

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**BIOATIVIDADE DO EXTRATO DO ENDÓFITO *Diaporthe infecunda* LGMF694  
PARA CONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum* e *Colletotrichum truncatum***

BRENDA TORTELLI

Passo Fundo

2022

BRENDA TORTELLI

BIOATIVIDADE DO EXTRATO DO ENDÓFITO *Diaporthe infecunda* LGMF694  
PARA CONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum* e *Colletotrichum truncatum*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia de Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientadora:

Profª. Dra. Carolina Cardoso Deuner

Coorientadora:

Profª. Dra. Fabiana Tonial

Passo Fundo  
2022

CIP – Catalogação na Publicação

---

- T699b Tortelli, Brenda  
Bioatividade do extrato do endófito *Diaporthe infecunda* LGMF694 para controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Colletotrichum truncatum* / Brenda Tortelli. – 2022.  
71 f. : il. ; 30 cm.
- Orientadora: Profa. Dra. Carolina Cardoso Deuner.  
Coorientadora: Profa. Dra. Fabiana Tonial.  
Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, 2022.
1. Fitopatologia. 2. Pragas agrícolas - Controle. 3. Fungos fitopatogênicos. 4. Aroeira. I. Deuner, Carolina Cardoso, orientadora. II. Tonial, Fabiana, coorientadora. III. Título.

CDU: 581.2

---

Catalogação: Bibliotecário Luís Diego Dias de S. da Silva – CRB 10/2241

# ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO



A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação.

**“BIOATIVIDADE DO EXTRATO DO ENDOFÍTICO *Diaporthe infecunda* LGMF694 PARA CONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum* e *Colletotrichum truncatum*.”**

Elaborada por

**Brenda Tortelli**

Como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestra em  
Agronomia – Produção e Proteção de Plantas

Aprovada em: 27/04/2022  
Pela Comissão Examinadora

**Dra. Carolina Cardoso Deuner**  
Presidente da Comissão Examinadora  
Orientadora - UPF

**Dra. Paola Mendes Milanesi**  
Examinador externo  
UFFS

**Dra. Fabiana Tonial**  
Coorientadora  
Examinador interno  
UPF

**Dra. Nadia Canali Lângaro**  
Coordenadora do PPGAgro  
UPF

**Dra. Jaqueline Huzar Novakowski**  
Examinador interno  
UPF

**Dr. Eraldo Lourenso Zanella**  
Diretor da Faculdade de Agronomia e  
Medicina Veterinária – FAMV/UPF

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradecer a Deus.

À minha família pelo incondicional apoio e incentivo, por nunca medirem esforços para que eu pudesse me dedicar aos meus sonhos.

À Prof. Fabiana Tonial e Carolina Deuner, por terem aceitado me orientar.

À Prof. Jaqueline Novakowski, por toda ajuda na parte estatística e escrita do trabalho, por ter aceitado me ajudar e não medir esforços para isso.

À Prof. Paola Milanesi, que desde a graduação é minha grande aliada e amiga. Mesmo longe sempre esteve tão perto me ajudando e orientando nessa jornada.

À minha amiga e companheira Suelen, que me auxiliou incansavelmente no desenvolvimento deste trabalho.

À minha colega, amiga, e parceira de pesquisa Francine, que junto comigo persistiu nesse trabalho.

Aos professores do PPGAgro da UPF por todos ensinamentos, por não medirem esforços para repassar seus conhecimentos mesmo em aulas online durante a pandemia.

E a todos queridos amigos que de alguma forma me incentivaram ou me escutaram em algum momento de fraqueza.

Meu muito obrigada a todos!

*“Ter sucesso é falhar repetidamente, mas sem perder o entusiasmo”*

Winston Churchill

## RESUMO

*Colletotrichum truncatum* e *Sclerotinia sclerotiorum* são patógenos fúngicos que podem ser disseminados por sementes de soja, e geralmente são controlados por tratamento de sementes com fungicidas. No entanto, devido ao aumento de isolados resistentes aos fungicidas e aos efeitos nocivos dos agrotóxicos ao meio ambiente e à saúde humana, a busca por métodos alternativos de controle de patógenos transmitidos por sementes se faz necessária. Assim, este estudo avaliou se o extrato de um isolado de *Diaporthe infecunda* LGMF694, um endófito das folhas de *Schinus terebinthifolius*, inibe o crescimento de *C. truncatum* e *S. sclerotiorum*, e melhora a qualidade sanitária das sementes de soja quando inoculada artificialmente com estes agentes etiológicos. Para isso, foram realizados testes *in vitro* de difusão em ágar e concentração inibitória mínima para evidenciar a bioatividade do extrato *in vitro*. Posteriormente, para avaliação de atividade em sementes foram feitos testes de germinação, teste de frio, teste de envelhecimento acelerado e verificou-se a incidência dos patógenos em sementes inoculadas por meio da restrição hídrica. Com as mesmas sementes, foi realizado o teste de germinação em areia e em seguida foi medido o comprimento de plântula, massa fresca e massa seca. Pode-se constatar que o extrato de *Diaporthe infecunda* inibiu o crescimento *in vitro* de *C. truncatum* em 94,4% e 83,8 % de *S. sclerotiorum* *in vitro*. Diminui também a incidência dos patógenos nas sementes, no entanto, diminui o poder germinativo. O extrato de *Diaporthe infecunda* LGMF694 controla os patógenos, porém, diminui o poder germinativo das sementes. Portanto, novas formulações produzidas a partir do extrato ou métodos de aplicação devem ser ensaiados com o objetivo de minimizar o efeito observado nesse estudo.

Palavras-chave: 1. Antracnose. 2. Bioprospecção. 3. Endófito. 4. Extrato fúngico. 5. Mofo-branco.

## ABSTRACT

*Colletotrichum truncatum* and *Sclerotinia sclerotiorum* are fungal pathogens that can be spread by soybean seeds, usually controlled by seed treatment with fungicides. However, due to the increase in fungicide-resistant isolates and the harmful effects of pesticides on the environment and human health, the search for alternative methods of controlling common pathogens by seeds is underway. Thus, this study evaluated whether the extract of *Diaporthe infecunda*, an endophyte from the leaves of *Schinus terebinthifolius*, inhibits the growth of *C. truncatum* and *S. sclerotiorum*, and improves the sanitary quality of soybean seeds when artificially inoculated with these etiological agents. For this, the in vitro diffusion tests in a isolate were perfected and, later, the germination tests were carried out, tests of minimum maturation and concentrates, colder propagation in seeds, concentrates, more innocuous through water propagation in restricted seeds. With the same seeds, the germination test was carried out in sand and then the fresh length of the plant was measured, mass and dry mass. It can be seen that the extractor of *Diaporthe infecunda* inhibited the in vitro growth of *C. truncatum* in 94.4% and 83.8% of *S. sclerotiorum* in vitro. It also decreases the disease of pathogens in the seeds, however, it decreases the germinative power. The *Diaporthe infecunda* extract LGMF694 controls the pathogens, however, it reduces the germinative power of the seeds. Therefore, formulations from new application methods must be applied with the objective of minimizing the effect observed in this study.

**Keywords:** 1. Anthracnose. 2. Bioprospection. 3. Endophyte. 4. Fungal extract. 5. White mold.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>13</b>
2.1 Cultura da soja .....	13
2.2 <i>Colletotrichum truncatum</i> .....	13
2.3 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	15
2.4 Endófitos.....	17
2.5 O gênero de fungos <i>Diaporthe</i> como endofíticos.....	20
2.6 Bioprospeção .....	21
2.7 Utilização de extratos para controle de patógenos em sementes.....	22
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
3.1 Local e período .....	24
3.2 Fungo endofítico <i>Diaporthe infecunda</i> LGMF694 .....	24
3.3 Procedimentos experimentais .....	24
3.3.1 Produção do inóculo dos fitopatógeno .....	24
3.3.2 Obtenção dos extratos de <i>Diaporthe infecunda</i> LGMF694 .....	25
3.5 Avaliação da bioatividade do extrato de <i>D. infecunda in vitro</i> .....	26
3.5.1 Teste de difusão em ágar .....	26
3.5.2. Determinação da CE <sub>50</sub> pelo crescimento micelial .....	27
3.5.3. Participação do extrato e bioatividade <i>in vitro</i> .....	28
3.6 Testes em sementes de soja inoculadas .....	29
3.6.1 Inoculação das sementes de soja com os patógenos.....	29
3.6.2 Ajuste de metodologia para tempo de exposição das sementes aos patógenos e tempo de contato com o extrato.....	30
3.6.3 Tratamento de sementes inoculadas com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Colletotrichum truncatum</i> .....	30
3.6.4 Teste de germinação de sementes de soja .....	30
3.6.5 Frio sem solo .....	31
3.6.7 Envelhecimento acelerado .....	31
3.6.4 Incidência dos patógenos.....	31
3.7 Teste de emergência em areia.....	32
3.7.1 Comprimento de plântulas de soja .....	32
3.7.2 Massa fresca e massa seca .....	32
3.8 Análise estatística .....	32

<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>
4.1 Avaliação da atividade do extrato <i>in vitro</i> .....	33
4.3 Determinação da CE <sub>50</sub> pelo crescimento micelial .....	35
4.2 Teste de difusão em ágar após a seleção do extrato e do controle positivo .....	39
4.4 Bioatividade das porções do extrato <i>in vitro</i> .....	43
4.5 Ajuste de metodologia para tempo de exposição das sementes aos patógenos.....	44
4.6 Tratamento de sementes inoculadas com os patógenos.....	49
<b>5 – CONCLUSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>55</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de soja, no entanto, a cultura é afetada por diversas doenças, dentre elas o mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) e a antracnose (*Colletotrichum truncatum*), as quais podem causar danos em lavouras com alta severidade. Como agravante o patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* também é propagado em solos contaminados por apresentar eficientes estruturas de sobrevivência chamadas de escleródios, que mantêm o microrganismo no ambiente por longos períodos, fazendo com que a população do patógeno aumente a cada safra.

Por se tratar de doenças que podem ser disseminadas a partir de sementes, o tratamento químico de sementes é uma ferramenta importante, pois muitos dos fungicidas controlam de maneira eficiente diversos patógenos presentes nas mesmas e no solo. Quando esse é realizado de maneira efetiva, proporciona um adequado estande inicial da cultura, no entanto, com a ausência desse tratamento pode ocorrer um decréscimo na emergência de plântulas, comprometendo o estande de plantas e a produção final.

Em contraponto, o uso excessivo de agrotóxicos pode ter efeito nocivo, tanto para o meio ambiente quanto para a saúde humana, além de o uso indiscriminado desses produtos, ser responsável pelo surgimento de isolados resistentes aos fungicidas. Ainda, nem sempre a utilização de medidas baseadas no controle químico é eficaz, além de aumentar o custo de produção.

Com isso, surge a necessidade da busca por novos compostos que controlem patógenos de maneira mais sustentável. A utilização de microrganismos benéficos, como os endofíticos, é uma importante estratégia para o controle de agentes fitopatogênicos, pois demonstram potencial de inibir microrganismos através de interações antagônicas, tais como antibiose, competição, parasitismo ou produção de metabólitos secundários. O resultado dessas interações tem papel importante como controle alternativo de doenças de plantas. Além disso, os diferentes mecanismos de controle induzidos pelos fungos endofíticos ou por compostos bioativos gerados, são uma forma de pesquisa atrativa em virtude do seu potencial de aplicação biotecnológica e também pela crescente preferência do consumidor por alimentos produzidos de forma mais sustentável, utilizando formas alternativas de controle, substituindo produtos químicos.

Sendo assim, buscou-se com esta pesquisa *i*) verificar se extratos e compostos de *Diaporthe infecunda* LGMF694, endófito oriundo de folhas de aroeira (*Schinus terebenthifolius*) reduzem o crescimento micelial de *Colletotrichum truncatum* e *Sclerotinia sclerotiorum in vitro* e *ii*) Ainda, avaliar se o extrato é capaz de controlar o desenvolvimento dos patógenos após a aplicação deles em sementes inoculadas artificialmente com os agentes patogênicos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Essa revisão aborda a importância da cultura da soja, aspectos gerais sobre os patógenos *Colletotrichum truncatum* e *Sclerotinia sclerotiorum* sobre os endófitos, o uso de fungos endofíticos do gênero *Diaporthe* como controle biológico e a bioprospecção direcionada para o manejo de doenças.

### 2.1 Cultura da soja

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é cultivada em todo o mundo, é a oleaginosa de maior importância econômica e alimentícia, sendo uma das maiores *commodities* agrícolas. O Brasil produziu 252 milhões de toneladas de grãos na safra 2020/21 e desse valor 136 milhões de toneladas foram de soja sendo cultivada em 38 milhões de hectares com produtividade média de 3.527 kg.ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2021).

Com o aumento do potencial produtivo da cultura da soja e seu cultivo em locais diversos e diferentes ambientes, as doenças assumiram relevante importância dentre os fatores que podem diminuir a produtividade desta oleaginosa, requisitando maior atenção na adoção de medidas de controle.

A qualidade da semente de soja pode ser afetada por vários fatores, incluindo patógenos (HARTMAN et al., 2011). Os fungos são considerados os principais agentes patogênicos, pois possuem grande capacidade de penetração nos tecidos vegetais (MANCINI; MUROLO; ROMANAZZI, 2016). Assim, a semente torna-se um meio eficiente de sobrevivência e disseminação de patógenos para novas áreas (HENNING et al., 2004). Entre os patógenos que podem causar doenças na soja e serem disseminados por sementes estão *Colletotrichum truncatum* (Schwein.) Andrus & WD Moore (ALLEN et al., 2017), e *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (WILLBUR et al., 2019).

### 2.2 *Colletotrichum truncatum*

Assim como a *Sclerotinia sclerotiorum*, o *Colletotrichum truncatum*, agente causal da antracnose também pode ser disseminado por sementes (MOTA et al., 2019). O fungo pode infectar as sementes, tornando-as o principal veículo de disseminação e introdução do patógeno em novas áreas de cultivo, além de causar uma redução considerável da sua germinação (HENNING, 1994). Os patógenos podem estar

associados às sementes de diferentes maneiras, aderidos à sua superfície ou transportados nos tecidos internos, infectando as sementes. No caso de *Colletotrichum* spp., o fungo é transportado principalmente nos tecidos internos das sementes (MACHADO, 1998). O patógeno pode estar presente também nos restos culturais da safra anterior e se desenvolve no interior do tecido cortical da planta, podendo ou não se desenvolver em função das condições climáticas (HENNING; YORINI, 2005).

