte de carboidratos, fibras alimentares, ácidos graxos poliinsaturados, vitaminas e minerais, como Ca, Cu, Fe, Mg e Mn (GULEWICZ *et al.*, 2014). A espécie *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae) - o feijão comum - está entre as leguminosas mais consumidas. Atualmente o Brasil é o maior consumidor e o segundo maior produtor de feijão do mundo (EPAGRI, 2023; CONAB, 2024). Contudo a sua produção é muito afetada por fitopatógenos; um exemplo o fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, causador da antracnose, que pode causar perdas de até 100% na produção (COSTA *et al.*, 2013). A antracnose é uma doença que causa lesões nas folhas, vagens e sementes, prejudicando a fotossíntese e a formação e qualidade das sementes da planta infectada (MOHAMMED, 2013).

Os fitopatógenos são microrganismos que afetam negativamente o desenvolvimento das plantas, produção de frutos e formação de sementes. Algumas cepas de fungos e bactérias fitopatogênicos já apresentam resistência a antimicrobianos usados para o controle da contaminação em plantações (HUNJAN; LORE, 2020). *Fusarium graminearum*, por exemplo, apresenta alta resistência ao fungicida carbendazim, muito utilizado em plantações de gramíneas para o combate de fusariose (CHAVES *et al.*, 2022). Neste contexto é urgente a busca por novos compostos para combater e prevenir as doenças causadas por esses fitopatógenos, uma vez que eles afetam a produtividade de espécies utilizadas na alimentação humana.

Uma das formas utilizadas no combate de disseminação de pragas que utiliza baixo volume de defensivos agrícolas é o tratamento de sementes a serem utilizadas no plantio, que consiste na aplicação de antimicrobianos na superfície dessas sementes previamente ao plantio (KANDEL *et al.*, 2019). Atualmente são usados antimicrobianos de origem sintética, os quais podem conter metais pesados na sua formulação e podem induzir a resistência dos fitopatógenos a tais formulações, além de contaminar o meio ambiente (VIEIRA *et al.*, 2022; BAWA, 2023).

Uma alternativa para o controle de fitopatógenos é o uso de microrganismos e dos seus também seus metabólitos secundários, os quais têm sido descritos como formas de para mitigar o efeito de estresses bióticos e abióticos em plantas (SIEBER, 2007). O primeiro metabólito com propriedades antimicrobianas produzido em larga escala foi a penicilina, produzido pelo fungo *Penicillium chrysogenum*, que foi amplamente aplicado na terapêutica humana (KARDOS; DEMAIN, 2011, SAMSON; HADLOK; STOLK, 1977). Desde então diversas moléculas com atividades antimicrobianas têm sido descobertas e utilizadas no combate aos patógenos, como a Peniciadametizine A que inibe o crescimento do fungo fitopatógeno *Alternaria brassicae* em concentração de 4 µg/mL (WANG; TANG, CAO, 2020).

Os microrganismos endofíticos são aqueles que residem no interior das plantas sem causar danos a sua hospedeira. Esses organismos são conhecidos por promover o crescimento e aumentar o mecanismo de resistência da planta contra estresses bióticos por meio da produção de bactericidas e fungicidas. Devido a essas propriedades os endofíticos têm sido alvos na busca de compostos com propriedades antimicrobianas (KARDOS; DEMAIN, 2011; HASHEM *et al.*, 2023).

Os fungos endofíticos do gênero *Xylaria* produzem, por exemplo, a sordaricina, um composto com ação antifúngica sobre *Candida albicans* (PONGCHAROEN *et al.*, 2008). Estes fungos endofíticos foram isolados de *Palicourea longiflora* DC. (Rubiaceae) e *Strychnos cogens* Benth. (Loganiaceae) e seus metabólitos apresentam ação antimicrobiana sobre *Aspergillus flavus*, *Bacillus* sp., *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Trichoderma* sp. (SOUZA *et al.*, 2004). Outros exemplos são fungos do gênero *Penicillium* isolados de plantas apresentam atividades antimicrobianas, como o *Penicillium ochrochloronthe*, isolado de *Taxus media*, produtor de derivados de α -pirona com ação antifúngica contra os fitopatógenos *Alternaria solani*, *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia cerealis*, *Colletotrichum graminicola*, *Colletotrichum gloeosporiodes* e *Sclerotinia sclerotiorum* (ZHAO *et al.*, 2018).

Um metabólito secundário que tem sido estudado por alguns autores é o ácido penicílico, produzido por algumas espécies de fungos do gênero *Penicillium*, que apresenta propriedades antibacteriana, antifúngica, anti-oomiceto e antiviral. O ácido penicílico exibiu uma redução de 75,31% da infecção causada por *Xanthomonas citri* nas folhas de *Citrus sinensis* L. na concentração de 25 µg/mL (VIEIRA *et al.*, 2022). Este metabólito também

inibiu o desenvolvimento de oomicetos fitopatogênicos do gênero *Phytophthora* em testes *in vitro* nas concentrações entre 1 e 25 µg/ml e (KANG; KIM, 2004; BAURI *et al.*, 2022). Além disso, o ácido penicílico tem mostrado efetividade na inibição do crescimento de fungos dos gêneros *Rhizoctonia*, *Gaeumannomyces*, *Alternaria*, *Colletotrichum* e *Magnaporthe*, como também ação antiviral sobre o agente causador da doença de *Newcastle*, um vírus pertencente à família Paramyxoviridae que ataca aves e causa elevadas perdas econômicas na criação (SUZUKI *et al.*, 1971; SHEN *et al.*, 2020; MAO, 2022).

Tendo em vista o potencial de controle dos fitopatógenos pelo ácido penicílico, o objetivo desse trabalho foi produzir extrato com ácido penicílico pelo fungo endofítico *Penicillium rolfsii* 1IP2F2 e avaliar a sua capacidade de inibir o crescimento dos fitopatógenos *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp., *Colletotrichum lindemuthianum* e *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* em ensaios *in vitro* e *in vivo*, bem como seus possíveis efeitos fitotóxicos em sementes de *P. vulgaris*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Feijão

O feijão comum, *Phaseolus vulgaris* L., pertence à família Fabaceae e é originário da América Central (BITOCCHI *et al.*, 2017). O Brasil é o segundo maior produtor mundial, atrás apenas da Índia (EPAGRI, 2023). A safra de 2022/23 foi de 3.036,7 mil toneladas com importação de 69,0 mil toneladas e exportação de 139,0 mil toneladas dos grãos. Entre janeiro e dezembro de 2023, no que se refere às exportações, foram destinados 41% para a Índia, 11% para o Egito e 10% para o Vietnã. Mesmo com o grande volume de exportações, o mercado brasileiro é o maior consumidor dessa leguminosa (CONAB, 2023; CONAB, 2024).

Phaseolus vulgaris se desenvolve em solos com pH neutro, contendo fósforo, cálcio e magnésio, baixas concentrações de alumínio e manganês e com mínimo de 2% de matéria orgânica. Os grãos de feijão são uma fonte acessível de proteínas, lipídios, carboidratos, oligossacarídeos, fibras e vitaminas A e B. No Brasil o plantio pode ser feito em 3 épocas diferentes, tendo três safras por ano. Na primeira o plantio vai de agosto a dezembro, a segunda de janeiro a abril e na última, a semeadura vai de maio até julho. E além da sua importância alimentícia de forma direta, o feijoeiro é usado como adubação verde por realizar simbiose com bactérias que realizam a fixação biológica de nitrogênio (FBN) (REINPRECHT *et al.*, 2020; AKHTAR *et al.* 2023; CONAB, 2024).

A FBN é um processo realizado por bactérias do gênero *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (KUMAR *et al.*, 2020). Nesse processo, enzimas nitrogenases reduzem o nitrogênio atmosférico (N_2) em amônio (NH_4), que pode ser absorvido pelas plantas, reduzindo a necessidade da aplicação de fertilizante sintético no solo, por consequência reduz os custos da produção. Essas bactérias fazem associação com plantas da família Fabaceae, contudo plantas vizinhas podem se beneficiar com o aumento da concentração de nitrogênio absorvível no solo (BELLENGER *et al.*, 2020; KEBEDE, 2021).

Mesmo com a alta produção e diversidade de épocas de plantio, a produção de feijão pode ser afetada por fatores abióticos ou bióticos. As oscilações climáticas e estresse hídrico podem prejudicar a produção de forma direta ou tornar a planta suscetível a patógenos (CONAB, 2024). Entre esses pode-se destacar os fungos *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp. e *Colletotrichum lindemuthianum*. Para esses patógenos, a recomendação é o uso de cultivares resistentes aos patógenos, rotação de culturas e uso de

sementes tratadas para a prevenção e redução do inóculo no solo, uma vez que esses agentes podem ser transmitidos via semente (WENDLAND; LOBO JUNIOR; FARIA, 2018; CANALE *et al.*, 2020).

O controle de fitopatógenos em culturas comerciais pode auxiliar no crescimento da produção reduzir a infecção na planta que prejudica a absorção de nutrientes, aumentando a produção sem a necessidade de expandir as áreas de plantio (BASHAY; DE-BASHAN, 2005). Outro ponto importante é com relação a redução de desmatamentos e preservação do meio ambiente, pois diversos autores têm destacado esse impacto na prevenção de perda da produção, uma vez que com as mudanças climáticas a tendência é aumentar a incidência de infecções causadas pelos fitopatógenos, além de problemas graves relacionados a alterações nos índices pluviométricos (LAWRENCE; VANDECAR, 2015; VIEIRA *et al.*, 2022).

2.2. Fitopatógenos

As fitopatologias podem ser causadas por diversos microrganismos, como bactérias, fungos, vírus e protozoários, os quais podem afetar tanto a produtividade de espécies vegetais quanto a qualidade de seus produtos. As doenças causadas por esses microrganismos podem gerar perdas anuais de 10 a 15%, sendo 70 a 80% dessas perdas causadas por doenças fúngicas (KASHYAP; KUMAR; SRIVASTAVA, 2016; PENG *et al.*, 2021).

No Brasil, 60% da produção de feijão é afetada pelos fungos *Colletotrichum lindemuthianum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* (PEREIRA *et al.*, 2014). Além desses, o fungo *Macrophomina phaseolina* e bactérias como a *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* também são conhecidos por afetar a produção de *P. vulgaris* (CANALE *et al.*, 2020; AKHTAR *et al.* 2023).

O fitopatógeno *M. phaseolina* é causador da podridão do carvão e em ambientes áridos pode causar perda de até 100% das safras de feijão. Esse fungo produz microescleródios que dificultam o controle dessa doença (WRATHER *et al.*, 2008; AKHTAR *et al.* 2023). Os microescleródios e escleródios diferem em relação ao tamanho, porém ambos são estruturas de resistência formadas por hifas com aparência redonda e firme que podem permanecer viáveis no solo durante anos (KIRK *et al.*, 2008; SHORT *et al.*, 2015; BRUSTOLIN; REIS; PEDRON, 2016). A infecção da planta se inicia principalmente pela raiz, quando ela entra em contato com solo contaminado (MARQUEZ *et al.*, 2021).

A podridão do carvão não afeta somente o feijão; existem registros de 500 espécies diferentes que já foram infectadas pela *M. phaseolina*. Somado a isso, os microescleródios podem permanecer viáveis no solo por até 15 anos, tornando a rotação de cultura um método pouco exequível para a redução do inóculo. É encontrado na África, Ásia, Europa, América do Norte e na América do Sul. Esse fungo coloniza o seu hospedeiro com auxílio de enzimas que degradam a parede celular vegetal, permitindo que entre no sistema vascular da planta. A sua propagação é feita principalmente pela sementes. Atualmente não há fungicidas químicos específicos eficazes registrados para o combate da *M. phaseolina* (KAUR *et al.*, 2015; MARQUEZ *et al.*, 2021).

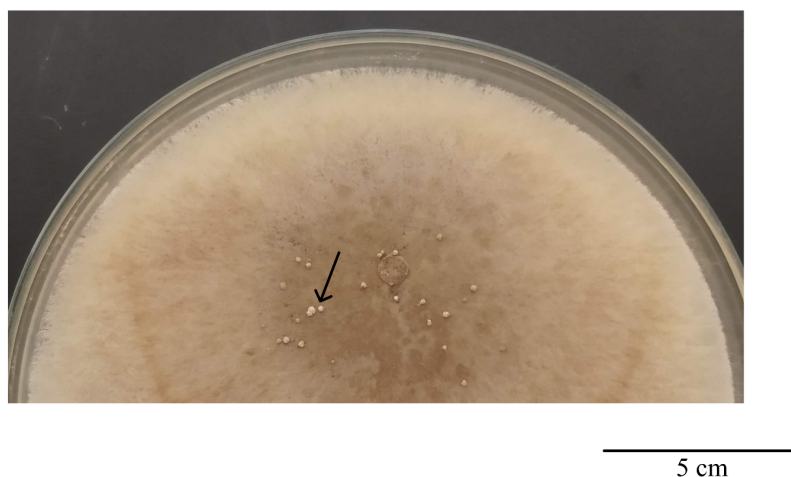


Figura 1 - Microescleródios (indicados pela seta) de *Rhizoctonia solani* cultivada em BDA.

Fonte: autora.

O fungo *R. solani* também produz microescleródios (**Figura 1**), sendo conhecido por causar a podridão radicular. Esta espécie afeta a produção de arroz, milho, soja, tomate, batata, ervilha e feijão comum (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006; MAYO *et al.*, 2015; OLADZAD *et al.*, 2019), atacando principalmente plantas em solo úmido em temperaturas entre 15 a 18°C e é um fungo cosmopolita (GUERRERO-GONZÁLEZ *et al.*, 2011). Esse fungo pode causar deterioração das sementes ou causar podridão pós germinação, afetando a raiz e o caule (AKBER *et al.*, 2023).

O controle da *R. solani* em soja (*Glycine max* (L.) Merr (Fabaceae)), é realizado a partir do tratamento das sementes com fungicidas para evitar a podridão do hipocótilo. Contudo, já foram registrados linhagens de *R. solani* resistentes aos fungicidas QoIn

(inibidores externos de quinona) que são utilizados no tratamento de sementes (AJAYI-OYETUNDE; BRADLEY, 2018).

As espécies de fitopatógenos do gênero *Fusarium* não apresentam escleródios, mas possuem clamidósporos que são estruturas de resistência com esporos, podendo permanecer viáveis no solo. As espécies de *Fusarium* ssp. podem colonizar partes aéreas da planta hospedeira, como folhas, frutos, ramos e flores, porém são conhecidas por causarem a doença da podridão da raiz. O tecido vascular da planta é a parte mais afetada, impedindo a movimentação da água (PÉREZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2020; WERE; VILJOEN; RASCHE, 2022).

Os fitopatógenos do gênero *Fusarium* também são conhecidos por causarem doenças em plantas de diferentes gêneros e famílias, como feijão, soja, melancia, trigo, cevada e milho. Em ambientes com muita umidade ocorre o favorecimento de crescimento desses fungos. Além disso, é importante destacar que linhagens de *Fusarium* também apresentam resistência a defensivos agrícolas de origem química como, por exemplo, os fungicidas tebuconazol e benzimidazol (DWEBA *et al.*, 2017; PÉREZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2020).

O fungo *C. lindemuthianum* é causador da antracnose, uma doença que afeta a germinação, o sistema radicular e as folhas. A produção pode ser totalmente afetada pela morte das plantas, perda das vagens e sementes com cancro. O crescimento desse fungo é favorável em ambiente fresco e úmido, sendo que no Brasil já foram identificadas linhagens de *C. lindemuthianum* resistentes ao fungicida tiofanato metílico (SARTORATO, 2006; PADDER *et al.*, 2017).

Além disso, as bactérias fitopatogênicas podem prejudicar a produção de sementes de feijão, uma das mais conhecidas é a *X. phaseoli* pv. *phaseoli*, agente etiológico do crestamento bacteriano. Essa doença tem como sintomas lesões circundadas com por uma zona de cor amarelo limão nos tecidos infectados na parte aérea da planta e manchas úmidas nas folhas. Esse gênero é conhecido por afetar o crescimento e a produção de frutos de outras famílias de plantas como a Rutaceae (BELETE; BASTAS, 2017; VIEIRA *et al.*, 2022). A bactéria tem crescimento favorável em ambientes de altas temperaturas e umidade (TRINDADE *et al.*, 2015).