Além de ser a principal doença que afeta a fase inicial da formação de vagens, a antracnose pode causar a morte de plântulas, necrose dos pecíolos e manchas nas folhas, hastes e vagens (GODOY et al., 2016). Podem ser observadas a queda total das vagens ou a deterioração das sementes em colheita retardada. As vagens que são infectadas nos estádios reprodutivo 3 e reprodutivo 4 ficam com coloração castanho-escura a negra e retorcidas, já nas vagens em granação, as lesões iniciam por estrias de anasarca e evoluem para manchas negras (Figura 2). As sementes manifestam manchas deprimidas, de coloração castanho-escuras (HENNING; YORINORI, 2005). As plantas infectadas possuem o desenvolvimento acelerado e produtividade reduzida podendo formar grãos menores ou não formar grãos (YANG; HARTMAN, 2016), ainda, danos como retorcimento, abertura prematura e abortamento de vagens podem ser relacionados a doença (ROGÉRIO et al., 2017). Reduções de 90kg/ha foram atribuídas a cada 1% de aumento na incidência da doença (DIAS; PINHEIRO; CAFÉ-FILHO, 2016).

Figura 1 - Sintomas de antracnose (*Colletotrichum truncatum*) em soja. Sintomas em vagem (A). Abertura de vagem imatura apresentando sementes com manchas escuras no tegumento e sintomas de antracnose (B)



Fonte: Vieira, H. B. A, 2003

Não existem cultivares de soja comerciais com resistência que evite danos econômicos da antracnose (PESQUEIRA; BACCHI; GAVASSONI, 2016). Portanto, o controle químico é utilizado para controle da doença pois pode prevenir a infecção do hospedeiro ou paralisar a colonização estabelecida (REIS; REIS; CARMONA, 2010).

No entanto, um dos fatores limitantes no controle químico para essa doença é o desenvolvimento da resistência do fungo aos fungicidas. Já foram relatadas resistências a fungicidas dos grupos benzimidazol, estrobilurina e triazol (CHUNG et al., 2006; PERES et al., 2004; WONG; MIDLAND, 2007).

### **2.3 *Sclerotinia sclerotiorum***

O mofo-branco tem se destacado como uma das doenças mais importantes da soja, pois pode causar danos de 100% em lavouras com alta severidade (CADORE; TORNEM, 2015). O patógeno sobrevive no solo por meio de estruturas de resistência chamadas de escleródios e pode atacar mais de 400 espécies de plantas, entre elas soja, feijão, algodão e girassol (GORGEN et al., 2009). Esses escleródios têm papel fundamental no ciclo de vida do fungo, pois em condições favoráveis o escleródio germina e produz micélio, o qual penetra diretamente nos tecidos da planta (ABDULLAH, 2008).

O início da infecção de *S. sclerotiorum*, a partir das sementes pode ocorrer através dos escleródios presentes como contaminantes em lotes utilizados para semeadura ou por inóculo na forma de micélio no interior dos tecidos das sementes. A partir do micélio nas sementes o fungo pode desenvolver-se diretamente nos tecidos da planta e causar os danos característicos da doença. Em sementes infectadas na forma micelial pode ocorrer também a formação de escleródios junto às sementes e assim formar os apotécios e os ascósporos. Normalmente escleródios em mistura com as sementes ou previamente presentes nas áreas de cultivo apresentam este tipo de comportamento. Trabalhos mostram que sementes infectadas pelo patógeno, mortas em pré-emergência em campos de cultivo, são fontes para formação de novos escleródios que constituem focos secundários de infecção da doença no campo. Assim, seja a partir de escleródios ou de sementes o patógeno pode infectar o hospedeiro e iniciar o progresso espaço-temporal da doença, caracterizando a epidemia (JULIATTI et al., 2015).

Os escleródios podem então originar, sob condições favoráveis de alta umidade do solo e temperaturas amenas (ALDRICH-WOLFE et al., 2015), apotécios e ascósporos

que podem infectar a soja na fase de floração (ALMQUIST & WALLENHAMMAR, 2015). Com isso, as características do mofo-branco podem ser observadas inicialmente nas áreas cultivadas após a floração da soja. A doença avança com manchas ou lesões em folhas infectadas, caules, ramos e vagens, que ficam cobertos por um crescimento fúngico branco (Figura 1). A doença provoca morte das plantas, podendo progredir rapidamente dentro e entre as plantas (SCHWARTZ et al., 2012). O progresso da doença é favorecido em temperaturas de 20 a 24°C em plantas de soja submetidas a maiores períodos de molhamento foliar (JULIATTI et al., 2015).

Figura 2 - Sintomas de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja. Produção de micélio e escleródios na haste da planta (A), no interior da haste (B) e outras partes da planta (C)



Fonte: MEYER, M. C. Embrapa Soja, 2018

Lehner et al. (2016) realizaram uma meta-análise para avaliar a relação entre a incidência de mofo-branco e a produtividade de soja e entre a incidência e a produção de escleródios e concluíram que a cada 10% de aumento na incidência da doença ocorre uma redução da produtividade em torno de 172 kg.ha<sup>-1</sup> e produção de 1 kg de escleródios por hectare. A incidência de mofo-branco na cultura da soja aumentou consideravelmente a partir de 2008, sendo estimado que aproximadamente 23,7% da área de cultivo de soja no Brasil na safra 2012/2013 estavam infestados pelo patógeno (MEYER et al., 2014).

A solução mais econômica para o controle de doenças é a utilização de cultivares melhoradas, no entanto, não existem cultivares resistentes aos mofo-branco disponíveis no mercado, tornando-se necessário a utilização de diferentes práticas de controle, como a rotação de culturas, manejo químico e biológico, utilização de sementes saudáveis, dentre outras práticas culturais (BARBOSA et al., 2012).

O manejo químico com a utilização de agrotóxicos é o método mais utilizado no controle de doenças causadas por *S. sclerotiorum*, pois oferece flexibilidade e aumenta o controle preventivo das doenças na soja, além de ajudar também a reduzir sua intensidade (MUELLER et al., 2002). No entanto, o uso frequente de fungicidas para conter o mofo-branco tem proporcionado forte pressão de seleção sobre isolados sensíveis a determinados princípios ativos (JULIATTI et al., 2015).

## **2.4 Endófitos**

Fungos se associam as plantas utilizando diferentes estratégias de sobrevivência, eles podem ser mutualísticos, simbióticos ou parasitários. A maioria dessas relações não prejudica as plantas, mas em alguns casos, causam doenças e até morte (RAI; AGARKAR, 2016). Porém, muitas espécies desses fungos foram identificadas como endofíticas durante parte ou todo o ciclo de vida de diversas plantas (LEITE et al., 2013).

Estudos demonstram que existe uma importante interação simbiótica entre fungos endofíticos e seus hospedeiros. Essa interação envolve vantagens para ambos, uma vez que os fungos podem exercer funções que favorecem a adaptação da planta ao meio ambiente, tais como proteção contra doenças (HANADA et al., 2008; GAO et al., 2010) e promoção de crescimento vegetal (KHAN et al., 2012)

Saikkonen et al., (1998) definiram que endófitos são microrganismos que realizam pelo menos uma etapa do seu ciclo vital nos tecidos vegetais sem que causem sintomas visíveis. O hospedeiro pode ser colonizado pelos endófitos horizontalmente de forma natural por lesões, estômatos, ou crescimento de raízes, ou de forma artificial, como por injúrias causadas por práticas agrícolas que podem ocorrer durante os manejos na cultura, como cortes, lesões e amassamento (SAIKKONEN et al., 1998). A colonização vertical ocorre pelas sementes do hospedeiro, podendo se instalar em uma planta por toda sua vida (CHAPLHA et al., 2013).

Os fungos endofíticos encontram-se em diferentes órgãos e tecidos das plantas e se associam a folhas, ramos, caules e raízes (FELBER et al., 2016). Assim, eles já foram isolados a partir de diferentes órgãos de uma ampla diversidade de espécies vegetais, variando desde gramíneas (MÁRQUEZ et al., 2012) a espécies arbóreas (ARNOLD; LUTZONI, 2007), abrangendo plantas medicinais (MUSSI-DIAS et al., 2012), plantas tóxicas (CAFÊU et al., 2005) e culturas de interesse econômico como o milho (OROLE; ADEJUMO, 2011), a soja (LEITE et al., 2013), o trigo (LARRAN et al., 2007), o cacau (HANADA et al., 2010), o café (VEGA et al., 2010) e a cana-de-açúcar (LEME et al., 2013).

Os endófitos pertencem a gêneros e espécies de microrganismos diferentes, apresentam várias funções e formas complexas, podem estar agrupados em redes microbianas interconectadas que estão envolvidas na proteção contra estresse bióticos (HEIJDEN; HARTMANN, 2016) e na resistência a estresses abióticos (SCHULZ et al., 2002; SELOSSE et al., 2004). Pertencem principalmente aos filos Ascomycota e Basidiomycota (YU et al., 2010) e são subdivididos em quatro classes que variam de acordo com o hospedeiro colonizado, o modo de colonização, tipo de transmissão e função ecológica (RODRIGUEZ et al., 2009).

A classe 1 engloba fungos endofíticos *Clavicipitaceus*, que são específicos de gramíneas e conduzem a sua transmissão de forma vertical e horizontal. Para Faeth e Saari (2012), os fungos desta classe, produzem alcaloides com atividade inseticida. Já os fungos da classe 2 pertencem em sua maioria ao filo Ascomycota e alguns do filo Basidiomycota. Também realizam transmissão vertical e horizontal por meio de sementes e rizomas e podem colonizar diferentes órgãos e tecidos do seu hospedeiro. Além disso, os fungos da classe 2, podem conferir resistência à alguns tipos de estresse ambiental como alterações de pH, temperatura e salinidade. Os fungos agrupados na classe 3 apresentam transmissão apenas de forma horizontal que ocorre de maneira primária ou exclusiva nos tecidos acima do solo. São encontrados em árvores tropicais, coníferas e em espécies não vasculares. Os fungos representantes da classe 4 também possuem transmissão horizontal e são caracterizados pela coloração escura. Podem estar associados a raízes de plantas e possuem especificidade de hospedeiro (FERNANDES, 2015).

Os endófitos podem auxiliar seus hospedeiros de três maneiras principais: a) por antagonismo ou antibiose induzindo resistência na forma de elicitores que ativam defesas intrínsecas das plantas; b) por produzir substâncias nocivas aos patógenos; c) por exclusão

de outros organismos ao competir pelo nicho biológico (IASON; TAYLOR; HELFER, 2018). Essas propriedades fundamentam as principais abordagens do uso dos microrganismos endofíticos no controle alternativo de fitopatógenos, que são o uso de compostos secundários produzidos por esses microrganismos para controle de doenças e a inoculação direta do endófito no hospedeiro (O'HANLON et al., 2012).

A resistência induzida pela presença de endófitos geralmente é associada a síntese e/ou acúmulo de fitoalexinas. Quando o sistema de defesa é ativado por microrganismos não patogênicos como os endofíticos, essa resistência é denominada de sistêmica adquirida (SAR) e uma de suas vantagens é o efeito *priming*, em que o acúmulo de fatores de transcrição de proteína de sinalização nas células ficam inativos até um ataque (CONRATH et al., 2015). Essa modificação de defesa é consequência de interações moleculares que ocorrem durante o estabelecimento da simbiose entre planta e o endófito (BASTIAS et al., 2017). Além disso, pode ocorrer um aumento na expressão de proteínas relacionadas a patogênese como PR2, PR15 e PR16 (JI; GURURANI; CHUN, 2014), também na ativação de algumas enzimas como quitinase, peroxidase, glucanase, celulase (YEDIDA et al., 2000). Um exemplo da resistência induzida pelo hospedeiro por endófitos é o frequente isolamento de *Curtobacterium flaccumfaciens* em plantas sem sintomas de clorose variegada dos citros, sugerindo que este endófito tem um papel na resistência da planta (ARAUJO et al., 2002).

A produção de substâncias nocivas aos patógenos, podem ser através de reações bioquímicas que ocorrem na célula da planta hospedeira produzindo substâncias tóxicas aos patógenos ou criando condições adversas para o seu crescimento. Quando essas substâncias apresentam concentrações adequadas contribuem significativamente para a resistência, sendo relacionadas com mudanças na expressão de doenças (PIASECKA; JEDRZEKCKAY; BEDNAREK, 2015). Um dos grupos químicos produzidos pelos endófitos são os alcaloides (ALY et al., 2010).

No contato direto entre endófito e patógeno pode-se ter controle do microrganismo no local de contato entre ambos (ARNOLD et al., 2003), podendo ser por parasitismo direto, em que deformidade no patógeno podem ser observadas (VINAYARANI; PRASKASH, 2018). O controle pode ocorrer também por competição (RIBEIRO et al., 2018).

A competição e o parasitismo direto requerem contanto entre os microrganismos, o que faz com que esse mecanismo seja pouco frequente, pois eles têm pouco ou nenhum contanto direto (CARD et al., 2016).

Os fungos são os microrganismos mais frequentemente isolados como endofíticos (STROBEL; DAISY, 2003) e são considerados uma rica fonte de novos produtos naturais e produtos bioativos (KUSARI et al., 2012). Eles têm sido estudados em relação à capacidade de atuarem como agentes inibidores de outros micro-organismos, na perspectiva de aplicar esses fungos como agentes de biocontrole como uma alternativa ao controle químico, pois podem ser utilizados de forma direta, na qual são aplicados vivos e atuam como antagonista; ou indireta, por meio do emprego de seus metabólitos (MORANDI; BETTIOL, 2009).

## **2.5 O gênero de fungos *Diaporthe* como endofíticos**

O gênero *Diaporthe* pertence ao filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, classe Sordariomycetes, subclasse Diaporthomycetidae, ordem Diaporthales, família Diaporthaceae (MYCOBANCK, 2022). Nesse gênero podem ser encontrados fungos fitopatogênicos, endofíticos e saprofíticos, amplamente distribuídos em diversas plantas (GOMES et al, 2013).

Existem evidências de eficiência no uso de endófitos como agentes de biocontrole de patógenos de interesse agrícola, como por exemplo as espécies de *Diaphorte* (BOTELLA; DIEZ, 2011). Esse gênero foi reconhecido como produtor de vários novos compostos bioativos e é de grande interesse na biotecnologia (ZANG et al., 2012).

*Diaporthe* é o gênero fúngico mais frequentemente isolado como endófito e tem a produção de metabólitos com bioatividade amplamente estudada, servindo como fonte para exploração de novos metabólitos secundários que tenham potencial biotecnológico (SAVI; ALUIZIO; GLIENKE, 2019). Em um estudo realizado sobre a comunidade endofítica nos biomas do Pantanal e do Cerrado do Brasil, fungos do gênero *Diaporthe* foram os mais predominantes em ambos os biomas (NORILER et al., 2018).

Santos et al., (2016) relataram que cepas endofíticas de *Diaporthe terenbinthifolii* foram capazes de colonizar plantas cítricas e produzir metabólitos

secundários com atividade contra *Phyllosticta citricarpa*, o que sugere que essa espécie possa ser usada como um potencial controlador biológico, bem como, compostos isolados de *Diaporthe goulteri* que foram capazes de expressar atividade antifúngicas contra *Nectria* sp. e *Colletotrichum musae* (PENG et al., 2021).

Em outro estudo que objetivou inibir o crescimento de *Fusarium* foi reportada porcentagem de inibição de 30 % através de compostos orgânicos voláteis de *Diaporthe* (YAN et al., 2018). Ainda, o extrato do cultivo de *Diaporthe cf. heveae* LGMF1631 inibiu em 90 % o crescimento micelial de *Phyllosticta citricarpa* em 70 % de *Colletotrichum abscissum* (NORILER et al., 2018).

Na bioprospecção de compostos produzidos pelo metabolismo secundário de endófitos de aroeira foi identificado a presença de diaportina e ortosporina no cultivo de *Diaporthe terebinthifolii*, os quais já tem comprovada ação antimicrobiana contra patógenos (MEDEIROS et al., 2018). Em outro isolado do mesmo gênero, foi encontrado verbanol, álcool feniltílico, hexadecanoato de metilo e isoverbanol no extrato do fungo, o sinergismo entre esses compostos foi eficaz no controle do desenvolvimento do patógeno *Phyllosticta citricarpa* (TONIAL et al., 2017).

## **2.6 Bioprospecção**

A bioprospecção consiste na identificação, avaliação e exploração sistemática da diversidade existente em determinado local e tem como objetivo a busca de novos recursos para fim comercial, englobando principalmente estratégias de exploração da fração cultivável e da fração não-cultivável da biodiversidade microbiana (ALMEIDA et al., 2015). A partir do metabolismo secundário pode-se encontrar compostos com diferentes atividades, como inibidores enzimáticos, herbicidas, inseticidas, antimicrobianos, entre outros compostos de interesse agrícola e medicinal (DEMAIN, 2014). As plantas e os endófitos são importantes fontes para obter novas moléculas para controle de microrganismos patogênicos (SILVER, 2015). Assim, os microrganismos podem ser usados em biospropecção como alternativa para um dos maiores problemas da agricultura moderna, a resistência dos microrganismos patogênicos (STROBEL; DAISY, 2003), como exemplo tem-se as estrobilurinas, cujas substâncias com atividade fungicida foram primeiramente isolados do basidiomiceto *Strobilurus tenacellus* (ANKE et al., 1997) e na sequência passaram a ser produzidas de modo sintético para comercialização

e uso agrícola.

Os endófitos apresentam grande capacidade para bioprospecção, pois são capazes de fornecer alternativas para problemas de resistência e compostos químicos pelos microrganismos (STROBEL, DAISY, 2003). Eles biossintetizam metabólitos secundários, que, além de serem importantes para processos de colonização das plantas, podem ser tóxicos para insetos e patógenos (BASTIAS et al., 2017). Outra forma de prospectar endófitos como controle biológico é inoculando os microrganismos nas plantas suscetíveis a patógenos (SANTOS et al., 2016). Mas o principal foco das pesquisas que vem sendo desenvolvidas é a produção de compostos que inibem o desenvolvimento de patógenos.

## **2.7 Utilização de extratos para controle de patógenos em sementes**

As sementes de soja são sensíveis aos estresses ambientais, desde o início do seu desenvolvimento até a época da semeadura, o que pode resultar em efeitos negativos na qualidade. Dentre os fatores que mais influenciam na perda de qualidade pode-se mencionar a associação de microrganismos as sementes. Os fungos são considerados os principais agentes patogênicos pois tem maior habilidade de penetrar nos tecidos vegetais. Desse modo as sementes tornam-se um meio eficiente de sobrevivência e disseminação de doenças para novas áreas (HENNING et al., 2004).

Com a necessidade de aplicação de estratégias alternativas na agricultura, diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos visando explorar as potencialidades dos extratos vegetais ou de fungos na agricultura (ARSHAD et al., 2019). Eles podem atuar como indutores de resistências em plantas, como bioestimulantes (COZZOLINO et al., 2020), nematicidas (MULLER et al., 2016) e fungicidas para o controle de organismos fitopatogênicos (MEENA et al., 2020) e uma das suas aplicações é no controle de patógenos ligados as sementes (MANGWENDENE et al., 2019).

O extrato de *Pycnoporus sanguineus* foi eficiente no controle de *Penicillium* sp., *Fusarium* spp., e *Colletotrichum dematium* em sementes de soja, sem interferir na sua germinação (COPPO et al., 2018). Baseggio et al. (2019), utilizando extratos vegetais de eucalipto, marcela, nim e losna, demonstram que todos eles possuem eficiência no

controle de patógenos em sementes de trigo, sem prejudicar a germinação e o desenvolvimento de plântulas.

Damascena et al. (2020), relatam que utilizando extrato de própolis houve redução da incidência dos fungos *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. *Cercospora* sp., *Phomopsis* sp., e *Rhizopus* sp. em sementes de arroz e soja. Já Souza et al. (2007), verificaram redução na taxa de germinação de esporos de *Fusarium proliferatum* com o uso de extratos de alho e campim-santo em sementes de milho.

Com isso, buscou-se verificar se o extrato de *Diaporthe infecunda* LGMF694 isolado de folhas de aroeira (*Schinus terebinthifolius*) é capaz de inibir o crescimento dos patógenos *S. sclerotiorum* e *C. truncatum* e controlá-los em sementes inoculadas, para que possa ser utilizado no manejo integrado de doenças visando diminuir o uso de agrotóxicos.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Local e período**

A pesquisa foi desenvolvida nos Laboratórios de Virologia e de Fitopatologia na Universidade de Passo Fundo (UPF), no município de Passo Fundo e no Laboratório de Fitopatologia na Universidade Federal da Fronteira Sul – *campus* Erechim, no período compreendido entre março de 2020 e fevereiro de 2022.

#### **3.2 Fungo endofítico *Diaporthe infecunda* LGMF694**

O fungo utilizado neste estudo foi o isolado de *Diaporthe infecunda* LGMF694 utilizado neste estudo foi obtido de folhas de aroeira (*Schinus terebinthifolius*) por Tonial et al. (2010) cuja exsicata encontra-se no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UFPR) sob registro UPCB-30848. Esse microrganismo está depositado na micoteca BIOGEMM – Bioprospecção e Genética Molecular de Microorganismo da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Foi realizado o sequenciamento multilocus das regiões ITS, CAL, HIS, TUB e TEF-1<sup>a</sup> do fungo endofítico *Diaporthe infecunda*. Estas, posteriormente foram depositadas no banco de dados *Genbank* sob o respectivo número de acesso MT124506, MT274577, MT274693, MT274715, MT276224 (NAVA, 2021).

#### **3.3 Procedimentos experimentais**

##### **3.3.1 Produção do inóculo dos fitopatógeno**

Os patógenos *S. sclerotiorum*, *C. truncatum* foram cedidos pelo Laboratório de Fitopatologia da UPF e obtidos a partir de plantas de soja e o *Fusarium meridionale* de trigo com sintomas das doenças. Os escleródios de *S. sclerotiorum* ou os fragmentos do tecido vegetal doente foram submetidos à assepsia com hipoclorito de sódio a 1% por 1 min e água destilada e esterilizada (três enxágues de 1 minuto cada). Após a secagem em papel toalha, os fragmentos foram transferidos para placas de Petri de 90 x 15 mm contendo meio de cultura com batata-dextrose-ágar (39 g L<sup>-1</sup> de BDA; com 0,2 g/L antibiótico estreptomicina). As placas foram incubadas a 23°C com fotoperíodo de 12 horas (PEREIRA et al., 2009). Após 7 dias de incubação, um disco de micélio das culturas

de *C. truncatum* e *F. meridionale* e escleródios de *S. sclerotiorum* foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA.

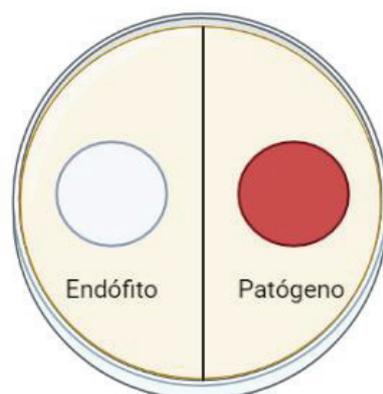
Posteriormente, culturas puras de *C. truncatum* e *F. meridionale* foram obtidas por isolamento de esporos únicos (culturas monospóricas). Uma suspensão de conídios do fungo cultivado foi preparada e, posteriormente, colocada em placas de Petri estéreis com meio de cultura ágar-ágar. As placas foram incubadas a 25°C com fotoperíodo de 12 horas por 24 horas. Os esporos germinados dos fungos foram selecionados individualmente e removidos com auxílio de uma agulha e transferidos para placas de Petri com meio BDA e posteriormente cultivados a 25°C com fotoperíodo de 12 horas. Os isolados foram mantidos em meio BDA em geladeira a 4°C. Culturas cultivadas por 3 dias foram utilizadas para inoculação de *S. sclerotiorum* e de 7 dias para *C. truncatum*. O patógeno *Fusarium meridionale* foi utilizado apenas para obtenção dos extratos.

### 3.3.2 Obtenção dos extratos de *Diaporthe infecunda* LGMF694

Inicialmente, o extrato foi produzido por meio de cultura pareada (extrato 1), em que o fungo endofítico *Diaporthe infecunda* LGMF694 e o fungo *Fusarium meridionale* foram confrontados em meio BDA por teste de cultura pareada durante três dias (Figura 3). Deste confronto foram coletadas porções distintas do meio, uma de cada fungo contendo o crescimento dos microrganismos e do ponto de intersecção entre eles, sem conter crescimento micelial dos fungos confrontados.

As frações de *Diaporthe* retiradas do confronto, foram maceradas em metanol (CH<sub>3</sub>OH). Os resíduos sólidos foram separados utilizando papel filtro e as porções líquidas foram coletadas e concentradas em evaporador rotativo a 45°C para obtenção dos extratos, que foram mantidos em estufas a 35°C até o solvente evaporar por completo. Os rendimentos foram quantificados com auxílio de uma balança de precisão e, posteriormente, os extratos foram ressuspensos em metanol: água (1:4) na concentração de 10 mg.mL<sup>-1</sup> para utilização nos ensaios *in vitro* e *in vivo*.

Figura 3 - Representação da cultura pareada entre endófito e patógeno em placa de Petri



Fonte: O autor, 2022

No entanto, afim de obter maiores quantidades de extrato e maiores percentuais de controle dos patógenos, foi necessário ajuste de metodologia para a produção. A partir disso, foi adotada a metodologia de co-cultivo em meio líquido (extrato 2). Inicialmente, *F. meridionale* e *Diaporthe infecunda* foram cultivados em meio batata-dextrose-ágar (39 g.L<sup>-1</sup> de PDA; Merk®) em placas de Petri de 90 x 15 mm por 10 dias em câmara de crescimento a 25°C com 12 horas de fotoperíodo. Quatro discos de micélio de 5 mm de diâmetro de cada fungo foram então adicionados a frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo meio líquido batata-dextrose (200 g.L<sup>-1</sup> de batata; 20 g.L<sup>-1</sup> de dextrose). Os frascos foram mantidos em Shaker a 120 rpm por 10 dias a 25°C e fotoperíodo de 12 horas.

Decorrido o período de cultivo, foi feita a filtração a vácuo para separação do micélio. O micélio foi extraído em metanol, com o dobro do volume e após extração foi realizada a concentração dos compostos produzidos em evaporador rotativo a 45°C. A quantificação foi realizada com auxílio de uma balança de precisão (0,001 g). Para os ensaios de bioatividade os extratos foram ressuspensos em metanol:água (1:4 v/v) para a concentração de 10 mg.mL<sup>-1</sup>.

### 3.5 Avaliação da bioatividade do extrato de *D. infecunda* *in vitro*

#### 3.5.1 Teste de difusão em ágar

O extrato de *Diaporthe infecunda* (100 µL) foi pipetado e espalhado uniformemente com auxílio de uma alça de Drigaslski na superfície do meio BDA em placas de Petri 90 x 15 mm. Após a absorção completa do extrato pelo meio, um disco

micelial de 5 mm de diâmetro de cada patógeno foi colocado no centro da placa. O crescimento micelial (mm) de cada colônia fúngica foi medido em eixos ortogonais a cada 24 horas até que a placa controle sem o extrato atingisse a borda da placa.

A porcentagem de inibição (PI) dos patógenos foi calculada com a seguinte equação, comparando o diâmetro da colônia na presença dos tratamentos em relação ao controle:

$$PI = \frac{(PC - PE)}{PC} * 100$$

onde: PC indica o crescimento do fitopatógenos na placa controle e PE é o crescimento do fitopatógeno na placa contendo o extrato (QUIROGA; SAMPIETRO; VATTUONE, 2001).

Foi determinado o extrato que apresenta maior percentual de controle de patógenos através do método de difusão em ágar. Ainda, foi realizado o teste de concentração efetiva (CE<sub>50</sub>) para verificar o fungicida ao qual os isolados apresentam maior sensibilidade. De posse destas informações foi realizado o teste de difusão em ágar em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, com os seguintes tratamentos: T1 = controle positivo (fungicida – tiofanato metílico + fluazinam, na dose 200mL/100kg de sementes); T2) extrato de *D. infecunda*; T3) solvente apenas (metanol:água v/v); T4) Testemunha (placa contendo apenas o inóculo do agente patogênico).

### 3.5.2. Determinação da CE<sub>50</sub> pelo crescimento micelial

Para verificar a sensibilidade dos isolados ao extrato de *D. infecunda* e a diferentes fungicidas, foi utilizado o método da concentração efetiva (CE<sub>50</sub>), utilizada para expressar o grau de toxicidade de uma substância, que representa a concentração de um composto onde 50% do seu efeito máximo é observado (OGA, 2008).

Para isso, discos de micélio (5 mm de diâmetro) foram retirados das colônias de *S. sclerotiorum* e *C. truncatum* e foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA suplementado com diferentes concentrações 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0 mg.mL<sup>-1</sup>

de extrato. O mesmo foi feito para os fungicidas carboxina + tiram ( $200 \text{ g.L}^{-1} + 200 \text{ g.L}^{-1}$ ), tiofanato-metílico + fluazinam ( $300 \text{ g.L}^{-1} + 52,5 \text{ g.L}^{-1}$ ) e metalaxil-M + tiabendazol + fludioxonil + tiametoxam ( $20 \text{ g.L}^{-1} + 150 \text{ g.L}^{-1} + 25 \text{ g.L}^{-1} + 350 \text{ g.L}^{-1}$ ) nas doses 0,05; 0,5; 1; 5; 10; 50 e  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Foram feitas cinco repetições por concentração para cada isolado e para cada princípio ativo testado. As placas foram incubadas em BOD regulada a  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas. Para a verificação do crescimento micelial dos isolados nas diferentes concentrações de extrato e fungicida, foram realizadas duas medidas em eixos ortogonais das colônias de cada tratamento, quando as placas testemunha atingiram as bordas das placas. Após, para cada concentração, de cada ingrediente ativo, a inibição do crescimento micelial (IC) de cada isolado foi calculado por  $IC = (C_t - C_x) / C_t \times 100$ , em que  $C_t$  é o crescimento micelial médio da testemunha (sem fungicida) e  $C_x$  é o crescimento micelial médio do isolado x. Os valores das doses foram transformados em  $\log_{10}$  e, a partir dos valores transformados foi ajustado a equação de regressão linear no ambiente RStudio 4.1.0 (R CORE TEAM, 2019).