Como a maioria dos fitopatógenos citados podem infectar sementes de outras espécies, a rotação de cultura pode não ser viável para a redução da concentração dos inóculos do solo e

linhagens de sementes resistentes aos fungos pode ser pouco acessível. Já o tratamento de sementes é uma opção que utiliza baixa quantidade de defensivos agrícolas, reduz o inóculo no solo e diminui a contaminação via semente (TAYLOR; HARMAN, 1990; O'SULLIVAN; BELT; THATCHER, 2021).

2.3. Tratamento de sementes

O tratamento de sementes consiste em selecionar sementes viáveis e sem crescimento de patógenos visíveis e as envolver em uma solução antimicrobiana. Essas sementes podem ser usadas somente para o plantio e como indicador são adicionados pigmentos (KANDEL *et al.*, 2019; LAKSHMEESHA *et al.*, 2020). Com a proteção dos antimicrobianos as sementes apresentam menor taxa de infecção, maior viabilidade de germinação e plântulas saudáveis. Devido a essa maior chance de sucesso germinativo, essas sementes têm alto valor comercial (TAYLOR; HARMAN, 1990).

Além de agregar valor, o tratamento de sementes é mais sustentável e econômico quando comparado a outros métodos de controle de fitopatógenos, pois necessita de um volume menor de defensivo em comparação com a aplicação na parte aérea nas áreas de cultivo. Como a maior parte das doenças que afetam o feijão são transmitidas por sementes, o tratamento reduz o inóculo de patógenos no solo, diminuindo a taxa de infecção na planta adulta, reduzindo a necessidade de utilização de defensivos agrícolas na planta pós-germinação, o que diminui o impacto ambiental (SHARMA, 2015).

Atualmente são usados defensivos de origem química para o tratamento das sementes. Segundo o MAPA, no Brasil há registros de 247 classes de fungicidas e 3 bactericidas usados no tratamento de sementes de feijão, sendo 23 classificados como “produtos perigosos ao meio ambiente” e 224 como “produtos muito perigosos ao meio ambiente”. PRIOR; MITTELBAACH; BEGEROW, 2017; VIEIRA *et al.*, 2022; BRASIL, 2024).

Neste sentido, é premente a necessidade de buscar novos compostos no combate aos fitopatógenos de sementes, visando agregação de valor, aumento de produção e tratos ecologicamente saudáveis. Uma alternativa é o uso de metabólitos secundários de microrganismos endofíticos que sejam inócuos aos seres vivos e ao meio ambiente (VIEIRA *et al.*, 2022).

2.4. Metabólitos secundários de microrganismos endofíticos

Metabólitos secundários são substâncias de baixo peso molecular produzidos por organismos vivos como plantas, fungos, bactérias e outros. Estes metabólitos não atuam diretamente no crescimento e reprodução dos organismos e por esta razão também podem ser denominados de metabólitos não essenciais ou especiais (MACHELEIDT *et al.*, 2016; PANG *et al.*, 2021). Entretanto, os metabólitos secundários desempenham funções importantes na competição e comunicação inter e intraespecífica, adaptação, proteção, defesa contra herbívoros e como respostas a fatores abióticos desfavoráveis, contribuindo substancialmente para a sobrevivência do organismo no ambiente (BRAKHAGE, 2013). Os grupos que apresentam alta diversidade de produção de metabólitos secundários são as bactérias, as plantas e os fungos (O'CONNOR, 2015; RAMÍREZ-RENDON *et al.*, 2022).

Dentre as várias espécies de fungos, estão aquelas que têm capacidade de fazer associações simbióticas com plantas e são denominadas endofíticas. Elas potencializam a absorção de nutrientes, induzem a resistência contra estresses bióticos e abióticos e desenvolvem interações antagônicas contra fitopatógenos (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012). Esses fungos podem colonizar todos os tecidos das plantas constituindo o seu microbioma, não causando prejuízos para o hospedeiro (ARNOLD, 2007).

Os fungos endofíticos podem biossintetizar diferentes classes de metabólitos secundários como, por exemplo, esteróides, xantonas, terpenóides, isocumarinas, fenóis, quinonas, benzopirranonas e alcaloides. Grande parte desses metabólitos apresentam atividades antimicrobiana e inseticida, que podem ajudar a planta hospedeira na proteção contra herbívoros (SINGH, 2019). Os estudos desses compostos são essenciais, pois o índice de cepas resistentes tem aumentado acentuadamente (ECONOMOU; GOUSIA, 2015).

E um desses metabólitos com potencial para o combate de patógenos é o ácido penicílico. Esse composto é produzido por fungos filamentosos e atualmente tem aumentado os estudos que visam a aplicação dele para o combate dos fitopatógenos por meio da aplicação foliar em citrus e em macieiras (KIM *et al.*, 2022; VIEIRA *et al.*, 2022). E Silva (2023) isolou uma cepa de *Penicillium* endofítica de *Bromelia balansae* Mez. (Bromeliaceae) de uma bancada laterítica que produz o ácido penicílico que apresentava potencial para a otimização da produção.

2.4.1. Ácido penicílico

Descoberto em 1913 por Alsberg e Black, o ácido penicílico (ácido 3-metoxi-5-metil-4-oxo-2,5-hexadienoico) foi inicialmente isolado do *Penicillium puberulum* (**Figura 2**). Este metabólito secundário é produzido por diferentes espécies de fungos filamentosos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*. Além disso, o ácido penicílico foi encontrado no co-cultivo dos fungos *Fusarium solani* e *Talaromyces* sp. (NONAKA *et al.*, 2015; MÉRILLON; RAMAWAT, 2017; LING *et al.*, 2020).

O ácido penicílico, em soluções aquosas, encontra equilíbrio tautomérico com a lactona, conforme ilustrado na **Figura 2**. É sugerido que seu mecanismo de ação ocorre sobre os resíduos SH das enzimas, reduzindo a atividade das mesmas, como a álcool desidrogenase e a desidrogenase láctica (ISMAIEL; PAPENBROCK, 2015).

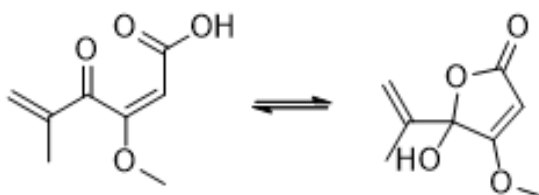


Figura 2 - Ácido penicílico em equilíbrio tautomérico em soluções aquosas

O ácido penicílico é uma micotoxina com propriedades hepatotóxica, citotóxica, antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-oomiceto e fitotóxica para *Zea mays*. E mesmo sendo potencialmente tóxico aos humanos, há estudos visando a sua aplicação na indústria agrícola para o controle de fitopatógenos (ISMAIEL; PAPENBROCK, 2015; LING *et al.*, 2020; VIEIRA *et al.*, 2022; BAURI *et al.*, 2022).

Um exemplo da atividade do ácido penicílico contra fitopatógenos foi descrito por Vieira *et al.* (2022), que demonstraram o potencial do ácido penicílico em reduzir as infecções foliares causadas pela bactéria *Xanthomonas citri* em *Citrus sinensis* L., a qual é denominada de doença do cancro cítrico. Nesse estudo a aplicação do ácido penicílico foi realizada nas superfícies das folhas de *C. sinensis*, reduzindo até 75,31% das manchas provocadas pelo cancro após aplicação na concentração de 25 µg/mL.

Além da inibição de bactérias fitopatogênicas, o ácido penicílico também tem apresentado inibição de crescimento de fungos fitopatogênicos em testes *in vitro*, como *R. solani*, *Rhizoctonia cerealis*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Alternaria alternate*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Magnaporthe grisea* e *Fusarium oxysporum* (SHEN *et al.*, 2020). O potencial biotecnológico do ácido penicílico é reafirmado pelas patentes já registradas. Em 2017 foi concedido um depósito de patente para o uso de fungo produtor de ácido penicílico para o controle de fitopatógenos bacterianos e em 2022 houve a concessão para a patente para o uso do extrato de *Penicillium bissettii* (com ácido penicílico) com atividade antibacteriana e antifúngica (JIN-CHEOL *et al.*, 2017; OK *et al.*, 2022). Apesar de ter potencial em inibir fitopatógenos, o seu uso em tratamento de sementes de *P. vulgaris* ainda não foi avaliado.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Produzir o extrato com ácido penicílico pelo fungo endofítico *Penicillium rolfsii* e avaliar a sua capacidade de inibir o crescimento dos fitopatógenos *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp., *Colletotrichum lindemuthianum* e *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* em ensaios *in vitro* e *in vivo*, bem como seus possíveis efeitos fitotóxicos em sementes de *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae).

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o potencial inibitório de crescimento do fungo *P. rolfsii* nos fungos *M. phaseolina*, *R. solani* e *Fusarium* sp.;
- Avaliar a inibição de atividade do extrato bruto (Eb-Pen) do *P. rolfsii* sobre a *X. phaseoli* pv. *phaseoli* em ensaios *in vitro*;
- Otimizar a produção do ácido penicílico pela cepa *P. rolfsii* em relação ao tempo de cultivo e diferentes meios de cultura;
- Obter os extratos de *P. rolfsii* com elevada concentração de ácido penicílico;
- Avaliar o potencial do Eb-Pen em inibir o crescimento dos fungos fitopatógenos *M. phaseolina*, *R. solani*, *Fusarium* sp. e *C. lindemuthianum*;
- Avaliar a toxicidade do Eb-Pen em sementes de *P. vulgaris*;
- Avaliar o potencial do extrato em inibir a infestação de fungos fitopatógenos em sementes de *P. vulgaris*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material biológico

O fungo *Penicillium rolfsii* 1IP2F2 foi isolado das folhas de *Bromelia balansae* Mez. (Bromeliaceae) pela doutora Fernanda Motta Ribeiro da Silva, que cedeu uma cultura monospórica (SILVA *et al.*, 2023). Essa cepa foi selecionada devido a sua produção de ácido penicílico durante o processo de cultivo, o qual foi previamente caracterizado e monitorado por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas (CLAE-DAD-EM), descrito em detalhes posteriormente aqui.

A espécie *B. balansae* foi coletada no município de Corumbá, na região das bancadas lateríticas (19°10'43" S, 57°32'19" O, 180 metros de elevação). A exsicata voucher Damasceno-Júnior *et al.* 3089 foi depositada no herbário COR da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - Campus do Pantanal (UFMS-CPAN). Esse estudo foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão de Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob número AE8625B (SILVA *et al.*, 2023).

O fungo fitopatogênico *Colletotrichum lindemuthianum* foi cedido pelos pesquisadores Celso Dornelas e Márcio Martinello Sanches, da Embrapa Gado de Corte (Campo Grande - MS). Os fungos *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium* sp. foram cedidos pela Coleção de Fungos do Mato Grosso do Sul da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (CFMS - UFMS). Enquanto que a cepa bacteriana *X. phaseoli* pv. *phaseoli* foi cedida pelo pesquisador Dr. Octávio Franco da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB). O lote de *Phaseolus vulgaris* utilizado neste trabalho era da variedade Carioca.

4.2. Manutenção dos microrganismos

4.2.1. Manutenção dos fungos fitopatogênicos

Os fungos utilizados neste trabalho foram cultivados em tubos inclinados e em placas de Petri em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) em estufa a 28 °C. Com a exceção do fungo *C. lindemuthianum*, que foi cultivado e armazenado em meio Ágar Aveia (AA; 20 g/L de ágar; 20g/L de aveia em flocos).

Durante o período de testes, os fungos foram inoculados nas placas de Petri com BDA ou AA mensalmente. Depois de 14 dias de cultivo as colônias eram armazenadas em geladeira

a 5 °C. E para caso de contaminação ou perda da colônia era feito o estoque em tubo inclinado seguindo o método de Castellani modificado com solução de glicerol 20% e refrigerado a 5°C (CAPRILES; MATA; MIDDELVEEN, 1989).

Esse estoque era repicado a cada 6 meses. Quando havia a necessidade de ativá-lo, era retirado fragmentos do micélio e depositados em placa de Petri e cultivado por 7 dias em seguida era repicado em uma nova placa. Após a segunda repicagem seguia-se o método de inoculação mensal com 14 dias de cultivo e armazenamento na geladeira.

4.2.2. Manutenção da bactéria *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli*

A cepa *X. phaseoli* pv. *phaseoli* foi cultivada em meio Ágar Nutriente (AN) em placa de Petri em estufa a 28 °C. Para o estoque, a bactéria foi cultivada em tubo contendo 5 mL de caldo nutriente a 28 °C em 200 rpm em mesa agitadora durante 2 dias. Depois disso os tubos foram centrifugados a 4000 rpm, o sobrenadante foi descartado e adicionado 3 mL de solução de NaCl a 0,9% (p/v) ao precipitado, agitado até a homogeneização e centrifugado novamente. O sobrenadante foi descartado e esse processo foi repetido por mais duas vezes. No fim, o precipitado foi transferido para um microtubo de 2 mL contendo 1,5 mL de glicerol 20%, agitado até ficar homogêneo e estocado a -5°C.

Para a reativação da cepa estoque, foi retirado uma alíquota da solução estoque com auxílio de uma alça de platina e o plaqueamento foi realizado seguindo o método de esgotamento (FONSECA; MARIN; MORRIS, 2006). Durante os testes, as bactérias ativas eram repicadas a cada 14 dias em placas com AN.

4.3. Identificação molecular da cepa fúngica obtida de *Bromelia balansae*

A cepa fúngica isolada de *B. balansae* utilizada foi identificada em nível molecular pela empresa GoGenetic Ltda (Curitiba-Paraná, Brasil) através do sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal, utilizando os primers ITS-1 (forward) e ITS-4 (reverse), além do primer TEF.

O envio da cepa seguiu a metodologia solicitada pela GoGenetic Ltda, com a colônia isolada e cultivada em BDA por 7 dias a 28 °C. Os cromatogramas das sequências obtidas

foram analisados conforme descrito por Silva *et al.* (2023). Estas sequências foram submetidas a busca de similares depositadas no banco de dados GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) do NCBI através da utilização da ferramenta BLAST N (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Os dados serão depositados no GenBank.

4.4. Testes de antagonismo por confrontação direta

Para esse teste foi utilizado a metodologia proposta por Martins-Corder e Melo (1998), com modificações. Para a obtenção do inóculo, os fungos *R. solan*, *M. phaseolina*, *Fusarium* sp. e *P. rolfsii* foram cultivados em placas de Petri com BDA durante 7 dias a 28°C. Após isso, fragmentos de micélios de 0,5 x 0,5 cm foram retirados para o preparo do inóculo, os quais foram transferidos para um microtubo de 2 ml contendo cinco discos de papel filtro de 0,6 cm de diâmetro e 1,5 mL de água destilada, todo esse material foi previamente autoclavado.

Os microtubos foram colocados na estufa a 28°C por 2 dias. Após este período, os discos com os fitopatógenos foram transferidos para placas de Petri de 20 cm contendo BDA com o auxílio de palitos de madeira. Os discos com *P. rolfsii* também foram inoculados nas placas com os patógenos, mantendo-se a mesma distância da borda, em posição oposta à colônia do fitopatógeno (**Figura 3**). Como controle, foram cultivadas também placas com os discos somente com os patógenos nas mesmas condições que as placas em confronto. Posteriormente, essas placas contendo os fungos em confronto e os controles foram incubados a 28 °C durante 8 dias.



Figura 3 - Exemplo de placa do teste de antagonismo por confrontação direta do *Penicillium rolfsii* (à direita) e do fitopatógeno *Fusarium* sp. (à esquerda) na placa de Petri com BDA após 8 dias de cultivo.

Os testes de antagonismo por confrontação direta foram realizados em triplicata, obtendo-se assim, a média do desenvolvimento micelial. As medidas foram realizadas após os 8 dias de cultivo, com auxílio de um paquímetro digital. Para o cálculo da porcentagem de inibição, foi utilizada a fórmula de McCalley e Torres-Grifol (1992), conforme descrito pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ In} = [(C - T)/C] \times 100$$

Sendo:

(C) médias dos diâmetros das colônias controle;

(T) médias dos diâmetros das colônias teste;

(%In) porcentagem de inibição.

As medidas foram realizadas após 8 dias de cultivo.