### 3.5.3. Participação do extrato e bioatividade *in vitro*

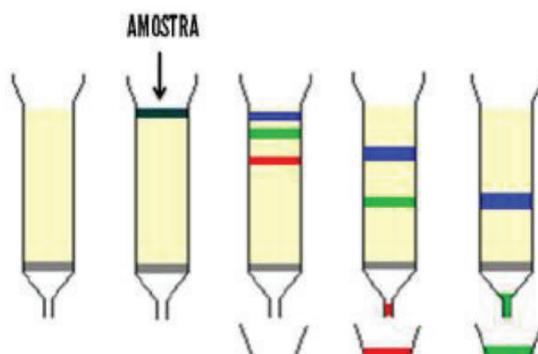
A cromatografia em coluna é uma técnica de separação e purificação. Para realizar a cromatografia foi utilizado uma coluna de 30 cm de altura contendo uma torneira na parte inferior. A coluna foi preenchida com sílica gel (granulometria de 70-230 mesh) como fase sólida estacionária. A fase móvel iniciou com 100 mL de éter de petróleo, seguido 100 mL diclorometano, 100 mL de acetato de etila e 500 mL de metanol, resultado em 13 frações.

As amostras do extrato foram misturadas com sílica e introduzidas no topo da coluna e deixada em movimento com o solvente (Figura 4). Com diferenças de polaridade, os compostos são adsorvidos em diferentes regiões e desorvidos com a polaridade do solvente adequada (SRIVASTAVA et al., 2021).

Após, 100  $\mu\text{L}$  de cada fração resultante da cromatografia, foi pipetada sobre a superfície do meio BDA em placas de Petri e espalhado uniformemente com auxílio da alça de Drigalski. Após absorção completa do tratamento pelo meio, um disco de micélio ( $\varnothing$  de 5 mm) de *S. sclerotiorum* e *C. truncatum* foi inoculada no centro da placa. O experimento foi realizado com quatro repetições para cada fração.

As placas foram incubadas em BOD regulada a  $25 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 12 horas. Para a verificação do crescimento micelial dos isolados nas diferentes frações testadas, foram realizadas duas medidas em eixos ortogonais das colônias de cada fração testada, quando as placas testemunha atingiram as bordas das placas.

Figura 4 - Diagrama de cromatografia em coluna



Fonte: Zubrick, J. W, 2016

### 3.6 Testes em sementes de soja inoculadas

#### 3.6.1 Inoculação das sementes de soja com os patógenos

A inoculação foi realizada por meio da técnica de restrição hídrica (CRUCIOL; COSTA, 2017). As sementes de soja cultivar 'DM 5958 IPRO', foram submetidas à assepsia visando eliminar fungos contaminantes que estejam aderidos à superfície das sementes. Para isso, as sementes foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar com hipoclorito de sódio a 1% (1 min) e, em seguida, enxaguadas com água destilada e esterilizada (1 min), deixando-as secar a temperatura ambiente por 24 horas (ORDOÑEZ, 2016). Em seguida, aproximadamente 50 sementes foram distribuídas e levemente prensadas formando uma camada única sobre crescimento micelial do fitopatógeno em meio BDA suplementado com o restritor hídrico manitol ( $C_6H_{14}O_6$ ) a fim de garantir um potencial hídrico de  $-0,6$  MPa (44,26 g de manitol por L de BDA) (REIS et al., 2014). As placas foram incubadas a  $25 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 12 horas, o tempo de incubação foi determinado para cada fitopatógeno por um ensaio piloto de inoculação. Na sequência as sementes foram removidas e deixadas para secar em temperatura ambiente cobertas com papel toalha esterilizado por 24 horas (ORDOÑEZ, 2016).

### **3.6.2 Ajuste de metodologia para tempo de exposição das sementes aos patógenos e tempo de contato com o extrato**

Para inoculação dos patógenos nas sementes de soja foi necessário realizar um ajuste metodológico para determinar os tempos de exposição das sementes ao patógeno e o tempo que essas sementes necessitam ficar em contato com o extrato para que se tenha o melhor controle. Assim, as sementes ficaram em contanto direto com os patógenos por 6, 12, 24, 36 e 48 horas mais testemunha sem contato. Após, as sementes eram retiradas e deixadas secar por 24 horas e, posteriormente, foram submersas no extrato por 0, 1, 6, 12, 24 e 48 horas. Após este período foi realizado o teste de germinação descrito nos itens 3.6.4, 3.6.5, 3.6.6, 3.6.7 e 3.7

### **3.6.3 Tratamento de sementes inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* e *Colletotrichum truncatum***

Após a inoculação dos patógenos, as sementes de soja foram submetidas aos seguintes tratamentos:

T1) Controle positivo (sementes expostas ao patógeno tratadas com fungicida sintético). Os fungicidas utilizados para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Colletotrichum truncatum* foram os que apresentaram o maior controle no teste da EC<sub>50</sub>;

T2) Extrato de *Diaporthe infecunda* LMF694

T3) Solvente do extrato (metanol)

T4) Tratamento com o extrato + fungicida;

T5) Testemunha positiva (sementes expostas ao patógeno, mas não tratadas);

T6) Testemunha negativa (sementes não expostas aos patógenos).

### **3.6.4 Teste de germinação de sementes de soja**

Foram utilizadas quatro repetições com 50 sementes de soja conforme adaptação das Regras para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009). As sementes foram colocadas em papel *germitest* umedecido com água destilada em 2,5 a 3 vezes o seu peso seco. Após a semente foram preparados rolos que foram dispostos em câmara de germinação a  $25 \pm 2$  °C, com fotoperíodo de 12 horas. As avaliações ocorreram por meio de contagens aos cinco e oito dias após semente (DAS). Foram contabilizadas todas as

sementes germinadas e que originaram plântulas normais.

### **3.6.5 Frio sem solo**

O vigor das sementes foi determinado por um teste de frio sem solo. Os rolos contendo sementes foram preparados conforme descrito no teste de germinação de sementes, porém, inicialmente permaneceram em incubadora a 10°C no escuro por três dias (GUISCHEM et al., 2010). Em seguida, os rolos foram colocados em outra incubadora a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  com fotoperíodo de 12 horas por quatro dias. O número de sementes germinadas que originaram plantas normais foi contado e os valores finais expressos em porcentagem (BRASIL, 2009).

### **3.6.7 Envelhecimento acelerado**

O teste de envelhecimento acelerado foi realizado com quatro amostras de 50 sementes cada. As sementes de soja foram distribuídas em telas de alumínio dentro de caixas plásticas de 11 x 11 x 3 cm contendo 40 mL de água destilada no fundo. As caixas foram mantidas em incubadora por 72 horas a  $42 \pm 2^\circ\text{C}$ . As sementes de soja foram então removidas e colocadas em papel germitest conforme descrito acima. Os rolos de papel foram colocados em uma incubadora a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  com fotoperíodo de 12 horas por quatro dias. O número de sementes germinadas que originaram plantas normais foi determinado e os valores finais foram expressos em porcentagem (BRASIL, 2009).

### **3.6.4 Incidência dos patógenos**

O teste de incidência de fitopatógenos foi realizado a partir de oito repetições de 25 sementes, conforme metodologia adaptada do Manual para Análise Sanitária de Sementes (BRASIL, 2009). Por meio do método de “blotter test” sem congelamento, as sementes foram distribuídas em caixas “gerbox” de 11 x 11 x 13 cm contendo duas folhas de papel mata-borrão. A fim de suprimir a germinação das sementes de soja e, por se tratar de uma dicotiledônea, o papel foi umedecido com solução de sal de 2,4-D ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). As sementes foram incubadas a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas, durante 7 dias. A presença do crescimento micelial e outras estruturas dos fitopatógenos foi determinada com auxílio de microscópio estereoscópico e óptico.

### **3.7 Teste de emergência em areia**

O teste de emergência de plântulas de soja em areia foi conduzido em copos de 500 mL com cinco repetições de 10 sementes. A areia utilizada foi passada em peneiras de 0,8 mm de malha a fim de eliminar partículas muito grandes e, posteriormente, foram esterilizadas em autoclave a uma atmosfera de 120°C durante 60 minutos. O substrato foi umedecido com água destilada até 60% de sua capacidade de retenção. As sementes inoculadas e tratadas foram colocadas entre areia, ou seja, inseridas sobre uma camada uniforme de areia umedecida e cobertas com areia solta, de forma a obter uma camada de aproximadamente 1 cm sobre as sementes. (BRASIL, 2009). O número de plantas emergidas foi contado aos 20 dias após a semeadura.

#### **3.7.1 Comprimento de plântulas de soja**

Ao final dos 20 dias de emergência em areia, foi efetuada a medição de cinco plântulas normais emergidas (raiz primária + hypocótilo) de cada repetição, escolhidas de forma aleatória utilizando uma régua graduada em centímetros.

#### **3.7.2 Massa fresca e massa seca**

Cinco plântulas de soja foram pesadas com balança de precisão (0,001 g) logo após retiradas da areia para determinação da massa fresca. As plântulas foram então mantidas em estufa a 60°C até atingirem peso constante para obtenção da massa seca.

### **3.8 Análise estatística**

A análise de variância foi realizada para todas as variáveis. A normalidade dos resíduos foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Se não houve violação da normalidade dos resíduos ( $p > 0,05$ ), a análise prosseguiu com comparações de médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Em caso de violação da normalidade dos resíduos, os dados foram analisados com o teste não paramétrico Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade. Todos os testes estatísticos foram realizados no RStudio versão 4.1.0 (R CORE TEAM, 2019).

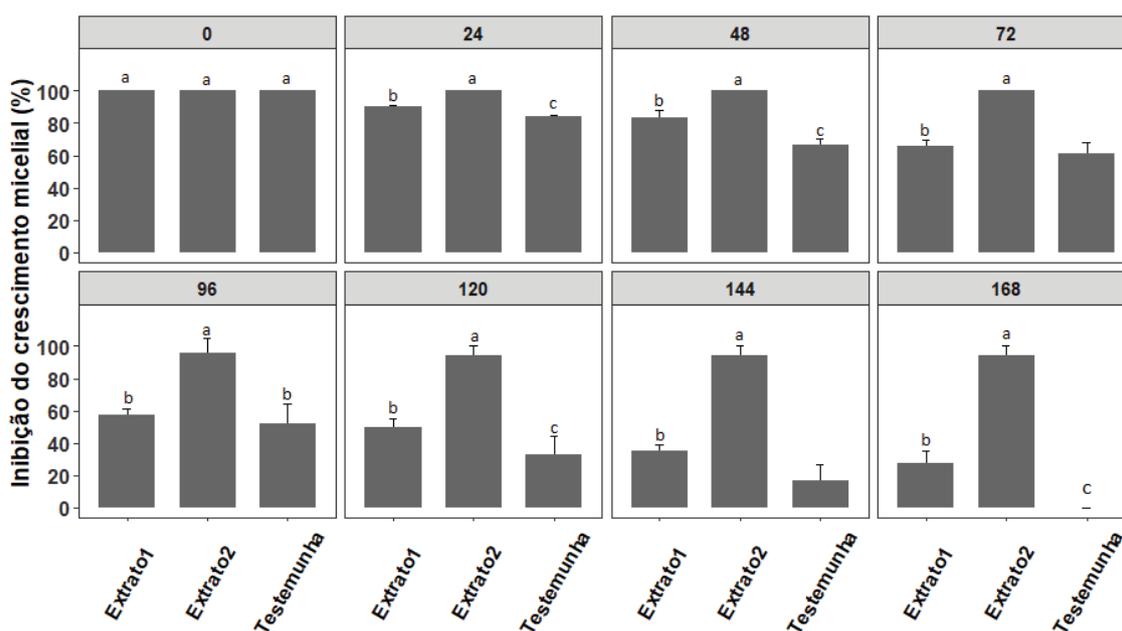
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação da atividade do extrato *in vitro*

#### 4.1.1 Teste de difusão em ágar para dos dois extratos *Diaporthe infecunda* LGMF694

Os dois extratos produzidos, foram avaliados através do teste de difusão em ágar. O extrato oriundo do fungo endofítico *Diaporthe infecunda* foi superior à testemunha em nas duas metodologias testadas, no entanto, o extrato 2 oriundo do co-cultivo de *Diaporthe infecunda* e *Fusarium meridionale* inibiu em 94,4% o crescimento de *C. truncatum* o que é significativamente maior ( $p < 0,05$ ), do que o obtido para o extrato 1 que teve 27,5%, de inibição após 168 horas de contato (Figura 5). O mesmo ocorreu para o patógeno *S. sclerotiorum* em que o extrato 2 inibiu o crescimento em 83,8% e o extrato 1 inibiu 56% quando comparados à testemunha, após 72 horas de contato (Figura 6). Tais resultados comprovam que o extrato 2 oriundo do co-cultivo entre endófito e patógeno apresenta os melhores resultados para inibição do crescimento micelial do *Colletotrichum truncatum* e da *Sclerotinia sclerotiorum*, o mesmo foi utilizado para os testes posteriores.

Figura 5 – Inibição (%) do crescimento micelial de *Colletotrichum truncatum* em contanto com diferentes extratos obtidos do fungo endofítico de aroeira *Diaporthe infecunda* LGMF694 em ensaio de difusão em ágar



Fonte: O autor, 2022.

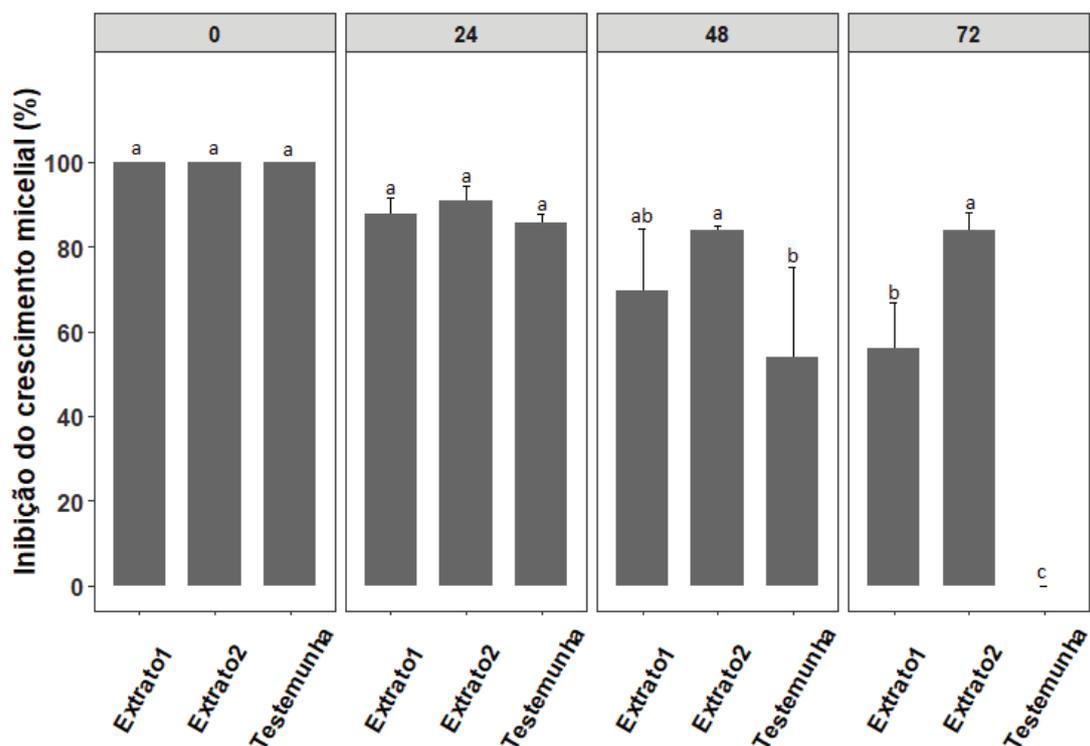
Legenda: Extrato 1: Confrontados em meio BDA por teste de cultura pareada.

Extrato 2: Co-cultivo em meio BD.

Testemunha: Nenhum tratamento.

Nota: Média  $\pm$  desvio padrão. Letras distintas sobre as colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )

Figura 6 – Inibição (%) do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* em contato com diferentes extratos obtidos do fungo endofítico de aroeira *Diaporthe infecunda* LGMF694 em ensaio de difusão em ágar



Fonte: O autor, 2022.

Legenda: Extrato 1: Confrontados em meio BDA por teste de cultura pareada.

Extrato 2: Co-cultivo em meio BD.

Testemunha: Nenhum tratamento.q58/

Nota: Média  $\pm$  desvio padrão. Letras distintas sobre as colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

Outros trabalhos desenvolvidos reforçam as evidências obtidas nesses resultados, de que os fungos endofíticos do gênero *Diaporthe* podem ser usados como fonte para bioprospecção de agentes para o controle de patógenos. Ribeiro et al. (2018) constataram inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. e *Fusarium oxysporum* por fungos endofíticos de *Diaporthe* sp. obtidos de camarão amarelo (*Pachytachys lutea*). Verificou-se também redução de germinação de esporos do fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa* sob extratos oriundos de *Diaporthe terebinthifolli* (TONIAL et al., 2017).

Além disso, vinte e quatro isolados de *Diaporthe* foram isolados e testados em cultura pareada com *Ascochyta rabiei*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* isolados de feijão e apresentaram inibição de 86,6%, 63,6%, e 55,9% respectivamente (MOSTACERO et al., 2021).

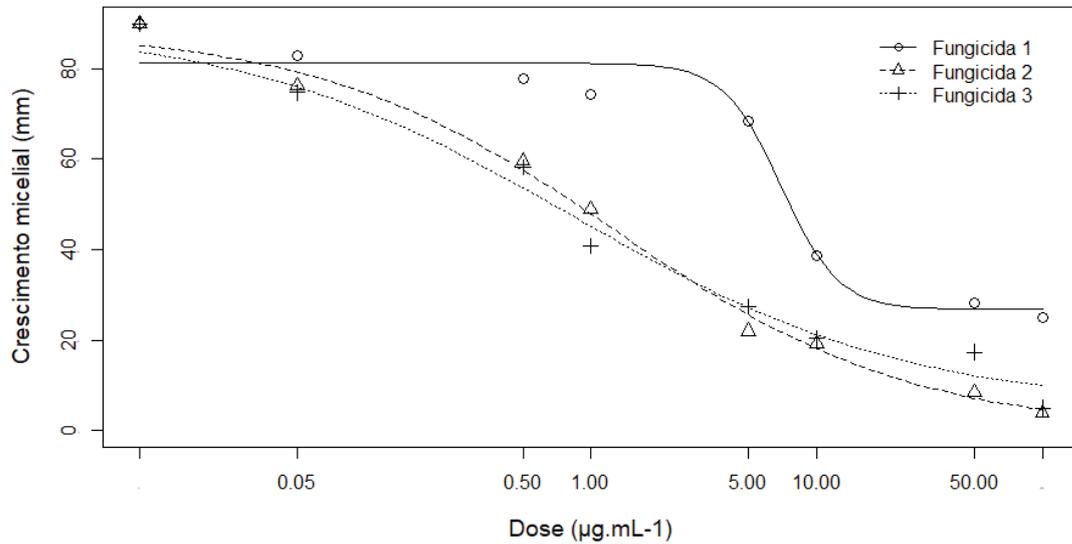
Estudos utilizando o *Diaporthe infecunda* LGMF694 demonstraram que o endófito inibiu em 38,2%, 50,0% e 15,8% o crescimento micelial dos fitopatógenos *Fusarium graminearum*, *Drechslera tritici-repentis* e *Phomopsis sojae* respectivamente (NAVA, 2020). O isolado *Diaporthe* LGMF694 inibiu o crescimento micelial em 50% de *F. graminearum* após 48 h de confronto, mantendo a capacidade de inibição em 38,2% após 96 horas (NAVA, 2020).

Os mecanismos específicos pelos quais as interações entre várias espécies induzem a produção de metabólitos secundários ainda não são bem definidos, o que se sabe, é que o cultivo misto representa uma estratégia promissora na indução da expressão do potencial metabólico total de cada microrganismo, resultando em aumento da diversidade química. Como no co-cultivo de *Aspergillus giganteus* com vários microrganismos, no qual a interação microbiana alterou a expressão do gene *afp*, responsável pela produção de uma proteína antifúngica (MEYER, STAHL, 2003).

#### **4.3 Determinação da CE<sub>50</sub> pelo crescimento micelial**

O patógeno *C. truncatum* (Figura 9) e *S. sclerotiorum* (Figura 10) apresentam maior sensibilidade ao fungicida tiofanato metílico + fluazinam (fungicida 2), com CE<sub>50</sub> de 0,83 e 0,091  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente. O fungicida 1 também apresentou resultados semelhantes entre os isolados, para *S. sclerotinia* a CE<sub>50</sub> foi de 5,70  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e para *C. truncatum* 6,96  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Já o fungicida 3 metalaxil-M + tiabendazol + fludioxonil + tiametoxam, obteve resultados maiores de CE<sub>50</sub> para *S. sclerotiorum* de 5,85  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e *C. truncatum* de 1,27  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Figuras 7 e 8).

Figura 7 – Sensibilidade do isolado de *Colletotrichum truncatum* a diferentes fungicidas, determinado através do teste de concentração efetiva que inibe 50% (CE<sub>50</sub>) do crescimento micelial



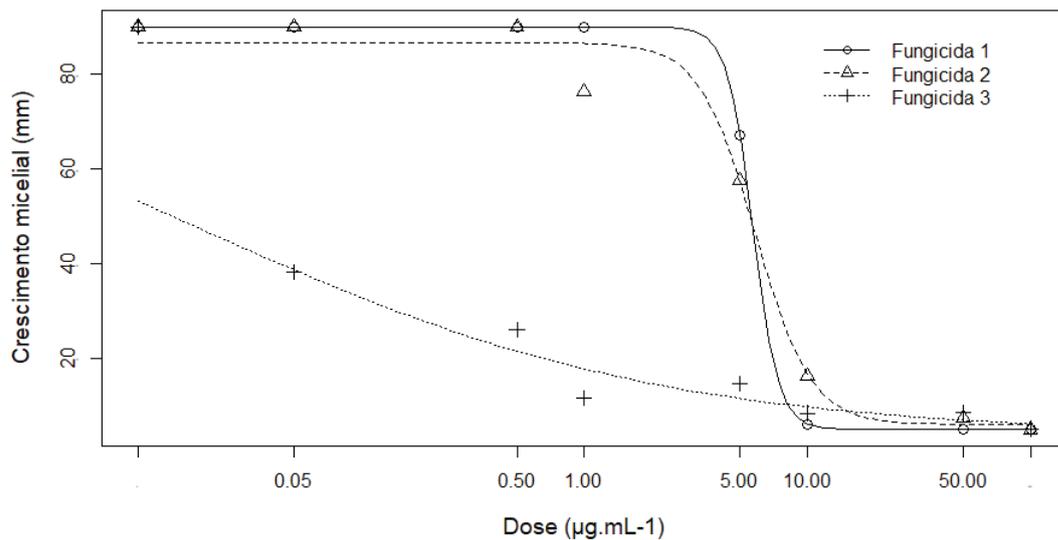
Fonte: O autor, 2022.

Legenda: Fungicida 1: carboxina + tiram.

Fungicida 2: tiofanato-metílico + fluazinam.

Fungicida 3: metalaxil – M + tiabendazol + fludioxonil + tiametoxam.

Figura 8 – Sensibilidade do isolado de *Sclerotinia sclerotiorum* a diferentes fungicidas, determinado através do teste de concentração efetiva (CE<sub>50</sub>)



Fonte: O autor, 2022.

Legenda: Fungicida 1: carboxina + tiram.

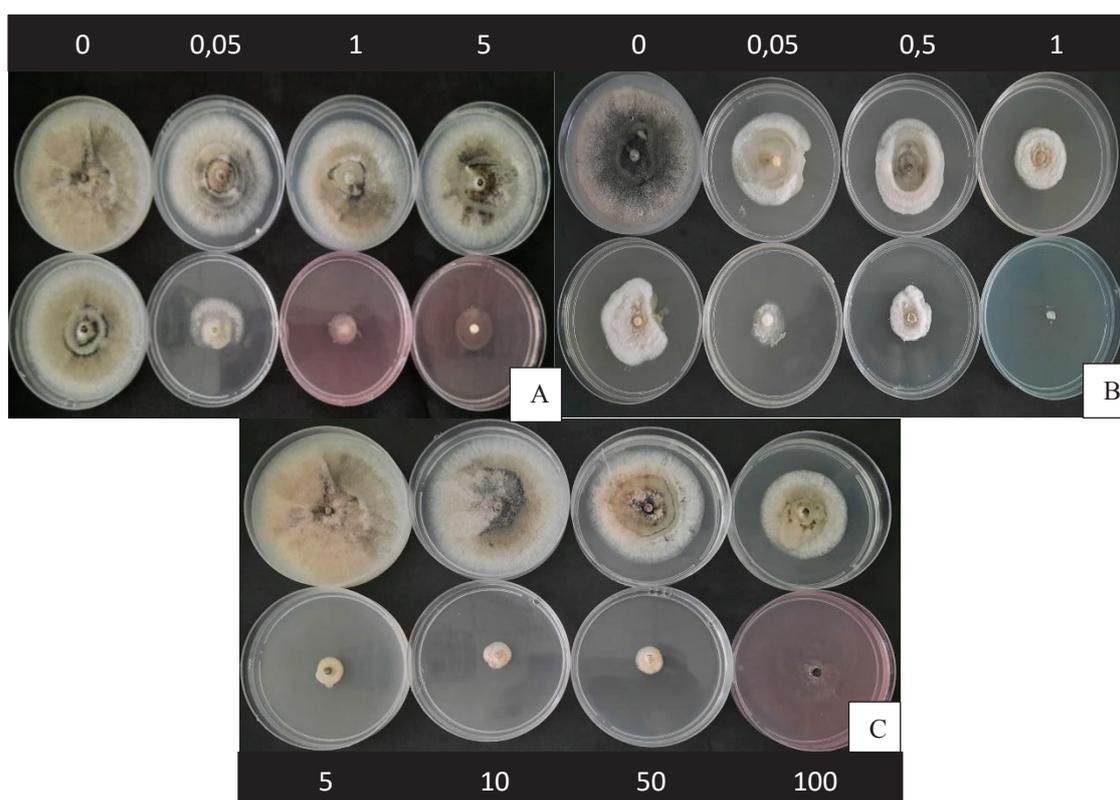
Fungicida 2: tiofanato-metílico + fluazinam.

Fungicida 3: metalaxil – M + tiabendazol + fludioxonil + tiametoxam,

Baseado na classificação proposta por Edgington e Klew (1971) de que o isolado é insensível se apresentar  $CE_{50}$  maior que  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , moderadamente sensíveis se a  $CE_{50}$  estiver entre 1 e  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e altamente sensíveis se a  $CE_{50}$  menor que  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , os patógenos foram considerados altamente sensíveis ao fungicida 2 e sensíveis aos fungicidas 1 e 3. Com isso, o fungicida 2 (tiofanato metílico + fluazinam) foi selecionado para ser o tratamento controle nos próximos testes.

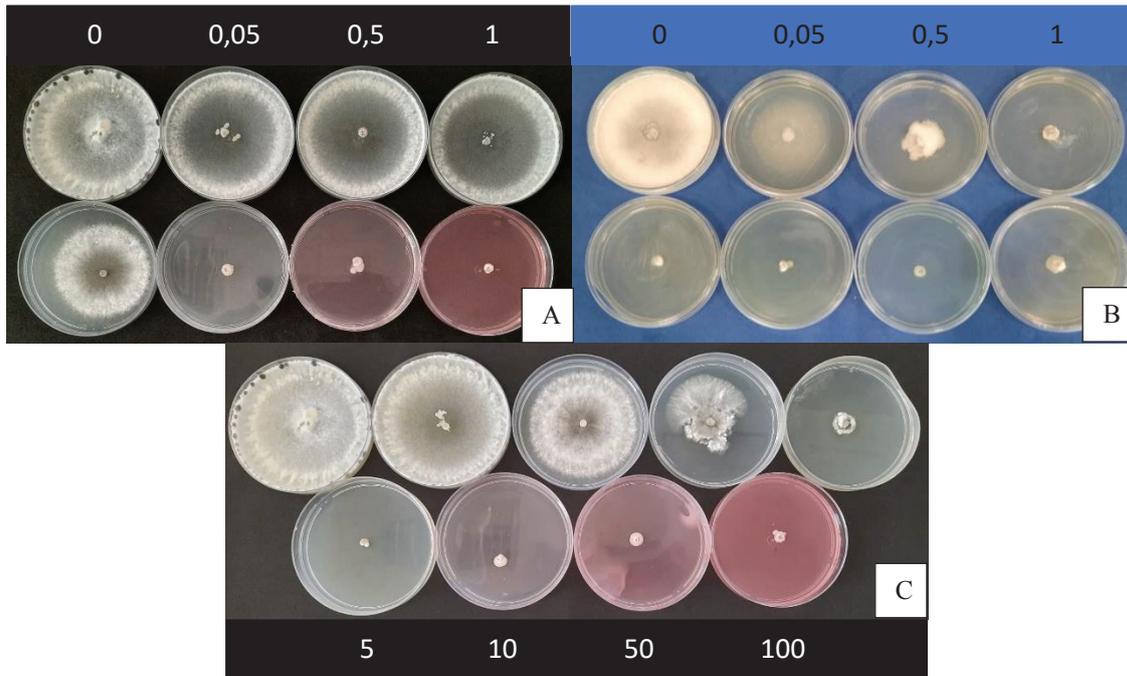
Os fungicidas testados são eficientes para o controle dos patógenos e um fator que pode contribuir para esse resultado, é que todos produtos testados são misturas e visto que não existe um único fungicida capaz de controlar todas as doenças da cultura, é necessário combinar diferentes substâncias químicas para melhorar o controle e reduzir o risco de resistência aos ingredientes ativos (RAMDIAL; ABREU; RAMPERSAD, 2017). Além disso, a sensibilidade do fungo é distinta dependendo da região, pois o ambiente e a forma de aplicação de fungicidas fazem com que o a resposta do fungo seja alterada (WEDGE et al., 2007)