Para avaliar o nível de inibição utilizou-se os critérios de Bell *et al.* (1982), onde as avaliações foram feitas por uma escala de notas com valores de 1 a 5 (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Escala de notas de porcentagens de inibição em teste de confrontação direta segundo Bell *et al.* (1982)

Escala de nota	% de inibição
1	= 100
1,5	≥ 87,5
2	≥ 66,6
2,5	≥ 62,5
3	≥ 50
3,5	≥ 37,5
4	≥ 33,33
5	≥ 0

4.5. Otimização da produção de ácido penicílico por *Penicillium rolsii* 1IP2F2

A otimização da produção do ácido penicílico pelo *P. rolsii* foi realizada avaliando o tempo de cultivo nos meios Caldo Batata Dextrose (CBD) e Caldo Czapek Dox (CCD). Os inóculos foram obtidos de culturas de 7 dias em meio BDA e mantidas a 28°C. Foram utilizados 3 fragmentos de micélio de 0,5 cm em cada repetição, que foram transferidos para erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio cultura líquido. O cultivo foi realizado no modo estático a 28°C em duplicata.

Todas as replicatas foram cultivadas por 29 dias, tendo sido recolhidas quatorze alíquotas do meio de cultivo ao longo desse período. Assim, foram coletadas alíquotas de 1,5 mL em cada tempo (1º, 3º, 5º, 7º, 9º, 14º, 19º, 24º e 29º dia de cultivo), as quais foram posteriormente centrifugadas a 14.000 rpm por 10 min e os sobrenadantes foram separados e armazenados a -5 °C. Essas amostras foram liofilizadas para obtenção dos extratos brutos

(Eb) e armazenadas a -5 °C até o momento das análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas (CLAE-DAD-EM).

4.5.1. Análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas (CLAE-DAD-EM)

Os extratos foram analisados por CLAE-DAD-EM utilizando um cromatógrafo UFLC (Shimadzu) acoplado a um detector de arranjo de diodos. As amostras foram preparadas e as análises realizadas com solventes grau HPLC (metanol) da marca J.T.Baker e água ultrapura (Milli-Q, Millipore).

As amostras foram preparadas na concentração de 1 mg/mL utilizando metanol e água 7:3 (v/v) e filtradas em filtro seringa de PTFE (0,22 µm, Millex, Millipore) antes da injeção no sistema cromatográfico. A vazão foi de 0,3 mL/min e a temperatura do forno foi de 50 °C. A fase móvel utilizada foi água deionizada (A) e acetonitrila (B), ambos contendo 0,1% de ácido fórmico. O seguinte gradiente de eluição foi utilizado: 0-2 min -3% B, 2-25 min - 3-25% B, 25-40 min – 25-80% B e 40-43 min - 80% B. Os dados obtidos foram analisados no programa Data Analysis (Bruker Daltonics, Billerica, EUA).

O padrão autêntico de ácido penicílico foi injetado para confirmação da anotação nos extratos. Este padrão foi obtido através do isolamento no trabalho de doutorado da Fernanda Motta Ribeiro da Silva (SILVA; 2023). O tratamento de otimização da produção que apresentou a maior intensidade de área do ácido penicílico foi selecionada para quantificação e cultivo em larga escala para a obtenção de extratos com massa suficiente para a realização das análises químicas e avaliações contra os os fitopatógenos.

4.5.2. Cultivo e obtenção dos extratos de *Penicillium rolsii* 11P2F2

Após a avaliação da condição de cultivo mais favorável para a produção do ácido penicílico, iniciou-se o cultivo em maior escala. Para isto, foram utilizados 45 frascos de erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio de cultura, os quais foram mantidos em estufa a 28° após a inoculação. O tempo e o meio de cultivos usados foram os que Eb-Pen

apresentaram maior concentração de ácido penicílico, identificado em teste 4.5. Após esse período ideal de cultivo, o micélio foi separado e a fase líquida foi filtrada em duas camadas de papel filtro (Unifil, gramatura 80g/m²), liofilizada e armazenada a -5°C até seu uso. Esse extrato bruto aquoso foi denominado de Eb-Pen.

4.5.2.1. Obtenção do extrato acetato de etila de *Penicillium rolsii* 1IP2F2

Para diminuir a concentração de glicose presente no Eb-Pen foi realizado uma extração líquido-líquido obtido no item 4.5.2, 1g de Eb-Pen foi solubilizado em 500 mL de H₂O:MeOH 2:1 (v/v) e particionado com acetato de etila (AcOEt). Após isso, o extrato AcOEt foi extraído com água deionizada utilizando um funil de separação e a fase orgânica final foi então concentrada em evaporador rotativo, seco por liofilização para a obtenção do extrato bruto em acetato de etila (Eb-Pen-Ac). Este extrato seco foi armazenado a -5°C.

4.5.3. Análises químicas dos extratos Eb-Pen e Eb-Pen-Ac de *Penicillium rolsii* 1IP2F2 por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas (CLAE-DAD-EM)

As análises foram adquiridas por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando um UFLC-20AD Prominence Shimadzu acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD) e espectrômetro de massa (CLAE-DAD-EM) com fonte de ionização por eletrospray e analisadores quadrupolos e de tempo de voo sequenciais (MicrOTOF-Q III, Bruker Daltonics). A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna cromatográfica Kinetex® C18 (2,6 µm, 100 Å, 150 x 2,1 mm, Phenomenex) acoplada a uma pré-coluna do mesmo material. As análises foram realizadas com vazão de 0,3 mL/min e a coluna cromatográfica foi mantida a 50 °C durante as análises. A fase móvel utilizada foi acetonitrila (B) e água ultrapura (A), ambas contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico. Todas as amostras foram analisadas nos modos de ionização positivo e negativo para a anotação dos seus constituintes e em modo de ionização negativa para a quantificação do ácido penicílico. Os parâmetros utilizados no espectrômetro de massas foram os seguintes: gás nebulizador (N₂, 4

Bar) e gás de secagem (N₂, 9 L/min). O gás N₂ também foi utilizado como gás de colisão para aquisição dos espectros de fragmentação (EM/EM).

Para a anotação dos constituintes dos extratos Eb-Pen e Eb-Pen-Ac, o gradiente de eluição utilizado nas análises cromatográficas foi o seguinte: 0-2 min (3% de B), 2-25 min (3-25% de B), 25-40 min (25-80% de B), e 40-43 min (80% de B, isocrático). As amostras foram preparadas em metanol e água 7:3 (v/v) na concentração de 3 mg/mL, filtradas em filtro seringa (PTFE, 0,22 µm e 13 mm de diâmetro) e injetadas no sistema cromatográfico (2 µL).

A quantificação do ácido penicílico foi determinada empregando o mesmo método cromatográfico utilizado para a notação dos constituintes e descritos aqui neste item. A curva de calibração foi obtida em triplicata com as concentrações do ácido penicílico de 1 a 0,031 mg/mL.

4.6. Avaliações dos efeitos de inibição do crescimento de bactérias e fungos fitopatogênicos

4.6.1. Bactéria fitopatogênica *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli*

4.6.1.1. Inóculo da bactéria fitopatogênica

O inóculo de *X. phaseoli* pv. *phaseoli* foi cultivado em caldo nutriente (3 g/L de extrato de carne; 5 g/L de peptona; 5 g/L NaCl; pH 6,8) por 48h. Posteriormente, este foi centrifugado a 4.000 rpm por 5 min e o precipitado foi ressuscitado em solução de Tween 20 a 1%. O inóculo de *X. phaseoli* pv. *phaseoli* foi padronizado em 0,2 de absorbância em 600 nm de comprimento de onda em espectrofotômetro (Kasvi, K37-Uvvis, UV/Visível 190-1100nm). Assim, foram realizadas diluições quando necessárias para que todos os inóculos estivessem na mesma concentração de células bacterianas (FAI; GRANT, 2009).

4.6.1.2. Avaliação dos extratos sobre a bactéria *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli*

Como proposto por Arendrup *et al.* (2020), os meios de cultura foram preparados de acordo com as instruções do fabricante com uma concentração 4 vezes maior, sendo utilizado o meio de cultura caldo nutriente. O extrato Eb-Pen foi previamente filtrado em filtro seringa 0,22 µm (Poliamida, Millex, Millipore) para posterior análise sobre a bactéria fitopatogênica.

Em microplacas de 96 poços com fundo chato foram adicionados, em cada poço, 100 µL da solução de extrato Eb-Pen, 100µL de meio de cultura e 100 µL de inóculo do fitopatógeno. Nos controles foram adicionados somente o inóculo (100 µL), meio de cultura (100 µL) e água destilada estéril (100 µL), em substituição ao extrato bruto. Foram testadas 8 diluições, entre 33,8 e 70 mg/mL (70, 62,5, 57,9, 52,7, 48, 43,4, 38,5 e 33,8 mg/mL), conforme descrito por Arendrup *et al.* (2020). Cada tratamento foi realizado em triplicata.

A leitura do ensaio de inibição de *X. phaseoli* pv. *phaseoli* foi realizado após de 8h da aplicação de cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC) a 0,5%, que é feita após 24 horas de cultivo na microplaca (CASTRO; LIMA, 2010). A identificação de inibição foi realizada de forma visual, considerando que houve inibição quando apresentava coloração amarela (a cor do meio de cultura) e que não houve inibição quando apresentou cor rosa.

4.6.2. Fungos fitopatogênicos

4.6.2.1. Inóculos dos fungos fitopatogênicos

Para obtenção dos inóculos, os fitopatógenos *C. lindemuthianum*, *M. phaseolina*, *R. solani* e *Fusarium* sp. foram cultivados em 40 mL de BDA em erlenmeyers de 250 mL inclinados por 5 dias a 28°C. Após esse tempo de crescimento, adicionou-se 20 mL de Tween 20 a 1% e a raspagem dos micélios foi realizada com auxílio de uma alça de platina. A solução contendo os micélios foi então transferida para tubos autoclavados. A padronização dessa solução foi realizada considerando 0,2 de absorbância a 600 nm de comprimento de onda, o qual foi mensurado em espectrofotômetro (Kasvi, K37-Uvvis, UV/Visível 190-1100nm). Caso fosse necessário, foram realizadas diluições até atingir essa absorbância, para que todos os inóculos estivessem a mesma concentração de células (GRANADE; HEHMANN; ARTIS, 1985; FAI; GRANT, 2009).

4.6.2.2. Avaliação dos extratos em testes de inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos

No microcultivo dos fungos fitopatogênicos (*Fusarium* sp., *C. lindemuthianum*, *M. phaseolina* e *R. solani*) foi usado meio CBD e o Eb-Pen-Ac foi diluído em água. Seguindo a metodologia de Arendrup *et al.* (2020) com modificações, nos poços da microplaca foram adicionados 50 µL de Eb-Pen-Ac, 50 µL de CBD (com concentração de 800 g/L de extrato de batata e 80 g/L dextrose) e 100 µL do inóculo, preparado conforme descrito no item anterior. Para o controle, as amostras avaliadas foram substituídas por água. Diluições seriadas foram realizadas com as amostras avaliadas resultando nas concentrações de 2 a 0,125 mg/mL. As avaliações de cada concentração foram realizadas em quintuplicata.

A leitura dos resultados do teste de microcultivo seguiu a metodologia proposta por Arendrup *et al.* (2020). A identificação da inibição foi feita após 48 horas observando a presença ou não da formação de micélio. Foi aplicado 10µL de cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC) a 0,5% para confirmar a inatividade celular nos poços sem crescimento visível do micélio. As placas foram observadas depois de 8 horas da aplicação do TTC. Foi considerado sem atividade os poços com coloração amarela e com atividade os que tinham cor rosa.

4.7. Ensaios *in vivo* em sementes de *Phaseolus vulgaris*

4.7.1. Avaliação da viabilidade das sementes *Phaseolus vulgaris*

A avaliação da viabilidade de sementes de *P. vulgaris* foi realizada seguindo a metodologia proposta pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009) para o teste de tetrazólio. O teste foi realizado com 4 repetições, cada uma com 50 sementes de *P. vulgaris*.

As sementes foram lavadas previamente em água corrente. No fluxo laminar foram submersas em hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos, água estéril, álcool 70% durante 5 minutos e novamente lavadas com água estéril.

Cada grupo de repetição foi passado para uma placa de Petri com duas folhas de papel de filtro previamente autoclavados e úmidos com 1 mL água destilada autoclavada. As sementes permaneceram entre as duas folhas de papel na placa de Petri fechada, por 24 h a 25 °C.

Após o pré-umedecimento sugerido pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009) para a espécie de Fabaceae, as sementes foram transferidas para um bquer de 100 mL, submersas em solução de TTC a 0,075% (p/v), vedadas com papel filme e mantidas durante 24h a 40 °C em estufa.

Depois disso, o tegumento das sementes era retirado e os cotilédones eram separados para a observação da parte interna e do embrião. Sementes sem partes do embrião, com predominância da cor vinho escuro e/ou sem coloração nos cotilédones e/ou no embrião foram consideradas inviáveis, ademais aquelas que apresentavam cor vermelha de forma uniforme por toda a semente foram classificadas como viáveis. Com esses dados foi feito o seguinte cálculo da porcentagem de sementes viáveis para determinar a viabilidade do lote:

$$V\% = 100 \times S/T$$

Onde:

V% = Porcentagem de viabilidade

S = Número de sementes viáveis

T = Número total de sementes

4.7.2. Efeito fitotóxico dos extratos de *Penicillium rolfii* 11P2F2 sobre *Phaseolus vulgaris*

A assepsia das sementes foi realizada conforme descrito no item 4.7. Após a limpeza e desinfecção das sementes, estas foram colocadas em papel filtro autoclavado em placas de Petri, sob fluxo laminar por 30 min para a secagem total.

As sementes foram submersas em 5mL do extrato (Eb-Pen-AcOEt) diluído em água destilada autoclavada por 5 minutos. Em seguida, foram colocadas para secar novamente em papel filtro por 20 min. Para esse teste foram avaliados três tratamentos, com os extratos nas concentrações de 3, 1,75 e 0,5 mg/mL, em triplicata e o controle. Após a secagem final, as sementes foram acondicionadas em *gerbox* 15x15cm desinfetadas previamente com álcool 70% contendo 100 mL de ágar 1%. Em cada placa, foram acondicionadas 20 sementes dispostas de forma uniforme pela caixa (**Figura 4**).



Figura 4 - Disposição das sementes de *Phaseolus vulgaris* em gerbox 15x15 cm com ágar 1% utilizadas na avaliação dos extratos

A porcentagem de germinação (G%) foi calculada de acordo com o descrito por Oliveira e colaboradores (2002) com aplicação da seguinte fórmula::

$$G\% = 100 \times S_{ni} / N$$

Onde:

G% = Porcentagem de germinação

S_{ni} = Número de sementes no i-ésimo dia

N = Número total de sementes colocadas para germinar em cada gerbox

4.7.3. Efeito dos extratos de *Penicillium rolfsii* 1IP2F2 sobre as sementes de *Phaseolus vulgaris* contaminadas com fitopatógenos

A assepsia das sementes foi realizada conforme descrito no item 4.7. e para o preparo das gerbox conforme descrito no item 4.8. O inóculo dos fungos fitopatógenos foi preparado da mesma forma que o realizado para os ensaios de inibição dos fungos patogênicos em microcultivo, conforme descrito no item 4.6.2.1. O teste foi realizado com os fungos *C. lindemuthianum*, *R. solani* e *Fusarium* sp. Para a contaminação do substrato, 50 µL da solução com micélios dos fungos fitopatogênicos foram adicionados na superfície do ágar 1%

na *gerbox* e espalhado com auxílio de uma alça de Drigalski. Essa solução foi preparada da mesma forma que o inóculo para o teste de microcultivo (4.6.2.1.). Para aplicação dos extratos Eb-Pen-AcOEt, foi utilizada a mesma metodologia do ensaio de fitotoxicidade dos extratos de *P. rolfsii* 1Ip2F2 sobre *P. vulgaris*, e as concentrações avaliadas foram aplicadas, bem como os parâmetros aplicados nos ensaios de inibição dos fungos fitopatogênicos em microcultivo conforme descrito no item 4.6.2.