Figura 9 – Inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum truncatum* expostos aos fungicidas carboxina + tiram (A), tiofanato-metílico + fluazinam (B), metalaxil-M + tiabendazol + fludioxonil + tiametoxam (C) nas concentrações 0,05; 0,5; 1; 5; 10; 50 e  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$



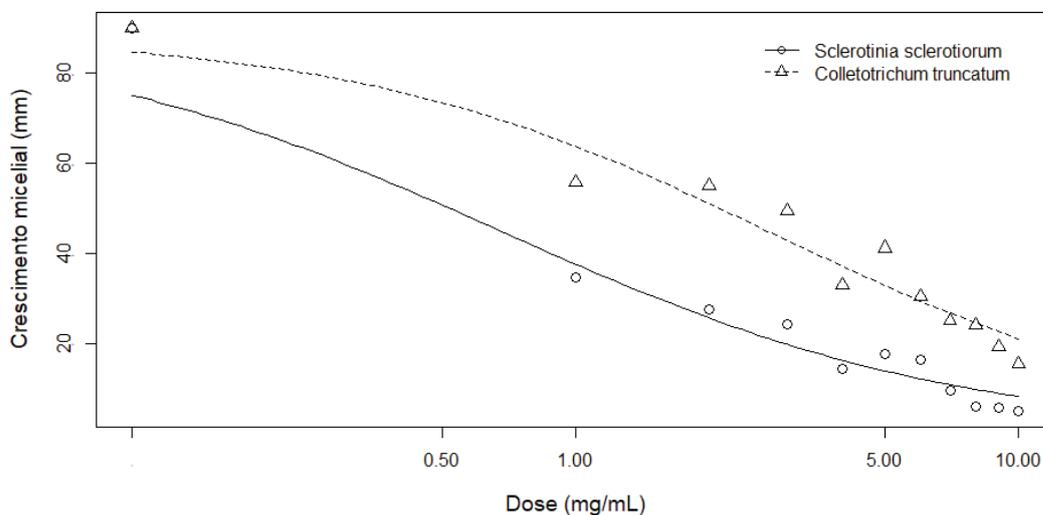
Fonte: O autor, 2022.

Figura 10 – Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* expostos aos fungicidas carboxina + tiram (A), tiofanato-metílico + fluazinam (B), metalaxil – M + tiabendazol + fludioxonil + tiametoxam (C) nas concentrações 0,05; 0,5; 1; 5; 10; 50 e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$



Fonte: O autor, 2022.

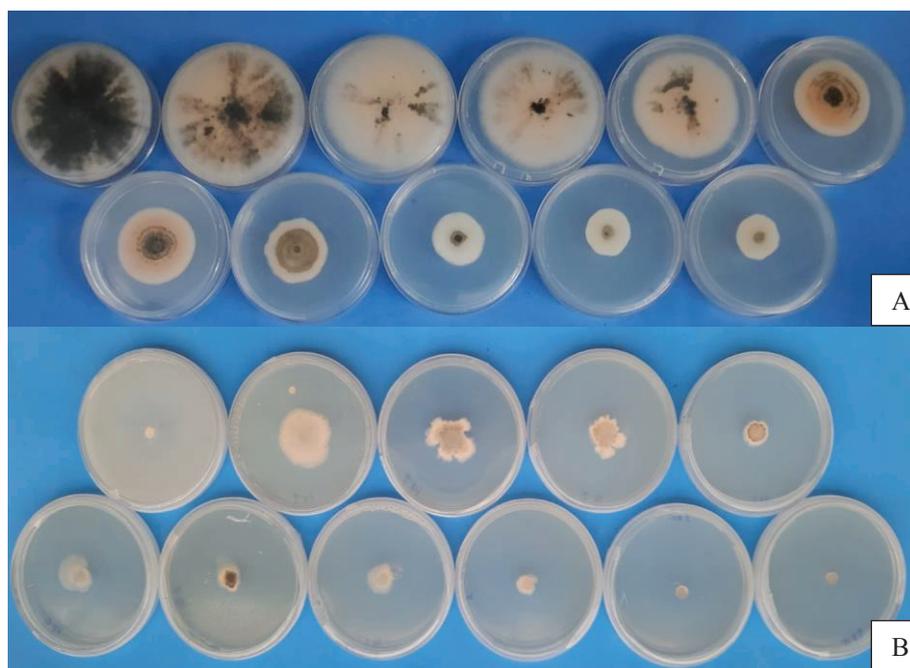
Figura 11 – Sensibilidade dos patógenos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Colletotrichum truncatum* ao extrato de *Diaporthe infecunda*, determinado através do teste de concentração efetiva ( $CE_{50}$ )



Fonte: O autor, 2022.

Os patógenos *C. truncatum* e *S. sclerotiorum* foram considerados sensíveis ao extrato, com  $CE_{50}$  de 2,80 e 0,68  $mg.mL^{-1}$  (Figura 11), após 168 horas e 96 horas (Figura 12) respectivamente, demonstrando capacidade de controle dos patógenos *in vitro*. Outros estudos realizados com extratos para controle de fungos, também apresentam resultados satisfatórios, como Cruz-Silva et al. (2016) que utilizando extrato metanólico de *Randia nitida* obtiveram reduções de até 93,8% para *S. sclerotiorum*, 21,5% para *C. truncatum* e de 37,2% para *Rhizoctonia solani* isolados de soja.

Figura 12 – Sensibilidade dos patógenos *Colletotrichum truncatum* (A) e *Sclerotinia sclerotiorum* (B) ao extrato de *Diaporthe infecunda*, determinado através do teste de concentração efetiva ( $CE_{50}$ ) nas concentrações 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10.



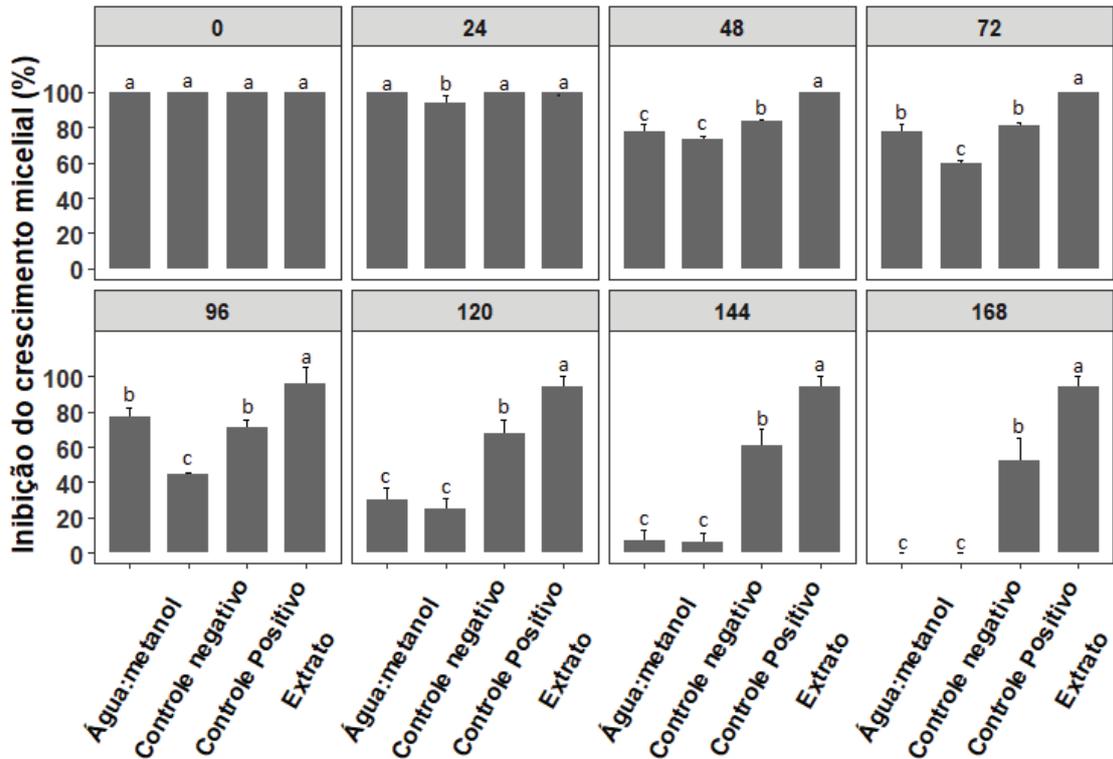
Fonte: O autor, 2022.

#### 4.2 Teste de difusão em ágar após a seleção do extrato e do controle positivo

Com base nos resultados do ensaio de difusão em ágar, verificou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos na inibição do crescimento micelial de *C. truncatum* após 24 horas pós-inoculação. O extrato de *D. infecunda* inibiu 94,4% do crescimento micelial de *C. truncatum* (Figura 14) o que é significativamente maior ( $p < 0,05$ ) que o controle positivo com fungicida sintético que teve 52% de inibição do

crescimento micelial em 168 h pós-inoculação (Figura 13).

Figura 13 – Inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum truncatum* quando em contato com diferentes tratamentos em ensaio de difusão em ágar



Fonte: O autor, 2022.

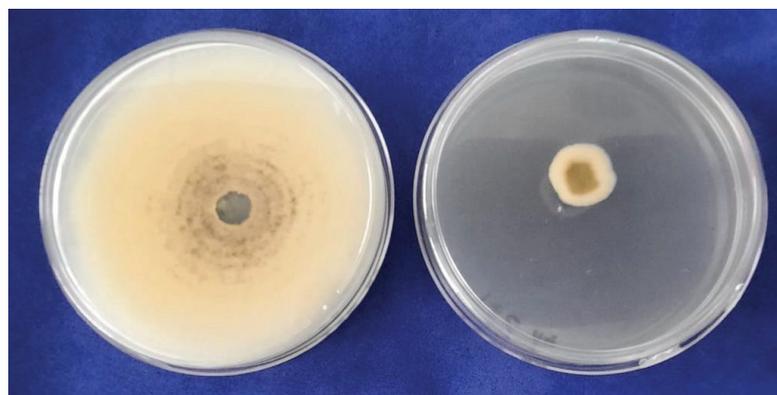
Legenda: Água:metanol – controle solvente.

Controle positivo – Fungicida tiofanato metílico + fluazinam

Extrato - Co-cultivo em meio BD

Testemunha – Controle com água esterelizada

Figura 14 - Desenvolvimento micelial de *Colletotrichum truncatum* (à esquerda) e em contato com o extrato do fungo endofítico *Diaporthe infecunda* (à direita) após 168 horas.



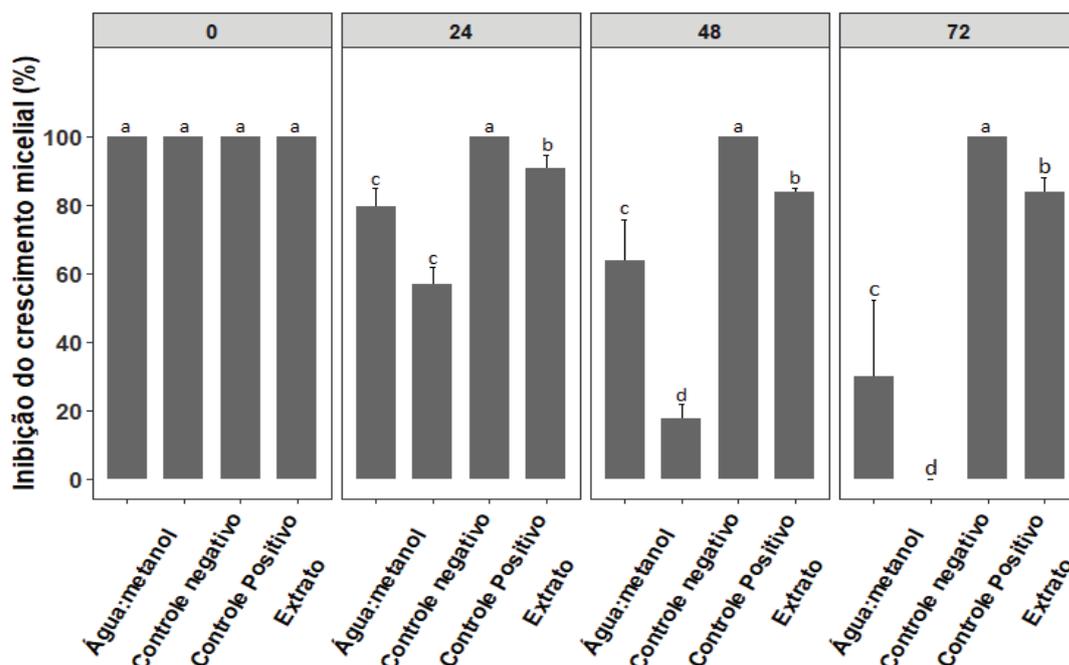
Fonte: O autor, 2021.

O efeito inibitório *in vitro* de fungos endofíticos contra espécies fitopatogênicas de *Colletotrichum* tem sido relatado em diferentes estudos. Como por exemplo, isolados de fungos endofíticos testados contra *C. gloeosporioides* apresentaram inibição por micoparasitismo e antibiose contra o patógeno (BONATELLI ET AL., 2016; PETERS et al., 2020). *Penicillium verruculosum*, *Penicillium pinophilum*, *Geotrichum* sp., *Schizophyllum commune* e *Aspergillus flavus* também apresentaram efeito inibitório contra *Colletotrichum gloeosporioides* (BEZERRA, 2015).

Outro estudo avaliou o efeito de metabólitos do fungo endofítico *Phoma herbarum*, isolado de um composto alcoólico que demonstrou antagonismo efetivo contra *C. gloeosporioides* (GUPTA et al., 2016).

Já para *Colletotrichum acutatum*, endofíticos foram encontrados em isolados de frutos de oliveira (*Olea europaea*), em que se percebeu inibição de crescimento, germinação e esporulação, além de causar danos nas hifas patogênicas (PRETO et al., 2017). Li et al. (2012) também obterão 16 compostos antifúngicos contra o gênero *Colletotrichum*, a partir de uma cepa de *Aspergillus fumigatus* isolado da casca do caule da espécie vegetal *Melia azedarach*.