Os tratamentos foram realizados em triplicata, os quais contemplaram os seguintes tratamentos: (1) semente sem tratamento com o Eb-Pen-Ac e sem contaminação de fitopatógeno para o controle; (2) semente com tratamento com o Eb-Pen-Ac e sem contaminação; (3) sementes tratadas e contaminadas com os fungos fitopatogênicos, sendo aplicado separadamente (cada tratamento) os fitopatógenos (*C. lindemuthianum*, *R. solani* e *Fusarium* sp.); (4) sementes sem tratamento com o Eb-Pen-Ac e contaminadas, sendo aplicado separadamente (cada tratamento) os fitopatógenos (*C. lindemuthianum*, *R. solani* e *Fusarium* sp.).

Durante esses ensaios, a germinação foi avaliada no 4º, 5º e 6º dia de cultivo das sementes. No 7º dia do ensaio, foi realizada a medida do comprimento da parte aérea, da raiz primária e do peso úmido das plântulas de feijão. Além disso, também foram observados e anotados dados relativos às plântulas infectadas que apresentavam algum tipo de deformidade e/ou ausência de alguma estrutura seguindo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

4.8. Análises estatísticas

Para a validação dos ensaios de fitotoxicidade e dos efeitos dos extratos em sementes contaminadas com fitopatógenos em *gerbox* foi realizado ANOVA com o teste Tukey com 5% de probabilidade, pelo software SISVAR (versão 5.8) (FERREIRA, 2019). Para isto, foram analisados o tempo de germinação e as medidas das partes aéreas, raízes primárias e do peso úmido das plântulas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Identificação molecular da cepa fúngica obtida de *Bromelia balansae*

A cepa 1IP2F2 isolada de *B. balansae* (SILVA et al., 2023) foi identificada a nível molecular através do sequenciamento das regiões ITS 1 e 4. O resultado foi comparado com dados depositados no GenBank e foi obtido 99% de similaridade com a espécie *Penicillium rolfsii*, pertencente a família Aspergillaceae, ordem Eurotiales, classe: Eurotiomycetes e filo Ascomycota.

Penicillium rolfsii é conhecido por produzir as enzimas tanase, xilanase e β -1,3-glucanase, contudo não há trabalhos que notifiquem a produção do ácido penicílico em outras cepas além da que foi isolada por Silva et al. (2023). Porém a produção desse metabólito é bem comum em fungos do gênero *Penicillium* (LEE et al., 2014; LEE et al., 2015; ANDRADE et al., 2020; LING et al., 2020).

5.2. Testes de antagonismo por confrontação direta

Os testes de antagonismo por confrontação direta foram realizados com a cepa do endófito *P. rolfsii* e os fungos fitopatógenos *Fusarium* sp., *M. phaseolina* e *R. solani*.

Penicillium rolfsii apresentou inibição de 5 na escala de Bell et al. (1982) contra os fitopatógenos *Fusarium* sp. e *M. phaseolina* em teste de confronto direto. Dentre os fitopatógenos utilizados no ensaio, foi possível observar uma maior porcentagem de inibição do crescimento de *Fusarium* sp. com inibição de 11,25% no 8º dia de cultivo pela cepa *P. rolfsii*. Já para o fitopatógeno *M. phaseolina*, *P. rolfsii* exibiu uma inibição de seu crescimento de 8,72% (**Figura 5 e Figura 6**).

O fungo fitopatogênico *R. solani* não obteve inibição de seu crescimento promovido por *P. rolfsii*. Portanto, os resultados obtidos demonstram que *P. rolfsii*, um endófito de *B. balansae*, não possui atividade de antagonismo direto contra *R. solani* e apenas uma baixa atividade contra *Fusarium* sp. e *M. phaseolina*.

Fungos filamentosos que reduzem o crescimento micelial de *R. solani*, *Fusarium* sp. e *M. phaseolina* já foram registrados. Como o *Acrophialophora jodhpurensis*, que reduziu o crescimento do *R. solani* em confronto direto. o *A. jodhpurensis* pode atuar na inibição pela

produção de metabólitos secundários nos testes *in vitro* (DAROODI; TAHERI; TARIGHI, 2022).

O gênero *Trichoderma* também é conhecido pelo seu alto potencial de biocontrole. Cepas de *Trichoderma atroviride* inibiram o crescimento de *R. solani* em 60% em co-cultivo. Outras espécies como *Trichoderma virens* podem induzir a resposta de defesa da planta contra a *R. solani*, produzir fenólicos tóxicos ao patógeno e realizar micoparasitismo (SZCZECH *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2022).

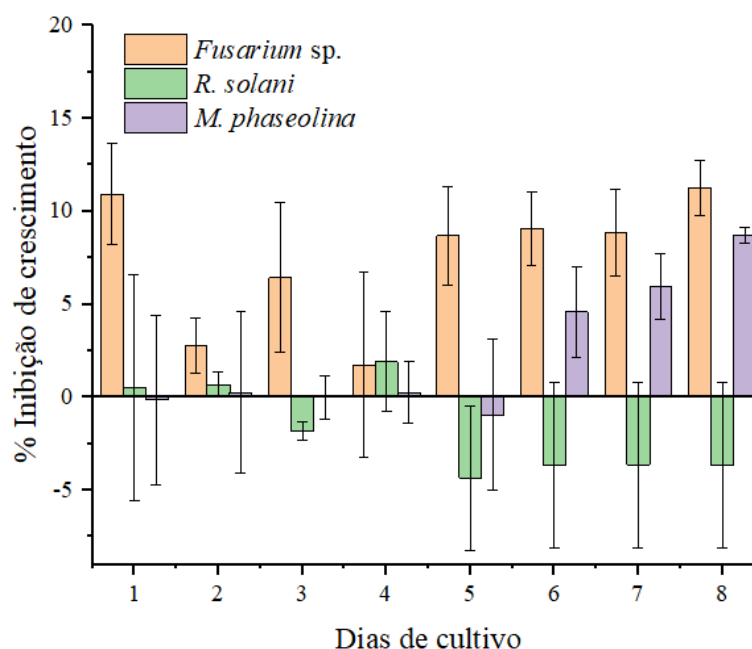


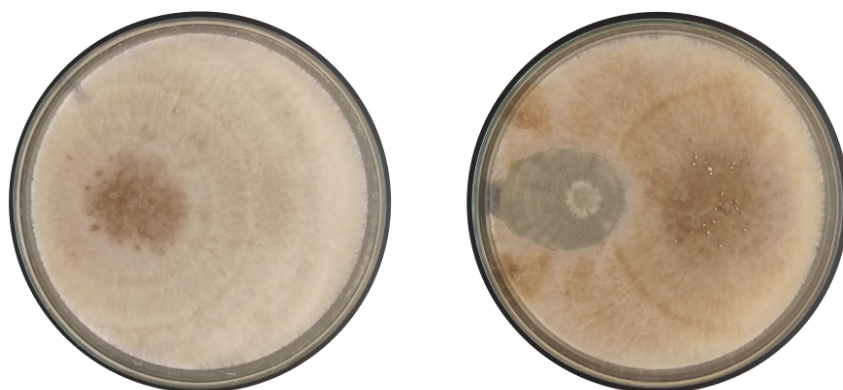
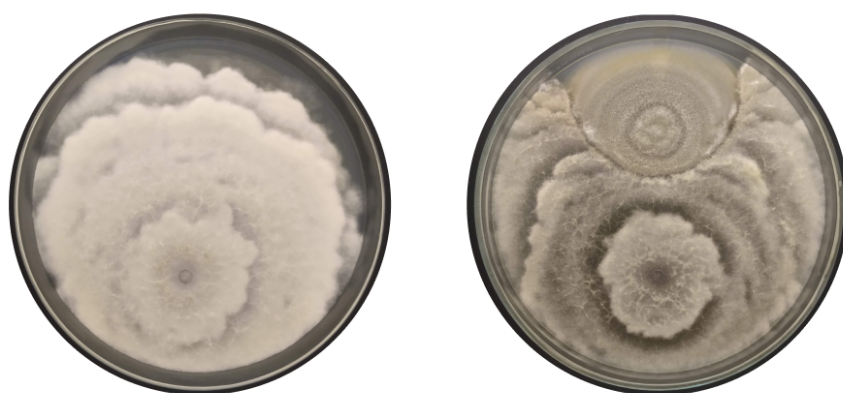
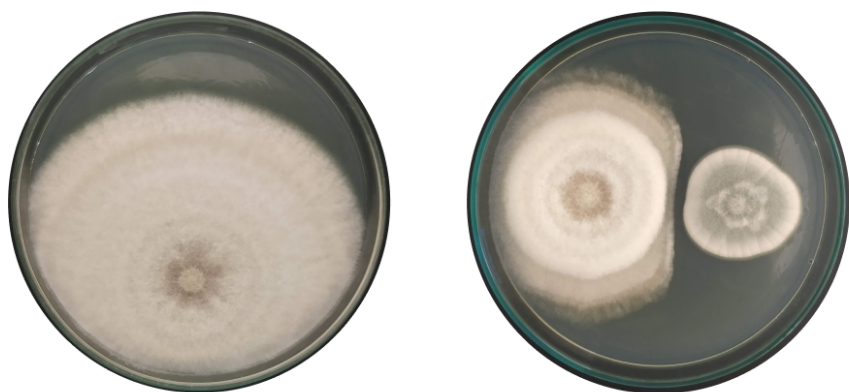
Figura 5 - Porcentagem de inibição dos fitopatógenos *R. solani*, *Fusarium* sp. e *M. phaseolina* em teste de antagonismo por confrontação direta com a cepa endofítica *P. rolfsii*

Em testes de antagonismo os fungos *Aspergillus favipes* e *Aspergillus favus* reduziram o diâmetro do crescimento micelial de *M. phaseolina* em 53% e 41%, respectivamente. Quando o extrato contendo metabólitos secundários de *A. favipe* foi aplicado em amostras de DNA de *M. phaseolina* houve degradação. Esse extrato era composto por antimicrobianos que poderiam justificar a sua ação inibitória, como o ácido benzenodicarboxílico (KHAN; JAVAID, 2021).

O *Fusarium* sp. foi o que apresentou maior inibição pelo *P. rolfsii*, contudo em outros estudos o *Trichoderma atroviride* diminuiu o crescimento de *Fusarium oxysporum* em 92,11%

em comparação com o controle por meio de metabólitos secundários e micoparasitismo (NOFAL *et al.*, 2021).

Mesmo o *P. rolfsii* não apresentando potencial de biocontrole por confronto direto com os patógenos, havia a possibilidade do controle pelo extrato, principalmente por causa da produção de ácido penicílico previamente identificada. Em pesquisas a extração desse ácido era feita após 20 dias de cultivo do fungo (VIEIRA *et al.* 2022), por ser um metabólito secundário a sua produção poderia ocorrer após alguns dias de confronto, justificando a ausência de inibição significativa dos patógenos. Portanto foi necessário realizar um teste de otimização da produção, para mapear as melhores condições de cultivo produzir e posteriormente aplicar o extrato.

Rhizoctonia solani*Macrophomina phaseolina**Fusarium* sp.

5 cm

Figura 6 - Registro do teste de confronto direto entre os *R. solani*, *Fusarium* sp. e *M. phaseolina* e o fungo endofítico *P. rolfii* em BDA, após 8 dias de cultivo. Na esquerda estão as placas controles dos fitopatógenos e na direita as placas de antagonismo em confrontação direta

5.3. Otimização da produção do ácido penicílico pela cepa *Penicillium rolfsii* 1IP2F

Em estudos prévios com a cepa *P. rolfsii* 1IP2F2 em nosso grupo de pesquisa, o ácido penicílico foi detectado a partir do extrato do caldo (sobrenadante) e por esta razão sua produção foi alvo desse projeto, já que é uma substância que pode ser aplicada contra microrganismos patogênicos (SUZUKI *et al.*, 1971; NONAKA *et al.*, 2015; VIEIRA *et al.*, 2022).

Desta maneira, cultivamos a cepa *P. rolfsii* 1IP2F2 em diferentes meios líquidos de cultura com o intuito de otimizarmos a produção do ácido penicílico, sendo também avaliado o tempo de cultivo. Os meios de cultura utilizados foram os caldos Czapek Dox (CCD) e batata dextrose (CBD) e o tempo de cultivo monitorado até 29 dias. Todas as amostras dos extratos brutos aquosos (alíquotas dos meios de cultivo) foram analisadas por CLAE-DAD para o monitoramento da produção de ácido penicílico.

Em meio CCD, *P. rolfsii* produziu ácido penicílico em menor intensidade quando comparado ao cultivo em meio CBD (**Figura 7**). A produção de ácido penicílico ocorreu a partir do 10º dia de cultivo em meio CCD, atingindo a maior intensidade de área desta substância entre os dias 13º e 19º de cultivo. Em meio CBD, *P. rolfsii* mostrou início da biossíntese de ácido penicílico a partir do 3º dia de cultivo. A maior intensidade de ácido penicílico produzido ocorreu entre 14 e 15 dias de cultivo em meio CBD e após isso sua intensidade começou a decair, sugerindo um catabolismo deste metabólito secundário, o que pode ser devido a escassez de nutrientes e consumo de metabólitos previamente armazenados pelo fungo para a sua sobrevivência.

Até o momento, não foram encontrados trabalhos que reportem o monitoramento da produção de ácido penicílico por fungos do gênero *Penicillium*. Portanto, não foram encontradas informações, no escopo da revisão bibliográfica que foi realizada, sobre a otimização da produção de ácido penicílico por esta cepa, considerando tempo de cultivo e meio de cultura ideal. Desta maneira, selecionamos o melhor meio de cultura e o tempo de cultivo para a obtenção da maior produção de ácido penicílico e esta condição foi então utilizada para a produção em maior escala do extrato aquoso bruto com elevada intensidade de ácido penicílico (EB-Pen), o qual foi utilizado na avaliação das concentrações inibitória mínima (CIM) contra os fitopatógenos nos testes de microcultivo.

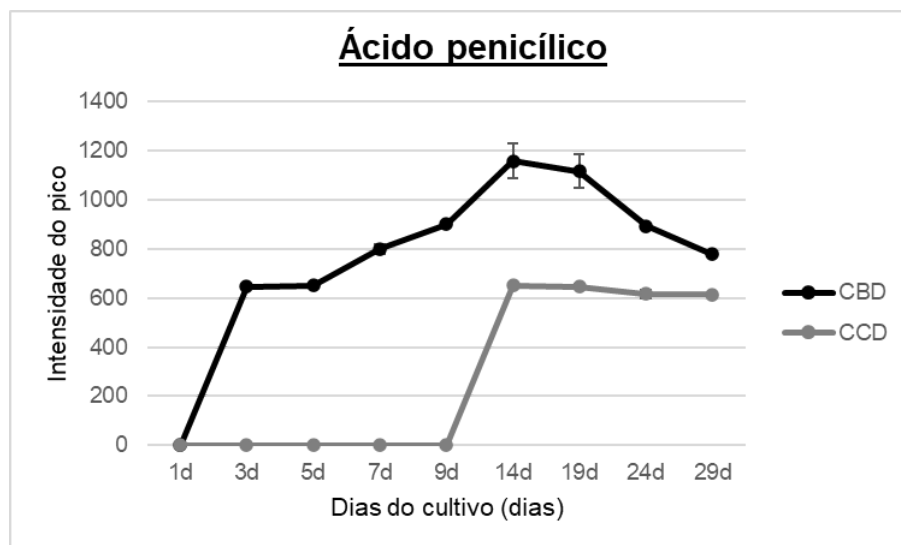


Figura 7 - Produção do ácido penicílico produzido por *P. rolfsii* em 29 dias de cultivo em meios líquidos de Czapek Dox (CCD) e batata dextrose (CBD) monitorados através da análise por CLAE-DAD a 220-280 nm

Em trabalhos desenvolvidos por Vieira e colaboradores (2022), a cepa *Penicillium* sp. CRM 1540 produziu o ácido penicílico em meio caldo Czapek Dox, o cultivo foi a 15° por 20 dias em agitação. Em outras pesquisas o cultivo para a produção desse metabólito levou de 40-50 dias (SIP *et al.*, 2020). Enquanto o cultivo do *P. rolfsii* durou 14 dias, reduzindo o tempo e os custos de produção. E como a produção do ácido atinge o seu máximo no 14º dia isso poderia justificar a baixa porcentagem de inibição do *P. rolfsii* em confronto direto com os patógenos pois o teste de confronto durava 8 dias.