Figura 15 – Inibição (%) do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* quando em contato com diferentes tratamentos em ensaio de difusão em ágar



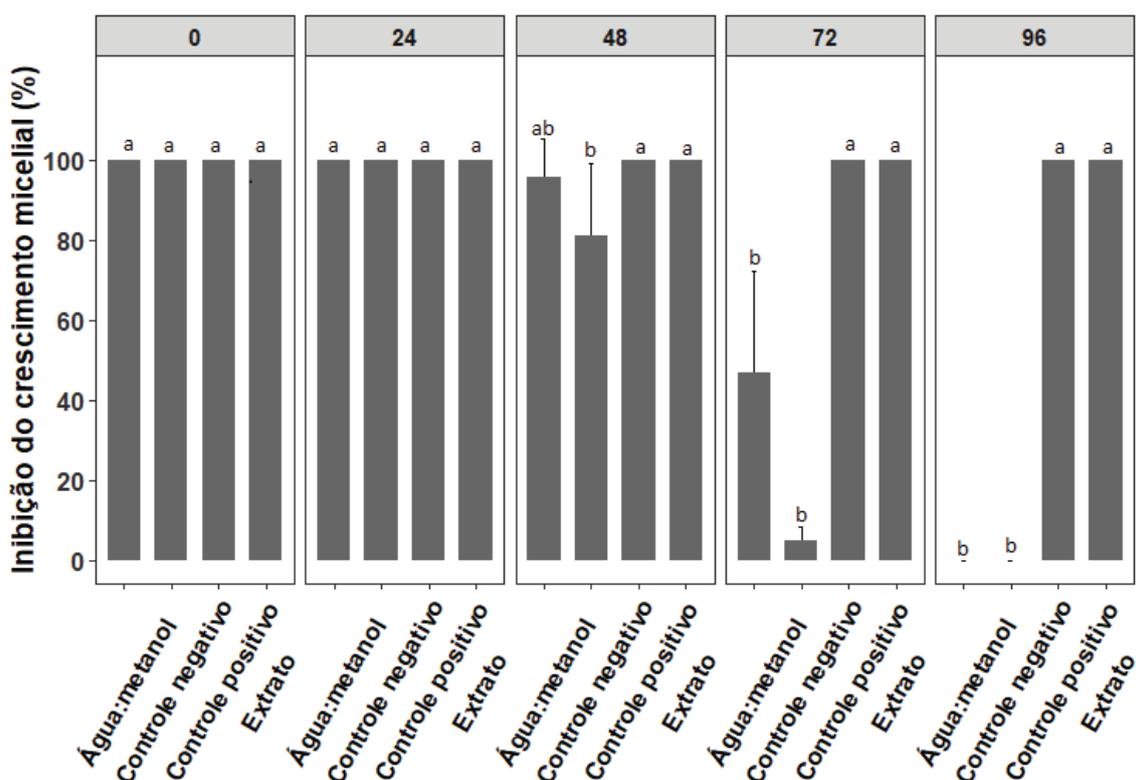
Fonte: O autor, 2022.

Legenda: Água:metanol – controle solvente.

Controle positivo – Fungicida tiofanato metílico + fluazinam  
 Extrato - Co-cultivo em meio BD  
 Testemunha – Controle com água estéril

*Sclerotinia sclerotiorum* cresce mais rápido que *C. truncatum*, portanto, o ensaio de difusão em ágar durou 72 h (Figura 15) em vez de 128 h (Figura 14). O extrato de *D. infecunda* reduziu 83,8% do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* em 78 h pós-inoculação (Figura 17), porém, foi significativamente ( $p < 0,05$ ) inferior em relação ao fungicida que inibiu 100% do crescimento micelial (Figura 15). Além disso, o controle positivo com fungicida e o extrato de *D. infecunda* reduziram em 100% a germinação de escleródios 96 h após a inoculação (Figura 16).

Figura 16 – Inibição (%) do germinação de escleródio, estrutura de sobrevivência de *Sclerotinia sclerotiorum* quando em contato com diferentes tratamentos em ensaio de difusão em ágar



Fonte: O autor, 2022.

Legenda: Água:metanol – controle solvente.

Controle positivo – Fungicida tiofanato metílico + fluazinam

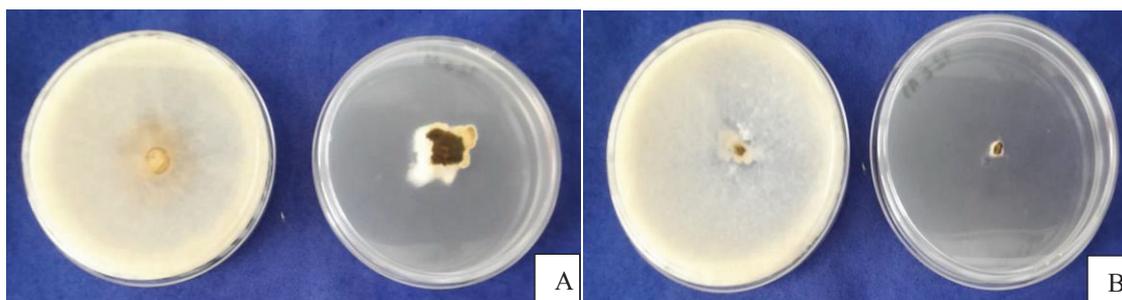
Extrato - Co-cultivo em meio BD

Testemunha – Controle com água estéril

Pesquisas voltadas para o uso de endófitos para o biocontrole de *S. sclerotiorum*, também já foram desenvolvidas, como exemplo, o uso de *Candida pseudotropicalis* que apresentou 50% de inibição de crescimento micelial do patógeno, *Chrysosporium* sp. obteve inibição de 48,9%, *Candida tropicalis* 47,8% e *Trichophyton* sp. 46,7% (ROCHA et al., 2009). A redução de crescimento de *S. sclerotiorum* também foi demonstrada por Ethur (2001) utilizando cepas de *Trichoderma*, o qual obteve como resultado inibição de crescimento de 86 a 94%.

Fernandes (2015) testou a ação antagonista de 178 espécies de fungos endofíticos em *S. sclerotiorum* e o fungo foi inibido por 42 (23,6%) deles.

Figura 17 - Desenvolvimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* (A) após 72 horas (à esquerda) e em contato com o extrato do fungo endofítico (à direita). Germinação do escleródio (B) após 96 horas (à esquerda) e em contato com o extrato do fungo endofítico *diaporthe infecunda* (à direita).

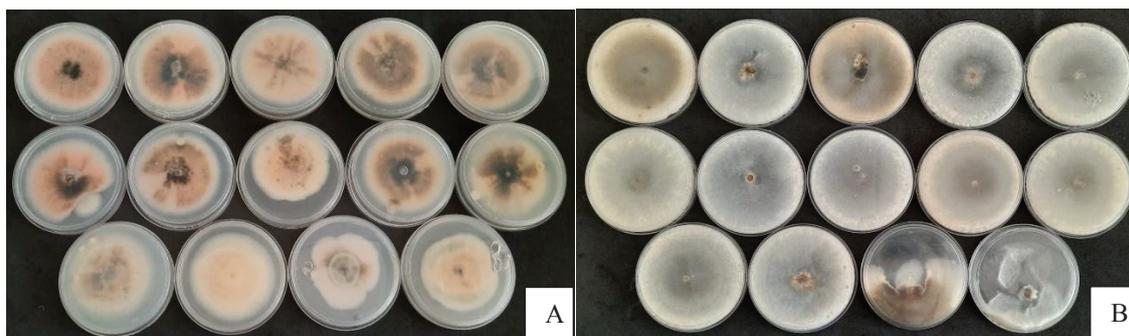


#### 4.4 Bioatividade das porções do extrato *in vitro*

Das frações obtidas a partir do extrato bruto, as mais polares (12 e 13) diferiram estaticamente ( $p < 0,05$ ) das demais no controle de *S. sclerotiorum*, resultado semelhante ao observado para *C. truncatum* em que as frações 10, 11, 12 e 13 diferiram das demais (Figura 18). A escolha do solvente é um fator de importante influência na extração de compostos bioativos, principalmente quando é buscado a obtenção de um ou mais compostos de interesse. A solubilidade de um composto em um determinado solvente é dependente da sua polaridade (SOUZA, 2015). Com isso, o resultado obtido relaciona-se ao fato de as últimas frações retiradas conter metanol, o solvente mais polar dentre os utilizados na partição do extrato bruto, portanto os compostos presentes no extrato que apresentam fungitoxidade são polares. Estudos realizados comparando diferentes solventes confirmam que o metanol apresenta maior capacidade de extração de

compostos bioativos, como Marques et al. (2002) que utilizando extratos metanólicos de *Caryocar brasiliense* obteve maior inibição da germinação de esporos de *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cineria* e *Colletotrichum truncatum*.

Figura 18 – Crescimento micelial dos patógenos *Colletotrichum truncatum* (A) e *Sclerotinia sclerotiorum* (B) quando em contato com as diferentes frações resultados da cromatografia em coluna do extrato de *Diaporthe infecunda*



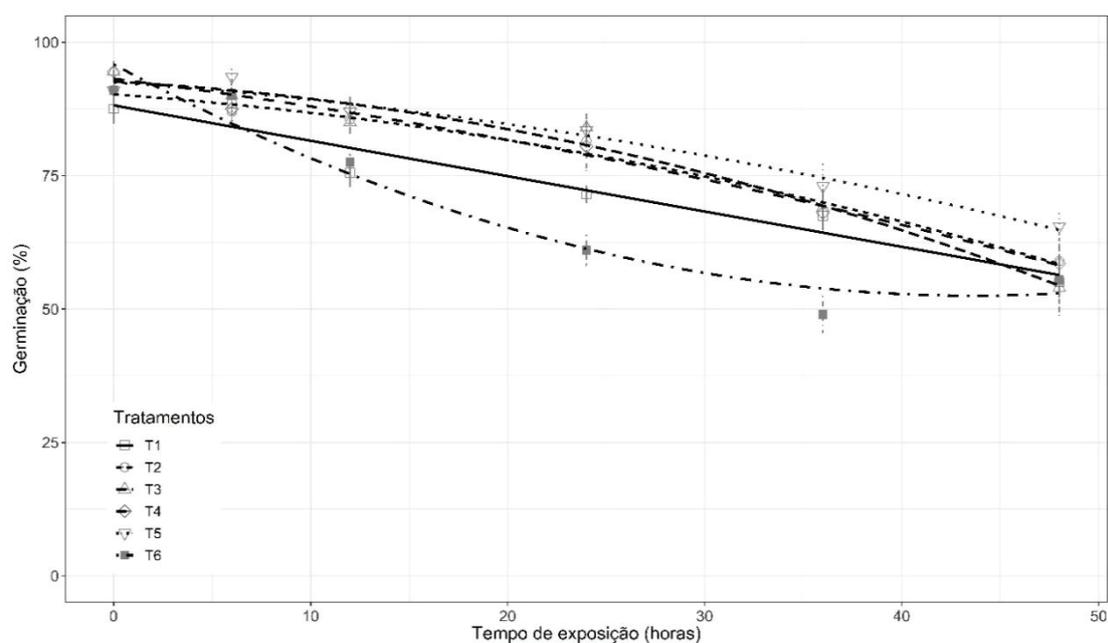
Fonte: O autor, 2022.

Os resultados *in vitro* deste trabalho demonstram a capacidade que o extrato de *D. infecunda* tem de inibir o crescimento dos isolados de *C. truncatum* e *S. sclerotiorum* que causam importantes doenças na cultura da soja e direcionam a continuidade da pesquisa sobre a capacidade que o extrato tem em controlar os patógenos.

#### 4.5 Ajuste de metodologia para tempo de exposição das sementes aos patógenos

Em virtude de os patógenos serem transmitidos via sementes e podendo atingir diferentes partes das plantas posteriormente, foi aplicado extrato nas sementes para determinar o nível de controle e evitar que as sementes sirvam de fonte inóculo para as doenças. Para isso, inicialmente, realizou-se o teste de tempos de exposição das sementes aos patógenos para que houvesse inoculação e também do tempo em que as sementes deveriam ficar emergidas no extrato para que houvesse controle dos patógenos sem que prejudicasse a germinação.

Figura 19 – Germinação (%) de sementes de soja cultivar ‘DM 5958 IPRO’ inoculadas artificialmente com *Colletotrichum truncatum* a partir da restrição hídrica (-0,6 MPa) e tratadas com o extrato de *Diaporthe infecunda* ambos sob diferentes tempos de exposição.



Fonte: O autor, 2022.

Legenda: T1: Testemunha – sem contanto com o extrato.

T2: 1 hora em contato com o extrato.

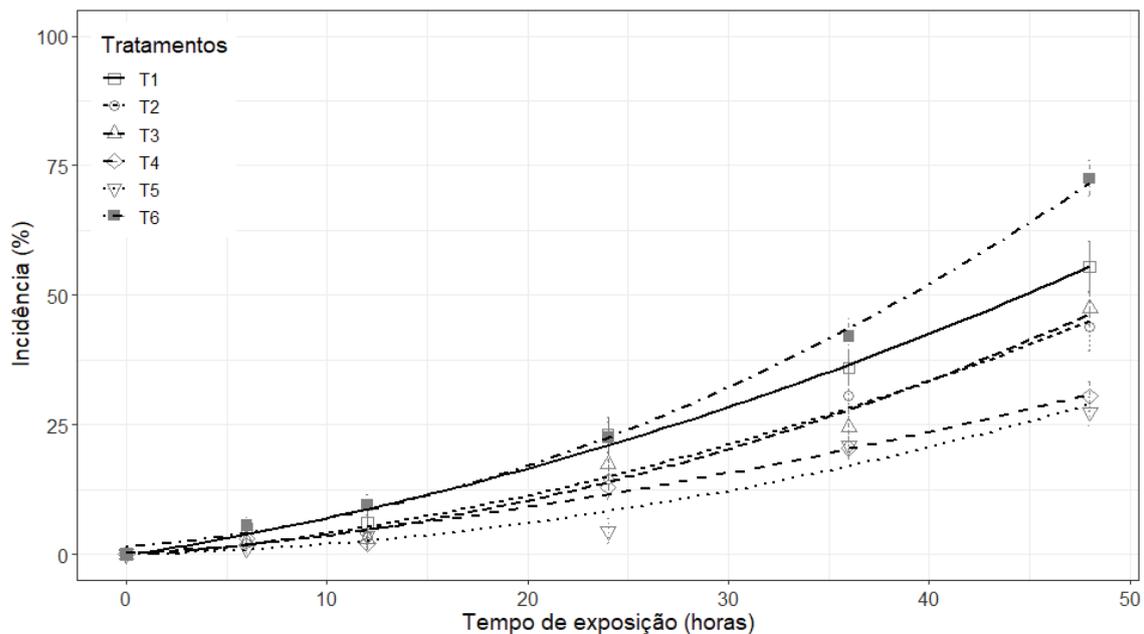
T3: 4 horas em contato com o extrato.

T4: 6 horas em contato com o extrato.

T5: 12 horas em contato com o extrato.

T6: 24 horas em contato com o extrato.

Figura 20 – Incidência (%) de *Colletotrichum truncatum* em sementes de soja cultivar ‘DM 5958 IPRO’, após a inoculação a partir da técnica de restrição hídrica (-0,6 MPa) e tratamento com o extrato de *Diaporthe infecunda*, ambos sob diferentes tempos de exposição.



Fonte: O autor, 2022.

Legenda: T1: Testemunha – sem contanto com o extrato.

T2: 1 hora em contato com o extrato.

T3: 4 horas em contato com o extrato.

T4: 6 horas em contato com o extrato.