5.4. Extratos de *Penicillium rolfsii* 1IP2F2

5.4.1. Análises químicas dos extratos de *Penicillium rolfsii* 1IP2F2 por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas (CLAE-DAD-EM)

A quantificação do ácido penicílico foi realizada por CLAE-DAD-EM, sendo utilizada uma curva de calibração deste metabólito injetado nas concentrações de 1 a 0,03125 mg/ml.

Esta curva foi obtida a partir da injeção em triplicata e para sua construção foram utilizados 5 pontos. A curva encontra-se ilustrada na **Figura 8**. A equação da reta obtida foi $y=68034x-984.44$ com R^2 de 0,9993.

Os extratos aquoso (EB-Pen) e acetato de etila (EB-Pen-Ac) foram preparados e injetados para a quantificação do ácido penicílico, sendo determinada a concentração de ácido penicílico de 8 e 284,73 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

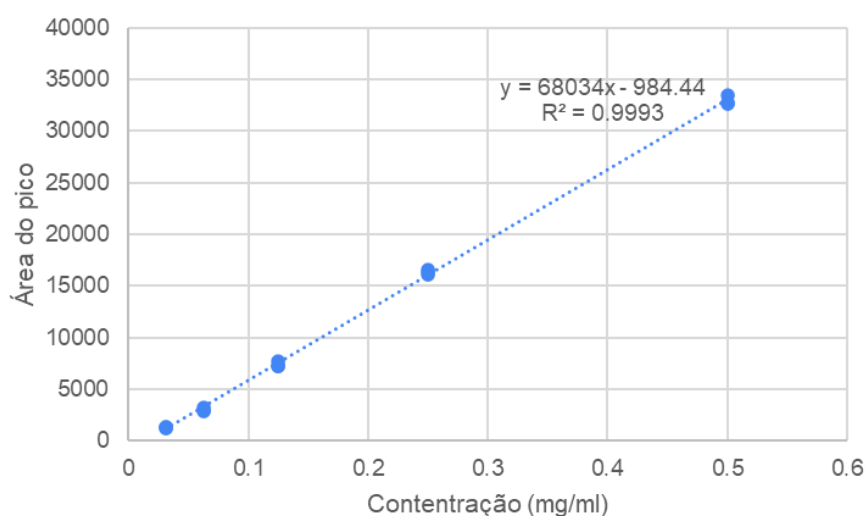


Figura 8 - Curva de calibração do ácido penicílico construída a partir da área do pico obtido em modo de ionização negativa .

Os extratos EB-Pen e EB-Pen-Ac foram analisados por CLAE-DAD-EM e seus constituintes foram anotados. Os dados espectrais e anotação encontram-se descritos na **Tabela 2** e os cromatogramas encontram-se ilustrados na **Figura 9**.

O pico **5** foi anotado como ácido penicílico, o qual foi confirmado por co-injeção de padrão autêntico. Outras substâncias anotadas nos extratos EB-Pen e EB-Pen-Ac foram ácidos isocítrico e cítrico, ácido orselínico e penicilazina, além de uma dicetopiperazina e alguns constituintes que não puderam ser identificados.

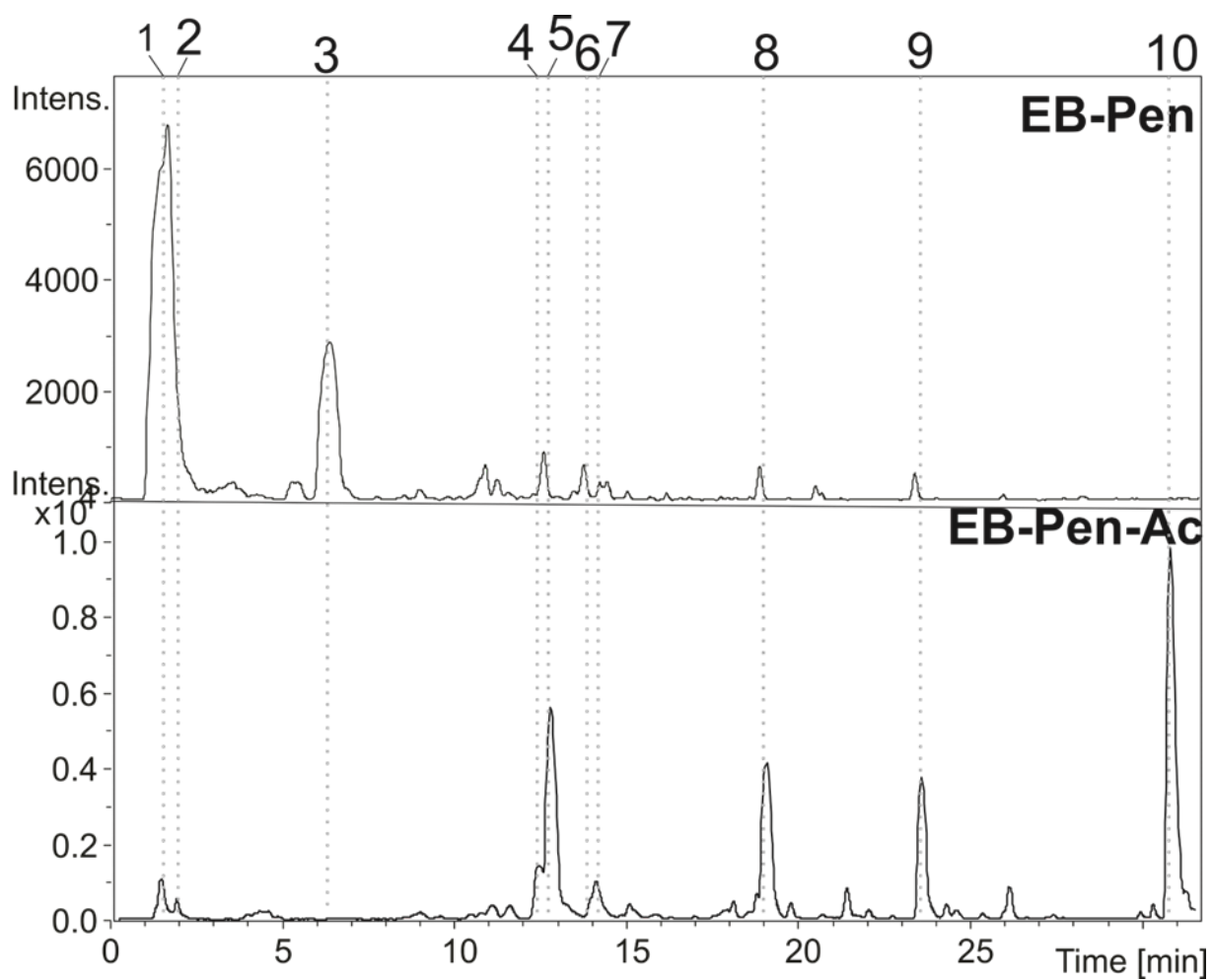


Figura 9 - Cromatogramas de pico base obtidos em modo de ionização negativa dos extratos EB-Pen e EB-Pen-Ac de *Penicillium rolfsii* 1IP2F2.

Tabela 2 - Anotação dos metabólitos presentes nos extratos EB-Pen e EB-Pen-Ac analisados por CLAE-DAD-EM.

Pico	TR (min)	Composto	FM*	Negativo (<i>m/z</i>)	
				EM [M-H] ⁻	EM/EM
1	1,3	Ácido cítrico/isocítrico	C ₆ H ₈ O ₇	191,0196	173
2	1,8	Ácido cítrico/isocítrico	C ₆ H ₈ O ₇	191,0204	173
3	6,1	NI	C ₁₀ H ₅ N ₂ O ₅	233,0171	-
4	12,2	NI	C ₁₈ H ₁₄ N ₂ O ₅	337,0837	309, 201, 185, 160
5	12,5	Ácido penicílico	C ₈ H ₁₀ O ₄	169,0503	-
6	13,6	Ácido orselínico	C ₈ H ₈ O ₄	167,0340	-
7	13,9	Dicetopiperazina	C ₁₈ H ₁₄ N ₂ O ₄	321,0881	293, 185, 160
8	18,8	NI	C ₁₀ H ₈ N ₂ O ₅	235,0338	193, 171, 155
9	23,4	Penicilazina	C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₉	431,1104	190
10	30,5	NI	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	179,0698	-

TR: tempo de retenção; FM: fórmula molecular; NI: não identificado

5.4.2. Avaliação dos extratos em testes de inibição do crescimento de bactérias e fungos fitopatogênicos

5.4.2.1. Inibição do crescimento da bactéria fitopatogênica *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli*

No ensaio antibacteriano, foi observada a inibição total do crescimento celular de *X. phaseoli* pv. *phaseoli* em todas as concentrações testadas do extrato aquoso bruto EB-Pen (70, 62,5, 57,9, 52,7, 48, 43,4, 38,5 e 33,8 mg/mL), a menor concentração testada apresentava 270,4 µg/mL de ácido penicílico. Em testes futuros serão analisados a inibição de crescimento dessa bactéria em menores concentrações para a determinação do valor da concentração inibitória mínima (CIM) e será usado o EB-Pen-Ac, o qual tem maior concentração do ácido penicílico.

A inibição do crescimento de bactérias do gênero *Xanthomonas* também foi observada e descrita por Vieira *et al.* (2022). Nesse estudo a *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, causadora de cancro cítrico, apresentou redução de 75,37% do crescimento em folhas de *Citrus sinensis* (L.) com a aplicação de 100 ml de uma solução de ácido penicílico a 25 µg/mL.

Em estudos anteriores desse mesmo grupo de pesquisa, o extrato obtido do cultivo de uma cepa do gênero *Penicillium* em meio de caldo de extrato de malte (tempo de cultivo 20 dias) foi obtido e este foi avaliado contra *X. citri*. Este extrato inibiu o crescimento bacteriano de *X. citri* em 90% a uma concentração de 2,9 mg/mL do extrato (Vieira *et al.*, 2018). Indicando que possivelmente a *X. phaseoli* pv. *phaseoli* poderá ter o seu crescimento inibido a uma menor concentração do EB-Pen.

5.4.2.2. Inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos

Nos ensaios de inibição do crescimento dos fungos fitopatogênicos, foi utilizado o extrato EB-Pen-Ac e as cepas fitopatogênicas foram *Fusarium* sp., *C. lindemuthianum*, *M. phaseolina* e *R. solani*. O extrato EB-Pen-Ac exibiu CIM entre 0,5 e 1,0 mg/mL para essas cepas fitopatogênicas (**Tabela 3**). Essas concentrações apresentavam 142 e 284 µg/mL de ácido penicílico, respectivamente.

A inibição de fungos do gênero *Fusarium* e *Colletotrichum* pelo ácido penicílico já havia sido documentada por Shen *et al.* (2020), contudo não realizaram testes de CIM. Nesse mesmo trabalho foi verificada a inibição de 67,5% no crescimento de *R. solani* com 50 µg/mL de ácido penicílico. A metodologia empregada foi adicionar o extrato do fungo no BDA e depois era medido o crescimento radial do fitopatógeno na placa.

O fungo *M. phaseolina* também teve inibição de crescimento documentada anteriormente, porém em testes de confronto com *Penicillium cyclopium* produtor de ácido penicílico e ácido ciclopiazônico (OMOIFO; IKOTUN, 1987).

Tabela 3 - Avaliação do extrato EB-Pen-Ac de *P. rolfsii* no ensaio de inibição do crescimento dos fungos fitopatogênicos

Fitopatógeno	CIM (mg/ml)
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	0,5
<i>Fusarium</i> sp.	0,5
<i>Macrophomina phaseolina</i>	1,0
<i>Rhizoctonia solani</i>	0,5

5.5. Avaliações em sementes de *Phaseolus vulgaris*

5.5.1. Avaliação da viabilidade das sementes de *Phaseolus vulgaris*

A viabilidade do lote das sementes de *P. vulgaris* utilizadas nos ensaios biológicos após o processo de desinfecção foi previamente determinada aplicando o método com TTC (BRASIL, 2009). Neste procedimento o tegumento e os cotilédones das sementes foram separados para a observação do embrião, sendo que aqueles que apresentavam coloração vermelha uniforme foram considerados viáveis, conforme metodologia descrita pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Assim, as sementes não viáveis apresentaram coloração vermelho vinho e/ou embriões sem pigmentação (**Figura 10**), enquanto as viáveis tinham coloração avermelhada (**Figura 11**). A viabilidade do lote de sementes de *P. vulgaris*

utilizadas no trabalho foi de 75% (com desvio de 5%) e nenhuma semente apresentou ausência de embrião ou cotilédone.



Figura 10 - Sementes de *P. vulgaris* não viáveis. A semente A não apresenta pigmentação no embrião e no cotilédone indicando tecido sem atividade celular e a semente B apresentou cor vermelho vinho sinalizando um possível tecido em necrose.



Figura 11 - Exemplo de semente *P. vulgaris* viável, como coloração rosada a vermelha de forma uniforme pelo embrião e cotilédone

O reagente colorimétrico TTC utilizado na avaliação da viabilidade das sementes de *P. vulgaris* indica se há atividade celular, uma vez que ele reage com enzimas desidrogenases responsáveis pela glicólise, ciclo de Krebs e cadeia respiratória de elétrons. Essas enzimas reagem com o sal de tetrazólio (incolor) o reduzindo a trifenílformazan (cor vermelha). Assim, tecidos saudáveis apresentam coloração vermelha ou rosada, mas quando o tecido

sofre danos como necrose a coloração é mais intensa devido a rápida difusão do TTC pelo tecido da semente (BARROS *et al.*, 2005; FRANÇA-NETO; KRZYZANOWSKI, 2019).

A porcentagem de viabilidade com teste de TTC de um lote de semente pode ser classificada, segundo França-Neto e colaboradores (2018), da seguinte forma: (1) vigor muito alto (igual ou superior a 90%), (2) vigor alto (entre 85% a 89%), (3) vigor médio (entre 75% a 84%) e (4) vigor baixo (igual ou inferior a 74%). Portanto, o lote de utilizado de *P.vulgaris* apresenta vigor médio, esse parâmetro foi usado para avaliar se os testes seguintes poderiam prejudicar a viabilidade das sementes. Estabelecer essa porcentagem de viabilidade é de suma importância para a padronização dos testes de alelopatia e de sementes contaminadas, pois diversos fatores ambientais e fisiológicos podem impedir a germinação (VITIS *et al.*, 2020; REED; BRADFORD; KHANDAY, 2022).

5.5.2. Efeito fitotóxico dos extratos de *Penicillium rolfii* 11P2F2 sobre *Phaseolus vulgaris*

Para avaliar se o Eb-Pen-Ac poderia prejudicar a germinação e o crescimento inicial de plântulas de *P. vulgaris* foi realizado um teste de alelopatia com as concentrações de 0,5, 1,75 e 3 mg/mL, essas concentrações apresentavam respectivamente 142, 497 e 852 µg/mL de ácido penicílico. Como observado na **Figura 12**, a porcentagem de germinação não apresentou diferença estatística em nenhum dos tratamentos testados, indicando que não o extrato inibiu a germinação quando comparado com o controle.

Essa observação diverge do que foi relatado anteriormente por Keromnes e Thouvenot (1985), onde extrato de fungos produtores de ácido penicílico inibiram a germinação de sementes de milho (*Zea mays* L.) e reduziu o tamanho das raízes em 50% com 500 µg/mL do ácido. A redução da raiz (**Figura 13**) e do peso úmido (**Figura 14**) também não foram observados no teste. Contudo houve uma diferença estatística nas medidas da parte aérea da plântula, nas concentrações de 0,5 e 1,75 mg/mL.

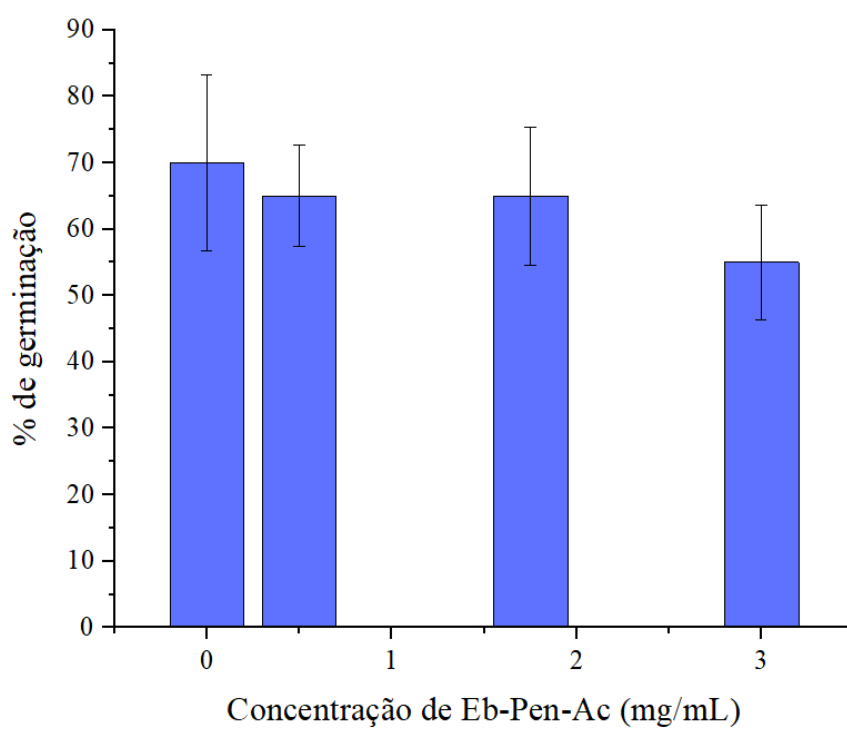


Figura 12 - Gráfico com a média das porcentagens de germinação no 6º dia de cultivo de *P. vulgaris* com os tratamentos 2, 1 e 0,5 mg/mL de Eb-Pen-Ac e o controle. Não houve detecção de diferença estatística pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

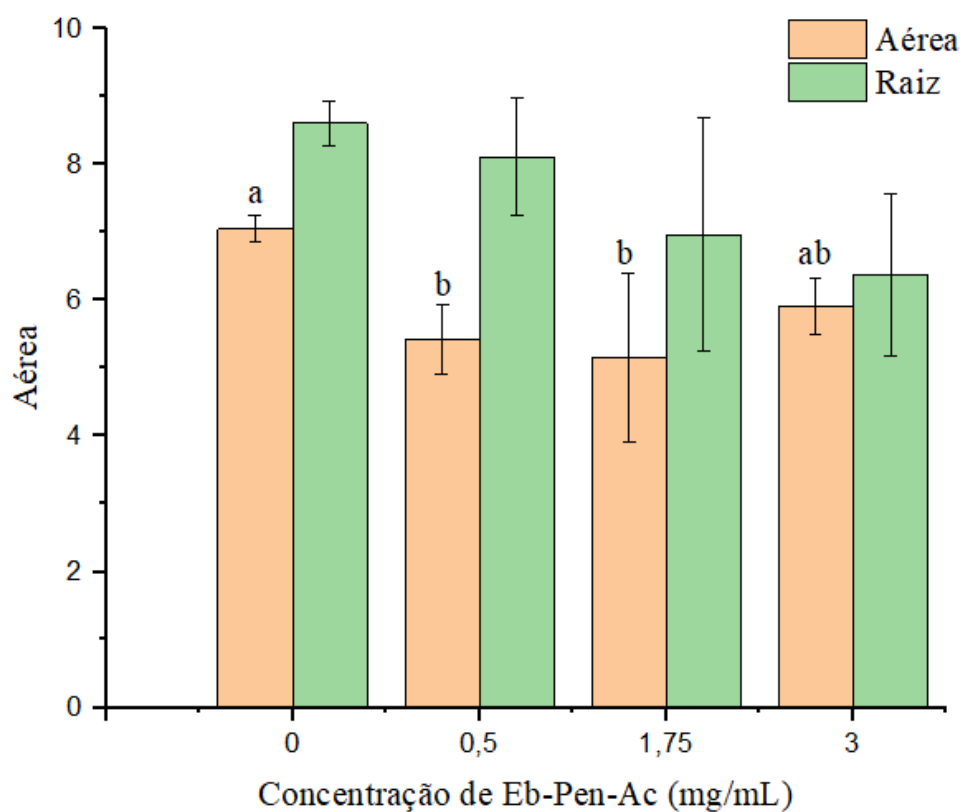


Figura 13 - Gráfico com a média das medidas em cm da parte aérea e da raiz primária da plântula de *P. vulgaris* no 7º dia de cultivo em ágar 1% com os tratamentos 2, 1 e 0,5 mg/mL de Eb-Pen-Ac e o controle. As letras indicam diferença estatística entre as médias pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). As medidas da raiz e da parte aérea foram analisadas separadamente na estatística.

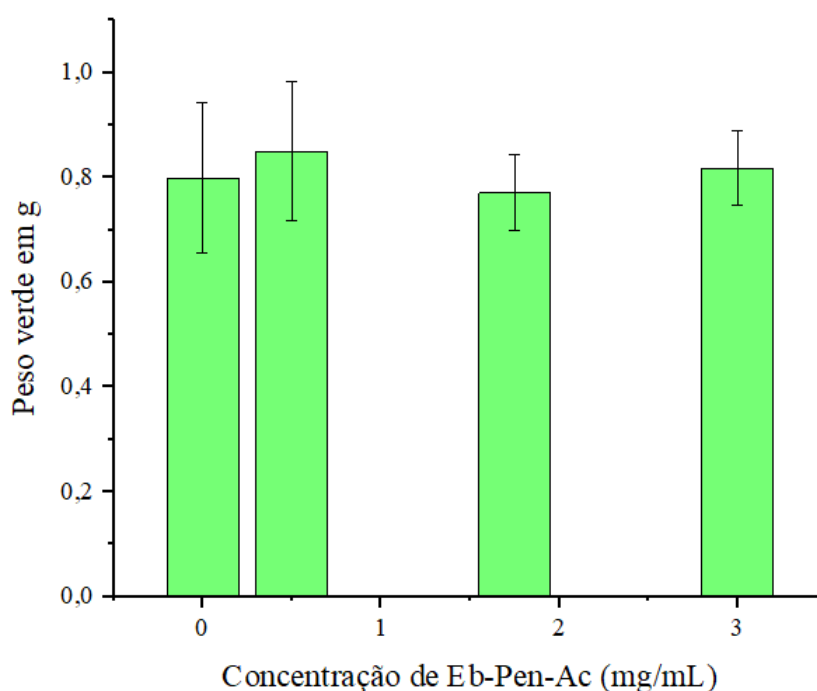


Figura 14 - Gráfico com a média do peso verde em g da plântula de *P. vulgaris* no 7º dia de cultivo em ágar 1%. Não houve diferença estatística detectada pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Em pesquisas mais recentes, quando aplicado o ácido penicílico ocorreu sintomas de toxicidade em brotos de macieira (*Malus asiatica* Nakai) no 3º dia após a aplicação superficial com concentrações acima de 250 µg/mL. Porém uma concentração de 100 µg/mL foi o suficiente para inibir a infecção causada pela bactéria *Erwinia amylovora* em 77% (KIM *et al.*, 2022). Portanto, o uso do ácido penicílico pode ser indicado em baixas concentrações e quando houver risco de contaminação dos patógenos.

5.5.3. Efeito dos extratos de *Penicillium rolfsii* 1IP2F2 sobre as sementes de *Phaseolus vulgaris* contaminadas com fitopatógenos

O tratamento de sementes é um método para reduzir o risco de contaminação via semente e para isso as sementes são submersas em antimicrobianos (TAYLOR; HARMAN, 1990). Para avaliar o uso do Eb-Pen-Ac para o tratamento de *P. vulgaris* as sementes foram submersas em solução com concentração de 0,5 mg/mL do extrato. Essa concentração foi

escolhida pois foi o CIM dos fungos *R. solani*, *Fusarium* sp. e *C. lindemuthianum* do microcultivo. Esses fungos foram testados pois apresentaram maior sensibilidade ao extrato.

Nesse teste, o tratamento que apresentou maior média de porcentagem de germinação (80%) foi o com sementes tratadas com Eb-Pen-Ac e contaminadas com *R. solani* enquanto as sementes contaminadas apresentaram 65% de germinação (**Figura 15**). Mas a diferença mais significativa foi observada na medição das raízes, onde as sementes sem tratamento tiveram uma média de 2,6 cm e as com tratamento e contaminadas tiveram 5,6 cm (**Figura 16**).

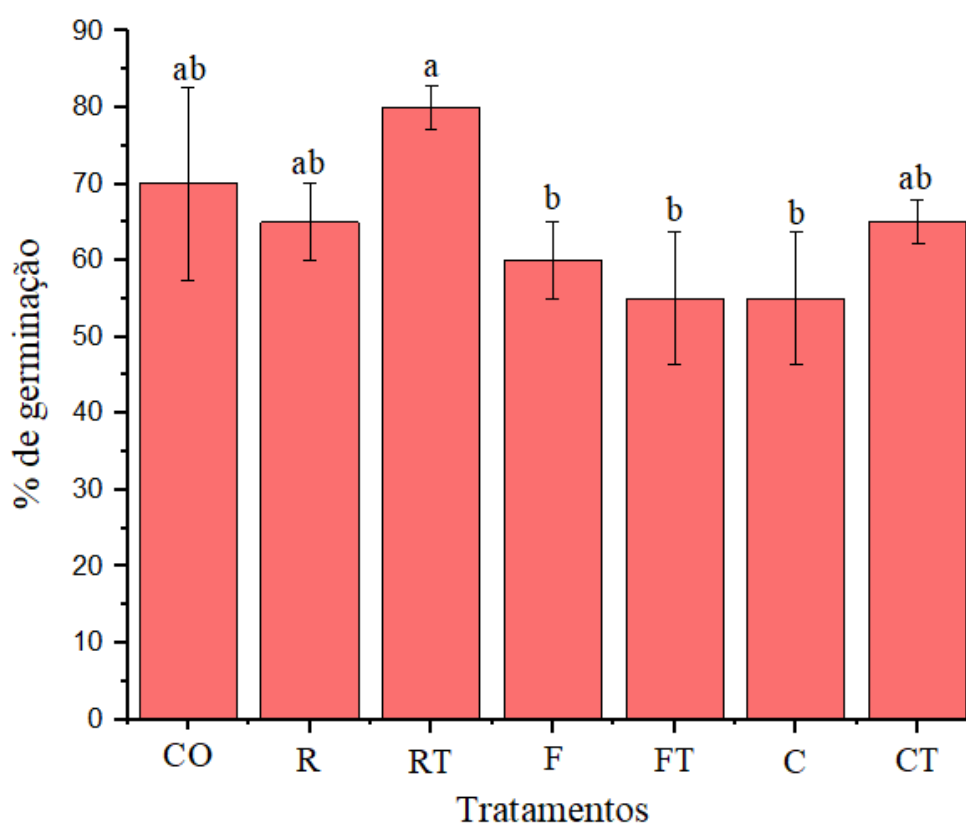


Figura 15 - Gráfico com a porcentagem de germinação de *P. vulgaris* no 6º dia de cultivo em ágar 1% em relação aos tratamentos controle (CO), contaminado com os patógenos *R. solani* (R), *Fusarium* sp. (F) e *C. lindemuthianum* (C) e com as sementes contaminadas com os patógenos e que passaram pelo tratamento com Eb-Pen-Ac (patógeno + T). As letras diferentes indicam diferença estatística entre as médias pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

As demais medidas de raiz, parte aérea e peso (**Figura 16** e **Figura 17**) não apresentaram diferença estatística significativa entre os tratamentos com as sementes com Eb-Pen-Ac e patógeno ou somente com patógeno. Contudo foi observado que plântulas nos testes sem tratamento infectadas com *R. solani* apresentavam sintomas, com manchas no caule, na plúmula e cotilédone (**Figura 18**), enquanto as que passaram pelo tratamento não apresentavam as manchas, aumentando as chances de um desenvolvimento sadio (AKBER *et al.*, 2023). Essa diferença não foi observada em outros tratamentos, contudo o aumento da concentração do extrato pode intensificar a proteção da semente, visto que foram observados poucos sintomas de alelopatia causados pelo Eb-Pen-Ac nos testes anteriores. Em trabalhos futuros, outras concentrações do Eb-Pen-Ac poderão ser avaliadas para obter um resultado de maior controle dos fitopatógenos.

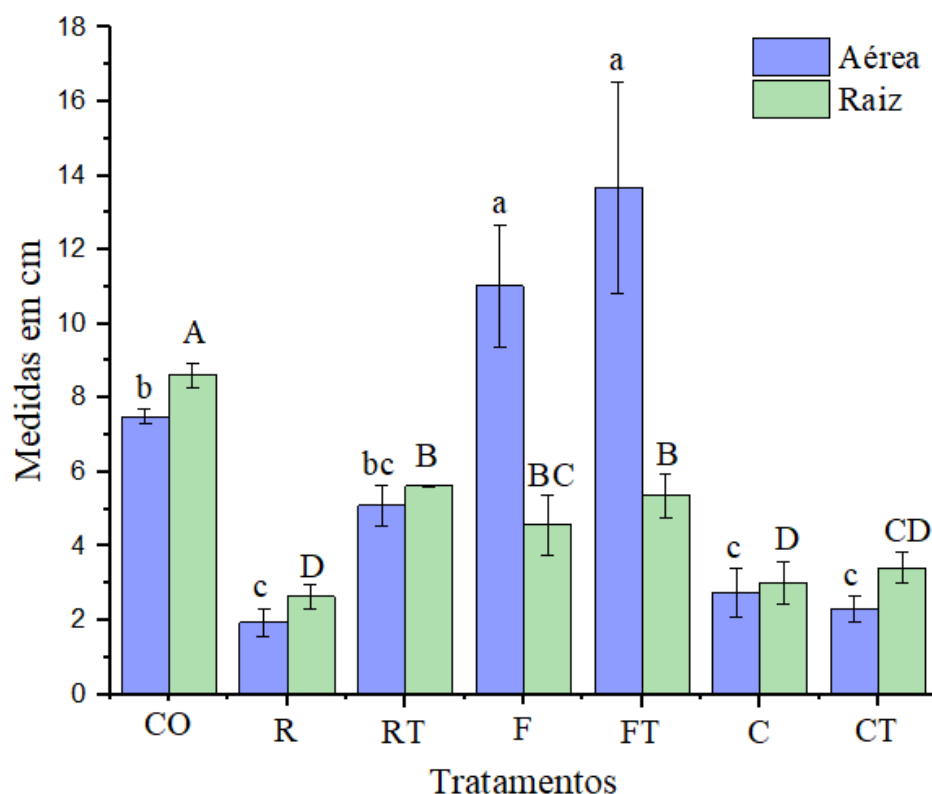


Figura 16 - Gráfico das medidas em cm da parte aérea e da raiz primária de plântulas de *P. vulgaris* no 7º dia de cultivo em ágar 1% em relação aos tratamentos controle (CO), contaminado com os patógenos *R. solani* (R), *Fusarium* sp. (F) e *C. lindemuthianum* (C) e com as sementes contaminadas com os patógenos e que passaram pelo tratamento com Eb-Pen-Ac (patógeno + T). Os dados da raiz e da parte aérea foram analisados estatisticamente de forma separada, as letras indicam diferença estatística entre as médias pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

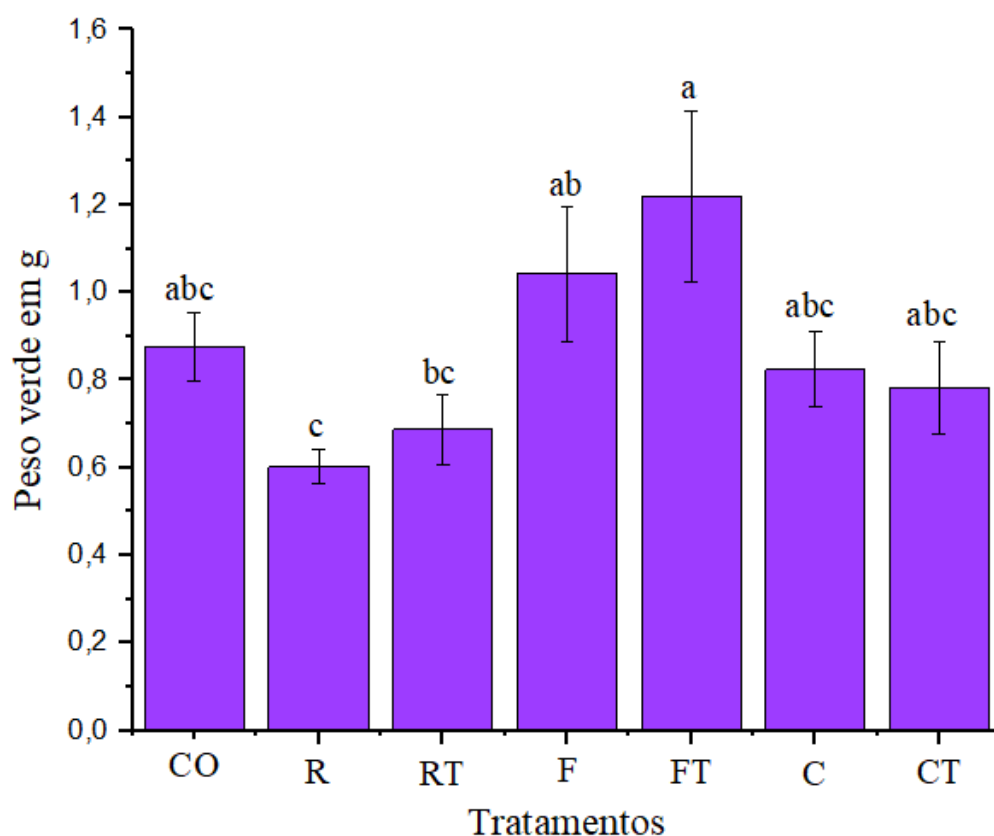


Figura 17 - Gráfico do peso úmido em g das plântulas de *P. vulgaris* no 7º dia de cultivo em ágar 1% em relação aos tratamentos controle (CO), contaminado com os patógenos *R. solani* (R), *Fusarium* sp. (F) e *C. lindemuthianum* (C) e com as sementes inoculadas com os patógenos e que passaram pelo tratamento com Eb-Pen-Ac (patógeno + T). As letras indicam diferença estatística entre as médias pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).



Figura 18 - Registro de plântulas do teste do efeito dos extratos de *P. rolfsii* sobre as sementes de *P. vulgaris* contaminadas com *R. solani*. A semente da plântula da esquerda não foi submersa em Eb-Pen-Ac e apresenta sintomas de infecção por *R. solani*, com manchas escuras no caule, plúmula e cotilédone. A plântula da direita passou pelo tratamento com Eb-Pen-Ac e foi contaminada com *R. solani*.

Palacioğlu e colaboradores (2019) constataram que o fungicida químico sedaxane reduziu em 44% a infecção causada pelo *R. solani* no feijão e aumentou 93,3% a germinação em relação com as sementes não tratadas e com inóculos do fungo. Contudo esse composto apresenta altos riscos de contato a longo prazo a aves e mamíferos.

O uso de ácido penicílico como tratamento de semente ainda não havia sido relatado e o uso de fungicidas de origem fúngica em sementes ainda é pouco explorado. Mas com o aumento da resistência dos fitopatógenos aos defensivos químicos novas alternativas devem ser estudadas (Kim *et al.*, 2022).

6. CONCLUSÃO

O *Penicillium rolfisii* 1IP2F2 não inibiu o crescimento dos fungos fitopatógenos *Fusarium* sp, *Rizoctonia solani* e *Macrophomina phaseolina*. Contudo o seu extrato de acetato de etila com ácido penicílico inibiu o crescimento dos fungos *Fusarium* sp, *R. solani* e *C. lindemuthianum* na concentração de 0,5 mg/mL, equivalente a 142 µg/mL de ácido penicílico. Esse extrato não apresentou diferenças significativas quando ao realizar o teste de alelopatia nessa concentração. Além de reduzir a infecção causada pelo *R. solani* em sementes tratadas com o extrato. Sugerindo assim, o uso e estudos futuros de aplicação do extrato para mitigar doenças fúngicas e bacterianas em feijão através do tratamento das sementes em concentrações que não prejudiquem a produção. É indicado em estudos futuros a aplicação da substância em solos contaminados e o acompanhamento do crescimento de *P. rolfisii* para avaliar de forma mais ampla os efeitos de alelopatia e controle de fitopatógenos.

7. REFERÊNCIAS

- AJAYI-OYETUNDE, O. O.; BRADLEY, C. A. *Rhizoctonia solani*: taxonomy, population biology and management of rhizoctonia seedling disease of soybean. **Plant Pathology**, v. 67, n. 1, p. 3-17, 2 ago. 2017.
- ANDRADE, P. M. L.; BAPTISTA, L.; BEZERRA, C. O.; PERALTA, R. M.; GÓES-NETO, A.; UETANABARO, A. P. T.; COSTA, A. M. Immobilization and characterization of tannase from *Penicillium rolsii* CCMB 714 and its efficiency in apple juice clarification. **Journal Of Food Measurement And Characterization**, v. 15, n. 2, p. 1005-1013, 2020.
- AKBER, M. A.; MUBEEN, M.; SOHAIL, M. A.; KHAN, S. W.; SOLANKI, M. K.; KHALID, R.; ABBAS, A.; DIVVELA, P. K.; ZHOU, L. Global distribution, traditional and modern detection, diagnostic, and management approaches of *Rhizoctonia solani* associated with legume crops. **Frontiers In Microbiology**, v. 13, p. 1-19, 2023.
- AKHTAR, S.; SHOAIB, A.; JAVIAD, I.; QAISAR, U.; TASADDUQ, R. Farmyard manure, a potential organic additive to reclaim copper and *Macrophomina phaseolina* stress responses in mash bean plants. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 14383, 2023.
- ARENDRUP, M. C.; MELETIADIS, J.; MOUTON, J. W.; LAGROU, K.; HAMAL, P.; GUINEA, J. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. **Def**, v. 9.3.2, n. 1, 2020.
- ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal biology reviews**, v. 21, n. 2-3, p. 51-66, 2007.
- BARROS, D. I.; DIAS, D. C. F. D. S.; BHERING, M. C.; DIAS, L. A. D. S.; ARAÚJO, E. F. Uso do teste de tetrazólio para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de abobrinha. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, p. 165-171, 2005.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. Plant growth-promoting. **Encyclopedia of soils in the environment**, v. 1, p. 103-115, 2005.
- BAURI, A. K.; SHERKHANE, P. D.; MUKHERJEE, P.; KHAN, Z.; BANERJEE, K.; BLANCO, E. J. C.; EUGENIO, G. A.; FORO, S.; MUKHERJEE, P. K. Identification of penicillic acid as the active principle of *Penicillium polonicum* inhibiting the plant pathogen

Pythium aphanidermatum, and elucidation of its crystal structure. **ChemistrySelect**, v. 7, n. 9, p. 1-5, 2022.

BAWA, U. Heavy metals concentration in food crops irrigated with pesticides and their associated human health risks in Paki, Kaduna State, Nigeria. **Cogent Food & Agriculture**, v. 9, n. 1, p. 1-24, 2023.

BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAN, C. R.. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal pathogens. **Phytopathology**, [s.l.], v. 72, p. 379-382, 1982.

BELLENGER, J. P.; DARNAJOUX, R.; ZHANG, X.; KRAEPIEL, A. M. L. Biological nitrogen fixation by alternative nitrogenases in terrestrial ecosystems: a review. **Biogeochemistry**, v. 149, n. 1, p. 53-73, 2020.

BELETE, T; BASTAS, K K. Common bacterial blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) of beans with special focus on Ethiopian condition. **Journal Of Plant Pathology & Microbiology**, v. 08, n. 03, p. 1-10, 2017.

BITOCCHI, E.; RAU, D.; BELLUCCI, E.; RODRIGUEZ, M.; MURGIA, M. L.; GIOIA, T.; SANTO, D.; NANNI, L.; ATTENE, G.; PAPA, R. Beans (*Phaseolus* ssp.) as a Model for Understanding Crop Evolution. **Frontiers In Plant Science**, v. 8, p. 1-21, 2017.

BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2006.

BRAKHAGE, A. A. Regulation of fungal secondary metabolism. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 21-32, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, p. 398, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **AGROFIT**, Sistema de agrotóxicos fitossanitários. 2024. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2024. Disponível em: <<https://mapa-indicadores.agricultura.gov.br/publico/extensions/AGROFIT/AGROFIT.html>>. Acesso em: 5 jul. 2024.

BRUSTOLIN, R.; REIS, E. M.; PEDRON, L. Longevity of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia on the soil surface under field conditions. **Summa Phytopathologica**, v. 42, p. 172-174, 2016.

CANALE, M. C.; DO PRADO RIBEIRO, L.; CASTLHOS, R. V.; WORDELL FILHO, J. A. Pragas e doenças do feijão: diagnose, danos e estratégias de manejo. **Boletim Técnico**, n. 197, 2020.

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

CHAVES, M. A.; REGINATTO, P.; COSTA, B. S.; PASCHOAL, R. I.; TEIXEIRA, M. L.; FUENTEFRIA, A. M. Fungicide resistance in *Fusarium graminearum* species complex. **Current Microbiology**, v. 79, n. 2, p. 62, 2022.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**: safra 2022/2023. Brasília, v. 10, n. 12, 2023.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**: safra 2023/2024. Brasília, v. 11, n. 9, 2024.

COSTA, J. G. C.; WENDLAND, A.; DIAS, A. G.; OLIVEIRA, J. P. variedades tradicionais de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), com tipo de grão vermelho, resistentes à antracnose. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 7., 2013, Uberlândia. **Anais do 7º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**. Uberlândia: Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, p. 3201-3203, 2013.

CASTRO, R. D.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Candida* spp. **Revista de Odontologia da UNESP**, p. 179-184, 2010.

DAROODI, Z.; TAHERI, P.; TARIGHI, S. *Acrophialophora jodhpurensis*: an endophytic plant growth promoting fungus with biocontrol effect against alternaria alternata. **Frontiers In Plant Science**, v. 13, p. 1-18, 2022.

DWEBA, C.C.; FIGLAN, S.; SHIMELIS, H.A.; MOTAUNG, T. E.; SYDENHAM, S.; MWADZINGENI, L.; TSILO, T.J. *Fusarium* head blight of wheat: pathogenesis and control strategies. **Crop Protection**, v. 91, p. 114-122, 2017.

ECONOMOU, V.; GOUSIA, P. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. **Infection and drug resistance**, p. 49-61, 2015.

EPAGRI - EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA (Santa Catarina). **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina: 2022/2023**. Florianópolis, 2023.

FAI, P. B.; GRANT, A. A rapid resazurin bioassay for assessing the toxicity of fungicides. **Chemosphere**, v. 74, n. 9, p. 1165-1170, 2009.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Brazilian Journal of Biometrics**, v. 37, n. 4, p. 529–535, 2019.

FONSECA, F.; MARIN, M.; MORRIS, G. J.. Stabilization of frozen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in glycerol suspensions: freezing kinetics and storage temperature effects. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 72, n. 10, p. 6474-6482, 2006.

FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C. Tetrazolium: an important test for physiological seed quality evaluation. **Journal Of Seed Science**, v. 41, n. 3, p. 359-366, 2019.

FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; PÁDUA, G. P.; LORINI, I. Características fisiológicas da semente: vigor, viabilidade, germinação, danos mecânicos tetrazólio, deterioração por umidade tetrazólio, dano por percevejo tetrazólio e sementes verdes. In: LORINI, I. **Qualidade de sementes e grãos comerciais de soja no Brasil – safra 2016/17**. Londrina: Embrapa Soja, p. 31-59, 2018.

GRANADE, T. C.; HEHMANN, M. F.; ARTIS, W. M. Monitoring of filamentous fungal growth by in situ microspectrophotometry, fragmented mycelium absorbance density, and ¹⁴C incorporation: alternatives to mycelial dry weight. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 101-108, 1985.

GUERRERO-GONZÁLEZ, M. L.; RODRÍGUEZ-KESSLER, M.; RODRÍGUEZ-GUERRA, R.; GONZÁLEZ-CHAVIRA, M.; SIMPSON, J.; SANCHEZ, F.; JIMÉNEZ-BREMONT, J. F.. Differential expression of *Phaseolus vulgaris* genes induced during the interaction with *Rhizoctonia solani*. **Plant Cell Reports**, v. 30, n. 8, p. 1465-1473, 2011.

GULEWICZ, P.; MARTINEZ-VILLALUENGA, C.; KASPROWICZ-POTOCKA, M.; FRIAS, J. Non-nutritive compounds in fabaceae family seeds and the improvement of their nutritional quality by traditional processing – a Review. **Polish Journal Of Food And Nutrition Sciences**, v. 64, n. 2, p. 75-89, 2014.

HASHEM, A. H.; ATTIA, M. S.; KANDIL, E. K.; FAWZI, M. M.; ABDELRAHMAN, A. S.; KHADER, M. S.; KHODAIRA, M. A.; EMAM, A. E.; GOMA, M. A.; ABDELAZIZ, A. M. Bioactive compounds and biomedical applications of endophytic fungi: a recent review. **Microbial Cell Factories**, v. 22, n. 1, p. 1-23, 2023.

ISMAIEL, A.; PAPENBROCK, J. Mycotoxins: producing fungi and mechanisms of phytotoxicity. **Agriculture**, v. 5, n. 3, p. 492-537, 2015.

JIN-CHEOL, K.; TIHUA, U.; NAN-HEE, Y.; HYANG-BUM, L.; SUN-JUNG, J.; HYE-WON, L.; JI-HYUNG, K.; CHANG-HWAN, B.; JU-HONG, Y. **Composition for controlling plant disease comprising *Aspergillus persii* strain producing penicillic acid as effective component and uses thereof**. Titular: Chonnam National University Industry-Academic Cooperation Foundation. Procurador: Choi Kyu-Hwan. KR n. 10-2017-0054899. Depósito: 10 nov. 2015. Concessão: 18 maio 2017. p. 1-12, 2017.

HU, Y. J.; YANG, H. M.; JIN, J.; YAN, H. H.; WANG, J. P.; ZHANG, R. Q. Synergistic activity of antagonistic *Trichoderma* spp. and *Rhizoctonia solani* increases disease severity on strawberry petioles. **European Journal Of Plant Pathology**, v. 164, n. 3, p. 375-389, 2022.

HUNJAN, M. S.; LORE, J. S. Climate Change: impact on plant pathogens, diseases, and their management. **Crop Protection Under Changing Climate**, p. 85-100, 2020.

KANDEL, Y. R.; BRADLEY, C. A.; CHILVERS, M. I.; MATHEW, F. M.; TENUTA, A. U.; SMITH, D. L.; WISE, K. A.; MUELLER, D. S. Effect of seed treatment and foliar crop protection products on sudden death syndrome and yield of soybean. **Plant disease**, v. 103, n. 7, p. 1712-1720, 2019.

KANG, S. W.; KIM, S. W. New antifungal activity of penicillic acid against *Phytophthora* species. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 695-698, 2004.

KARDOS, N.; DEMAINE, A. L. Penicillin: the medicine with the greatest impact on therapeutic outcomes. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 92, p. 677-687, 2011.

KASHYAP, P. L.; KUMAR, S.; SRIVASTAVA, A. K. Nanodiagnostics for plant pathogens. **Environmental Chemistry Letters**, v. 15, p. 7-13, 2017.

KAUR, S.; DHILLON, G. S.; BRAR, S. K.; VALLAD, G. E.; CHAND, R.; CHAUHAN, V. B. Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. **Critical Reviews In Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 136-151, 2012.

KEBEDE, E. Contribution, Utilization, and Improvement of Legumes-Driven Biological Nitrogen Fixation in Agricultural Systems. **Frontiers In Sustainable Food Systems**, v. 5, p. 1-18, 2021.

KEROMNES, J.; THOUVENOT, D. Role of penicillic acid in the phytotoxicity of *Penicillium cyclopium* and *Penicillium canescens* to the germination of corn seeds. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 660-663, mar. 1985.

KHAN, I. H.; JAVAID, A. In vitro screening of *Aspergillus* spp. for their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina*. **Journal Of Plant Pathology**, v. 103, n. 4, p. 1195-1205, 2021.

KIM, Y. S.; NGO, M. T.; KIM, B.; HAN, J. W.; SONG, J.; PARK, M. S.; CHOI, G. J.; KIM, Hun. Biological Control Potential of *Penicillium brasilianum* against Fire Blight Disease. **The Plant Pathology Journal**, v. 38, n. 5, p. 461-471, 2022.

KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W.; STALPERS, J. A. (ed.). **Dictionary of the fungi**. 10. ed., CABI Europe., 2008.

KUMAR, N.; SRIVASTAVA, P.; VISHWAKARMA, K.; KUMAR, R.; KUPPALA, H.; MAHESHWARI, S. K.; VATS, S. The Rhizobium–Plant Symbiosis: state of the art. In: VARMA, A.; TRIPATHI, S.; PRASAD, R. (ed.). **Plant Microbe Symbiosis**. Springer, Cap. 1. p. 1-20, 2020.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chemistry & biology**, v. 19, n. 7, p. 792-798, 2012.

LAKSHMEESHA, T.R.; MURALI, M.; ANSARI, M. A.; UDAYASHANKAR, A. C.; ALZOHAIY, M. A.; ALMATROUDI, A.; ALOMARY, M. N.; ASIRI, S. M. M.; ASHWINI, B. S.; KALAGATUR, N. K. Biofabrication of zinc oxide nanoparticles from *Melia azedarach*

and its potential in controlling soybean seed-borne phytopathogenic fungi. **Saudi Journal Of Biological Sciences**, v. 27, n. 8, p. 1923-1930, 2020.

LAWRENCE, D.; VANDECAR, K. Effects of tropical deforestation on climate and agriculture. **Nature climate change**, v. 5, n. 1, p. 27-36, 2015.

LEE, K. C.; ARAI, T.; IBRAHIM, D.; KOSUGI, A.; PRAWITWONG, P.; LAN, D.; MURATA, Y.; MORI, Y. Purification and characterization of a thermostable laminarinase from *Penicillium rolfsii* c3-2 (1) IBRL. **BioResources**, v. 9, n. 1, p. 1072-1084, 2014.

LEE, K. C.; ARAI, T.; IBRAHIM, D.; PRAWITWONG, P.; LAN, D.; MURATA, Y.; MORI, Y.; KOSUGI, A. Purification and characterization of a xylanase from the newly isolated *Penicillium rolfsii* c3-2 (1) IBRL. **BioResources**, v. 10, n. 1, p. 1627-1643, 2015.

LING, S.; LI, X.; ZHAO, Q.; WANG, R.; TAN, T.; WANG, S. Preparation of monoclonal antibody against penicillic acid (PA) and its application in the immunological detection. **Food Chemistry**, v. 319, p. 126505, 2020.

MACHELEIDT, J.; MATTERN, D. J.; FISCHER, J.; NETZKER, T.; WEBER, J.; SCHROECKH, V.; VITO, V.; BRAKHAGE, A. A. Regulation and role of fungal secondary metabolites. **Annual review of genetics**, v. 50, p. 371-392, 2016.

MAO, Q., MA, S., SCHRICKEL, P. L., ZHAO, P., WANG, J., ZHANG, Y., LI, S.; WANG, C. Review detection of Newcastle disease virus. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, p. 936251, 2022.

MARQUEZ, N.; GIACHERO, M. L.; DECLERCK, S.; DUCASSE, D. A. *Macrophomina phaseolina*: general characteristics of pathogenicity and methods of control. **Frontiers In Plant Science**, v. 12, p. 1-16, 2021.

MARTINS-CORDER, M.P.; MELO, I.S. de. Antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* KLEB. **Scientia Agricola**, [s.l.], v. 55, n. 1, p. 1-7, 1998.

MAYO, S.; GUTIERREZ, S.; MALMIERCA, M. G.; LORENZANA, A.; CAMPELO, M. P.; HERMOSA, R.; CASQUERO, P. A. Influence of *Rhizoctonia solani* and *Trichoderma* spp. in growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and in the induction of plant defense-related genes. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 685, 2015.

MCCALLEY, D. V.; TORRES-GRIFOL, J. F. Analysis of volatiles from oranges in good and bad condition by gas chromatography and gas chromatography–mass spectrometry. **Analyst**, v. 117, n. 4, p. 721-725, 1992.

MÉRILLON, J. M.; RAMAWAT, K. G. (ed.). **Fungal Metabolites**. Springer Nature, 2017.

MOHAMMED, A. An overview of distribution, biology and the management of common bean anthracnose. **Journal of plant pathology and microbiology**, v. 4, n. 8, p. 1-6, 2013.

NOFAL, A. M.; EL-RAHMAN, M. A.; ABDELGHANY, T. M.; EL-MONGY, M. A. Mycoparasitic nature of Egyptian *Trichoderma* isolates and their impact on suppression *Fusarium* wilt of tomato. **Egyptian Journal Of Biological Pest Control**, v. 31, n. 1, p. 1-8, 2021.

NONAKA, K.; CHIBA, T.; SUGA, T.; ASAMI, Y.; IWATSUKI, M.; MASUMA, R.; ŌMURA, S.; SHIOMI, K. Coculnol, a new penicillic acid produced by a coculture of *Fusarium solani* FKI-6853 and *Talaromyces* sp. FKA-65. **The Journal Of Antibiotics**, v. 68, n. 8, p. 530-532, 2015.

O'CONNOR, S. E. Engineering of secondary metabolism. **Annual review of genetics**, v. 49, p. 71-94, 2015.

OK, K. S.; JIN, J. M.; SOM, K.; GU, K. D.; YONG, P. J. **Novel Strain of *Penicillium bissettii* with Anti-bacterial and Anti-fungal Activity and Uses thereof**. Titular: Epublic Of Korea, Ministry Of Environment National Institute Of Biological Resources. Procurador: An Chang Woo. KR n. 10-2022-0048534. Depósito: 12 out. 2020. Concessão: 20 abr. 2022.

OLADZAD, A.; ZITNICK-ANDERSON, K.; JAIN, S.; SIMONS, K.; OSORNO, J. M.; MCCLEAN, P. E.; PASCHE, J. S. Genotypes and genomic regions associated with *Rhizoctonia solani* resistance in common bean. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 956, 2019.

OLIVEIRA, M. N. S.; MERCADANTE, M. O.; NASCIMENTO LOPES, P. S.; CORDEIRO GOMES, I. A.; GUSMÃO, E.; MONTEIRO RIBEIRO, L. Efeitos alelopáticos extratos aquoso e etanólico de jatobá do cerrado. **Revista Unimontes Científica**, v. 4, n. 2, p. 143–152, 2020.

OMOIFO, C.; IKOTUN, T. Inhibition of growth of some plant pathogens by antagonistic microorganisms. **Journal of basic microbiology**, v. 27, n. 9, p. 515-519, 1987.

O'SULLIVAN, C. A.; BELT, K.; THATCHER, L. F. Tackling control of a cosmopolitan phytopathogen: *Sclerotinia*. **Frontiers In Plant Science**, v. 12, p. 1-18, 2021.

PADDER, B. A.; SHARMA, P. N.; AWALE, H. E.; KELLY, J. D. *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of bean anthracnose. **Journal of Plant Pathology**, p. 317-330, 2017.

PALACIOĞLU, G.; CANKARA, B.; BAYRAKTAR, H.; ÖZER, G. Efficacy of seed treatments with some fungicides against bean root rot caused by *Rhizoctonia solani*. **Uluslararası Tarım Ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi**, v. 5, n. 1, p. 96-102, 30 jun. 2019.

PANG, Z.; CHEN, J.; WANG, T.; GAO, C.; LI, Z.; GUO, L.; XU, J.; CHENG, Y. Linking plant secondary metabolites and plant microbiomes: a review. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 621276, 2021.

PENG, Y.; LI, S. J.; YAN, J.; TANG, Y.; CHENG, J. P.; GAO, A. J.; YAO, X.; RUAN, J. J.; XU, B. L. Research progress on phytopathogenic fungi and their role as biocontrol agents. **Frontiers In Microbiology**, v. 12, p. 1-12, 2021.

PEREIRA, J. L.; QUEIROZ, R. M. L.; CHARNEAU, S. O.; FELIX, C. R.; RICART, C. A. O.; SILVA, F. L.; STEINDORFF, A. S.; ULHOA, C. J.; NORONHA, E. F.. Analysis of phaseolus vulgaris response to its association with *Trichoderma harzianum* (ALL-42) in the presence or absence of the phytopathogenic fungi *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani*. **Plos One**, v. 9, n. 5, p. 1-23, 2014.

PÉREZ-HERNÁNDEZ, A.; ROCHA, L. O.; PORCEL-RODRÍGUEZ, E.; SUMMERELL, B. A.; LIEW, E. C. Y.; GÓMEZ-VÁZQUEZ, J. M. Pathogenic, morphological, and phylogenetic characterization of *Fusarium solani* f. sp. cucurbitae isolates from Cucurbits in Almería Province, Spain. **Plant Disease**, v. 104, n. 5, p. 1465-1476, 2020.

PRIOR, R.; MITTELBAACH, M.; BEGEROW, D. Impact of three different fungicides on fungal epi-and endophytic communities of common bean (*Phaseolus vulgaris*) and broad bean (*Vicia faba*). **Journal of Environmental Science and Health**, v. 52, n. 6, p. 376-386, 2017.

PONGCHAROEN, W.; RUKACHAISIRIKUL, V.; PHONGPAICHIT, S.; KÜHN, T.; PELZING, M.; SAKAYAROJ, J.; TAYLOR, W. C. Metabolites from the endophytic fungus *Xylaria* sp. PSU-D14. **Phytochemistry**, v. 69, n. 9, p. 1900-1902, 2008.

RAMÍREZ-RENDON, D.; PASSARI, A. K.; RUIZ-VILLAFÁN, B.; RODRÍGUEZ-SANOJA, R.; SÁNCHEZ, S.; DEMAINE, A. L. Impact of novel microbial secondary metabolites on the pharma industry. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 106, n. 5-6, p. 1855-1878, 21 fev. 2022.

REED, R. C.; BRADFORD, K. J.; KHANDAY, I. Seed germination and vigor: ensuring crop sustainability in a changing climate. **Heredity**, v. 128, n. 6, p. 450-459, 2022.

REINPRECHT, Y.; SCHRAM, L.; MARSOLAIS, F.; SMITH, T. H.; HILL, B.; PAULS, K. P. Effects of Nitrogen Application on Nitrogen Fixation in Common Bean Production. **Frontiers In Plant Science**, v. 11, p. 1-19, 2020.

TRINDADE, R. D. S.; RODRIGUES, R.; JÚNIOR, A. T. D. A.; GONÇALVES, L. S. A.; VIANA, J. M. S.; SUDRÉ, C. P. Capacidade de combinação para resistência ao cretamento bacteriano em feijão comum e feijão-de-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 37, p. 37-43, 2015.

VIEIRA, G.; KHALIL, Z. G.; CAPON, R. J.; SETTE, L. D.; FERREIRA, H.; SASS, D. C. Isolation and agricultural potential of penicillic acid against citrus canker. **Journal Of Applied Microbiology**, v. 132, n. 4, p. 3081-3088, 2022.

VIEIRA, G.; PURIĆ, J.; MORÃO, L. G.; DOS SANTOS, J. A.; INFORSATO, F. J.; SETTE, L. D.; FERREIRA, H.; SASS, D. C. Terrestrial and marine Antarctic fungi extracts active against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Letters in applied microbiology**, v. 67, n. 1, p. 64-71, 2018.

VITIS, M.; HAY, F. R.; DICKIE, J. B.; TRIVEDI, C.; CHOI, J.; FIEGENER, R. Seed storage: maintaining seed viability and vigor for restoration use. **Restoration Ecology**, v. 28, p. 1-7, 2020.

SAMSON, R.A.; HADLOK, R.; STOLK, A.C. A taxonomic study of the *Penicillium chrysogenum* series. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 43, p. 169–175, 1977.

SARTORATO, A. sensibilidade "*in vitro*" de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* a fungicidas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 36, n. 3, p. 211-213, 2006.

SHARMA, K. K.; SINGH, U. S.; SHARMA, P.; KUMAR, A.; SHARMA, L. Seed treatments for sustainable agriculture: A review. **Journal of Applied and Natural Science**, v. 7, n. 1, p. 521-539, 2015.

SHEN, N.; LIANG, Z.; LIU, Q.; TU, C.; DONG, K.; WANG, C.; CHEN, M. Antifungal Secondary Metabolites Isolated from Mangrove Rhizosphere Soil-Derived *Penicillium* Fungi. **Journal Of Ocean University Of China**, v. 19, n. 3, p. 717-721, 2020.

SHORT, D. P. G.; SANDOYA, G.; VALLAD, G. E.; KOIKE, S. T.; XIAO, C. L.; WU, B. M.; GURUNG, S.; HAYES, R. J.; SUBBARAO, K. V. Dynamics of *Verticillium* species microsclerotia in field soils in response to fumigation, cropping patterns, and flooding. **Phytopathology**, v. 105, n. 5, p. 638-645, 2015.

SIEBER, T. N. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? **Fungal biology reviews**, v. 21, n. 2-3, p. 75-89, 2007.

SILVA, F. M. R. **Prospecção de Produtos Naturais de Fungos Endofíticos de *Bromelia balansae* Mez.** 2023. 202 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2023.

SILVA, F. M. R.; PAGGI, G. M.; BRUST, F. R.; MACEDO, A. J.; SILVA, D. B. Metabolomic Strategies to Improve Chemical Information from OSMAC Studies of Endophytic Fungi. **Metabolites**, v. 13, p. 236, 2023

SINGH, B. P. (Ed.). **Advances in endophytic fungal research: present status and future challenges**. Springer, 2019.

SIP, I.; YABUS, T.; SCHUFLER, A.; SAINS, E.; ANKER, H.; OPATZ, T.; SANDEJO, L. P. **Antifungal *Penicillium* Strain, Its Fungicidal Extrolite, and Its Uses**. Titular: Basf Se. CN n. CN105899668B. Depósito: 10 nov. 2014. Concessão: 20 mar. 2020.

SOUZA, A. Q. L. D.; SOUZA, A. D. L. D.; ASTOLFI FILHO, S.; PINHEIRO, M. L. B.; SARQUIS, M. I. D. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos

isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta amazônica**, v. 34, p. 185-195, 2004.

SUZUKI, S.; KIMURA, T.; SAITO, F.; ANDO, K. Antitumor and antiviral properties of penicillic acid. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 35, n. 2, p. 287-290, 1971.

SZCZECZ, M.; NAWROCKA, J.; FELCZYNSKI, K.; MAJOLEPSZA, U.; SOBOLEWSKI, J.; KOWALSKA, B.; MACIOROWSKI, R.; JAS, K.; KANCELISTA, A. *Trichoderma atroviride* TRS25 isolate reduces downy mildew and induces systemic defence responses in cucumber in field conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 224, p. 17-26, 2017.

TAYLOR, A.G.; HARMAN, G.E. Concepts and technologies of selected seed treatments. **Annual Review of Phytopathology**, v. 28, n. 1, p. 321–339, 1990.

TRINDADE, R. D. S.; RODRIGUES, R.; JÚNIOR, A. T. D. A.; GONÇALVES, L. S. A.; VIANA, J. M. S.; SUDRÉ, C. P. Capacidade de combinação para resistência ao cretamento bacteriano em feijão comum e feijão-de-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 37, p. 37-43, 2015.

WANG, C.; TANG, S.; CAO, S. Antimicrobial compounds from marine fungi. **Phytochemistry Reviews**, v. 20, n. 1, p. 85-117, 2020.

WENDLAND, A.; LOBO JUNIOR, M.; FARIA, J. C. **Manual de identificação das principais doenças do feijoeiro comum**. Brasília: Embrapa, 2018.

WERE, E.; VILJOEN, A.; RASCHE, F. Back to the rootsbunderstanding banana below: ground interactions is crucial for effective management of *Fusarium* wilt. **Plant Pathology**, v. 72, n. 1, p. 19-38, 2022.

WRATHER, J. A.; SHANNON, J. G.; CARTER, T. E.; BOND, J. P.; RUPE, J. C.; ALMEIDA, A. M. R. Reaction of drought-tolerant soybean genotypes to *Macrophomina phaseolina*. **Plant health progress**, v. 9, n. 1, p. 16, 2008.

ZHAO, T.; XU, L.; ZHANG, Y.; LIN, Z.; XIA, T.; YANG, D.; CHEN, Y.; YANG, X. Three new α -pyrone derivatives from the plant endophytic fungus *Penicillium ochrochloronthe* and their antibacterial, antifungal, and cytotoxic activities. **Journal Of Asian Natural Products Research**, [S.L.], v. 21, n. 9, p. 851-858, 2018.