T5: 12 horas em contato com o extrato.

T6: 24 horas em contato com o extrato.

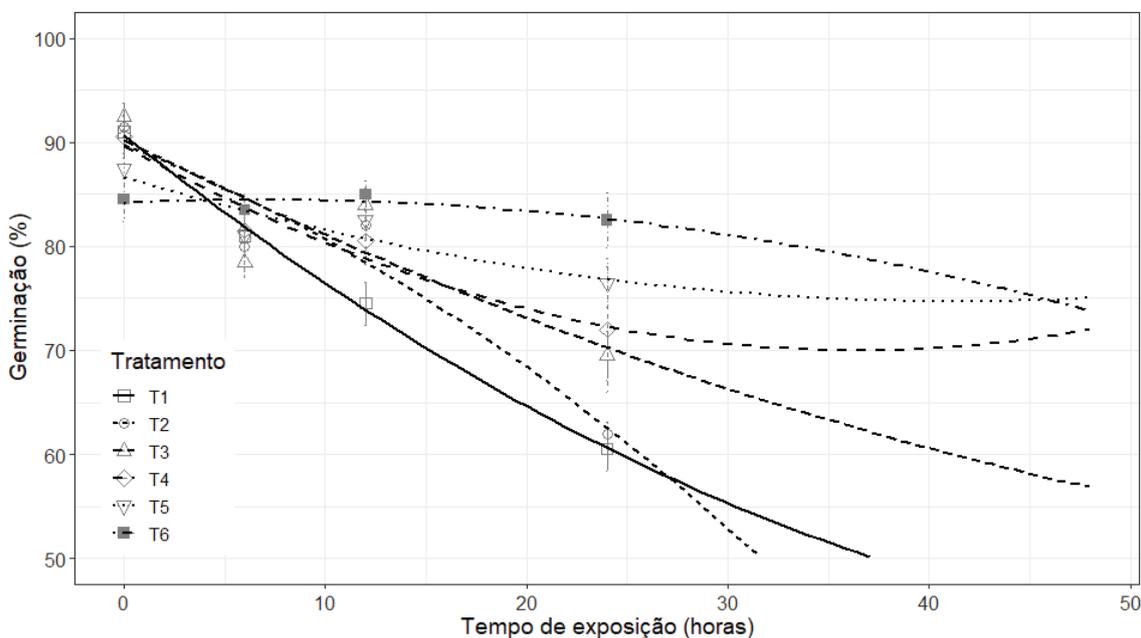
A escolha do tempo de exposição ao patógeno e o tempo em contanto com o extrato, tiveram como base o que é exigido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), instrução normativa n°45 de 17 de setembro de 2013: padrões para a produção e a comercialização de sementes de soja que determina germinação mínima de 80%. Assim, o tempo de exposição ao patógeno foi de 24 horas e o tempo de contanto com o extrato foi de 12 horas, par ambos patógenos.

*C. truncatum*, com 24 horas de exposição e 12 horas de contato com o extrato alcançou germinação de 84%, a testemunha com o mesmo tempo de exposição obteve germinação de 71% (Figura 19). Já na incidência, com o mesmo tratamento, 4% das

sementes estavam contaminadas com o patógeno e a testemunha chegou a 23% (Figura 20).

Em horários de maior tempo de exposição ao patógeno como 48 horas, 55% das sementes da testemunha germinaram, com 12 horas de contanto com o extrato, esse valor subiu para 65%. Em relação a incidência do fungo, a testemunha chegou a 55%, com o tratamento do extrato o valor não passou de 28%. Trabalhos realizados por Galli et al. (2007), com a inoculação de *C. truncatum* em sementes de soja, verificaram que durante o período de 40 horas de inoculação, provocou morte das sementes e plantas de soja, o maior tempo de exposição das sementes ao patógeno, resultou em maior nível de inóculo das sementes comprometendo drasticamente o desenvolvimento do embrião. Esses resultados demonstram a eficiência do método de inoculação pela restrição hídrica para *C. truncatum*, que pode chegar até 100% de infecção após a incubação das sementes (MACHADO et al., 2001; PEREIRA e al., 2009).

Figura 21 – Germinação (%) de sementes de soja cultivar ‘DM 5958 IPRO’ inoculadas artificialmente com *Sclerotinia sclerotiorum* a partir da restrição hídrica (-0,6 MPa) e tratadas com o extrato de *Diaporthe infecunda* ambos sob diferentes tempos de exposição.



Fonte: O autor, 2022.

Legenda: T1: Testemunha – sem contanto com o extrato.

T2: 1 hora em contato com o extrato.

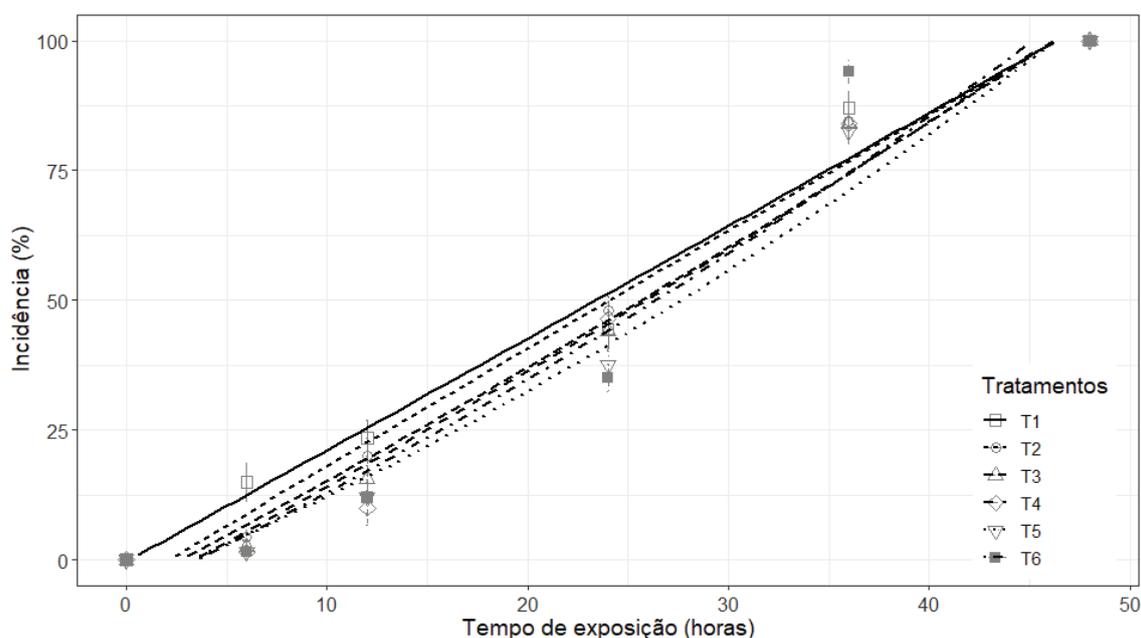
T3: 4 horas em contato com o extrato.

T4: 6 horas em contato com o extrato.

T5: 12 horas em contato com o extrato.

T6: 24 horas em contato com o extrato.

Figura 22 – Figura 20 – Incidência (%) de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja cultivar ‘DM 5958 IPRO’, após a inoculação a partir da técnica de restrição hídrica (-0,6 MPa) e tratamento com o extrato de *Diaporthe infecunda*, ambos sob diferentes tempos de exposição.



Fonte: O autor, 2022.

Legenda: T1: Testemunha – sem contato com o extrato.

T2: 1 hora em contato com o extrato.

T3: 4 horas em contato com o extrato.

T4: 6 horas em contato com o extrato.

T5: 12 horas em contato com o extrato.

T6: 24 horas em contato com o extrato.

*S. sclerotiorum*, com 24 horas de exposição e 12 horas de contato com o extrato obteve germinação de 82,5%, a testemunha com o mesmo tempo de exposição 60,5% (Figura 21). Já na incidência, com o mesmo tratamento, 37% das sementes estavam contaminadas com o patógeno e a testemunha chegou a 45% (Figura 22). Com tempos de exposição menores como 12 horas, o tratamento com extrato atingiu germinação de 85% e incidência de 12% enquanto a testemunha obteve 74% e 23% respectivamente. Com 48 horas de inoculação, a germinação não passou de 3% em nenhum dos tratamentos e a incidência foi de 100%, evidenciando também a eficiência da técnica de inoculação de

sementes por meio do contato direto, Migliorini et al. (2016), relataram que inoculando *S. sclerotiorum* pela mesma técnica em feijão, também obtiveram alta incidência da doença chegando a 100%. Ainda, foi verificado por Venturoso et al. (2015), que *S. sclerotiorum* é um patógeno muito agressivo, devido à rápida colonização do tecido vegetal e causar morte das plantas.

#### 4.6 Tratamento de sementes inoculadas com os patógenos

A incidência de *C. truncatum* (Tabela 1) e *S. sclerotiorum* (Tabela 2) em sementes de soja foi maior para o tratamento apenas com solvente (32%) e para as sementes não tratadas (35%) em relação aos demais tratamentos. O controle negativo não inoculado e não tratado não teve incidência de ambos os patógenos, o que indicou que a semente de soja utilizada não foi infectada por ambos os patógenos, e que a incidência nos demais tratamentos foi a partir do procedimento de inoculação.

Tabela 1 - Incidência (%), germinação (%), envelhecimento acelerado (EA, %), e teste de frio (TF, %) em sementes de soja cultivar ‘DM 5958 IPRO’ com e sem inoculação de *Colletotrichum truncatum* por meio da restrição hídrica com manitol (-0,6 MPa).

Tratamentos	Incidência (%)	Germinação (%)	EA (%)	TF (%)
T1 – Controle positivo	3 cd*	95 ab**	77 a**	95 a**
T2 – Extrato	12 b	74 b	62 b	77 b
T3 – Controle solvente	32 a	68 bc	53 bc	69 bc
T4 – Extrato + controle positivo	6 bc	65 bc	51 bc	76 b
T5 – Testemunha positiva	35 a	61 c	49 c	64 c
T6 – Testemunha negativa	0 d	97 a	81 a	93 a
CV (%)***		7,03	9,49	5,95

\*Média ± desvio padrão. Letras distintas sobre as colunas indicam diferença estatística pelo teste de Kruskal-Wallis. \*\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). \*\*\*Coeficiente de variação.

<sup>1</sup>Tratamentos: Controle positivo: Fungicida; Extrato de *Diaporthe infecunda*; Controle solvente: Apenas metanol; T4: Extrato de *Diaporthe infecunda* + fungicida; Testemunha positiva: sementes expostas ao patógeno, mas não tratadas; Testemunha negativa: sementes não expostas aos patógenos.

Os tratamentos com extrato de *D. infecunda* e extrato + fungicida apresentaram

baixa incidência (<12%) dos patógenos nas sementes (Tabela 1). No entanto, reduziram a germinação, principalmente no tratamento do extrato + fungicida (68%) em comparação ao fungicida somente (95%) quando *C. truncatum* foi inoculado (Tabela 1). A germinação de sementes com uso de extrato de *D. infecunda* no teste de envelhecimento acelerado (62%) e frio (77%) foi superior às sementes não tratadas (49% e 64%, respectivamente) quando *C. truncatum* foi inoculado (Tabela 1). No Brasil, é necessário um mínimo de 80% de germinação para comercialização da semente (BRASIL, 2009), portanto, o único tratamento que atingiu esse valor foi o fungicida como controle positivo.

Tabela 2 - Incidência (%), germinação (%), envelhecimento acelerado (EA, %), e teste de frio (TF, %) em sementes de soja cultivar ‘DM 5958 IPRO’ com e sem inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* por meio da restrição hídrica com manitol (-0,6 MPa).

Tratamentos	Incidência (%)	Germinação (%)	EA (%)	TF (%)
T1 – Controle positivo	3 b*	96 a**	83a**	94 ab**
T2 – Extrato	10 b	80 b	62 b	70 b
T3 – Controle solvente	53 a	55 c	34 c	49 c
T4 – Extrato + controle positivo	3 bc	53 c	29 c	58 bc
T5 – Testemunha positiva	52 a	59 c	30 c	53 bc
T6 – Testemunha negativa	0 c	99 a	89 a	96 a
CV (%)***		7,48	10,51	11,72

\*Média ± desvio padrão. Letras distintas sobre as colunas indicam diferença estatística pelo teste de Kruskal-Wallis. \*\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). \*\*\*Coeficiente de variação.

<sup>1</sup>Tratamentos: Controle positivo: Fungicida; Extrato de *Diaporthe infecunda*; Controle solvente: Apenas metanol; T4: Extrato de *Diaporthe infecunda* + fungicida; Testemunha positiva: sementes expostas ao patógeno, mas não tratadas; Testemunha negativa: sementes não expostas aos patógenos.

Os resultados obtidos para *S. sclerotiorum* foram semelhantes aos de *C. truncatum*. A incidência do patógeno foi baixa para os tratamentos com o extrato de *D. infecunda* (10%) e o extrato + fungicida (3%), porém, diminuiu a germinação das sementes (Tabela 2). Carvalho et al. (2020) também relataram que a prospecção do fungo endofítico *Aureobasidium pullulans* proporcionou redução significativa de *C. truncatum* em sementes de soja, mas sem aumento na germinação das sementes.

Os testes de envelhecimento acelerado e frio apresentaram resultados semelhantes ao teste de germinação quando *S. sclerotiorum* foi inoculado, onde o tratamento com maior germinação de sementes permanece com aplicação apenas de fungicida. No entanto, a germinação das sementes diminuiu consideravelmente para todos os tratamentos no teste de envelhecimento acelerado, o que não foi observado no teste a frio. Em estudo realizado por Freitas et al. (2016), o envelhecimento acelerado foi muito drástico para as sementes, chegando à perda total da capacidade germinativa. Este efeito se deve ao alto teor de água alcançado pelas sementes após o teste com o uso de alta temperatura, uma vez que o teste de frio proporcionou resultados semelhantes ao teste de germinação.

Tabela 3 – Emergência em areia (%), comprimento de plântula (cm), massa fresca (MF, g) e massa seca (MS, g) de sementes de soja cultivar ‘DM 5958 IPRO’ com e sem inoculação de *Colletotrichum truncatum* por meio da restrição hídrica com manitol (-0,6 MPa).

Tratamentos	Emergência (%)	Comprimento (cm)	MF (g)	MS (g)
T1 – Controle positivo	92 a**	40,00 a**	1,46 a*	0,24 a*
T2 – Extrato	68 b	25,40 b	1,03 b	0,13 b
T3 – Controle solvente	38 c	18,08 c	0,74 c	0,11 c
T4 – Extrato + controle positivo	34 c	18,40 c	0,76 c	0,13 b
T5 – Testemunha positiva	42 c	18,80 c	0,71 c	0,10 d
T6 – Testemunha negativa	94 a	40,44 a	1,49 a	0,25 a
CV (%)***	16,17	14,08		

\*Média ± desvio padrão. Letras distintas sobre as colunas indicam diferença estatística pelo teste de Kruskal-Wallis. \*\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). \*\*\*Coeficiente de variação.

<sup>1</sup>Tratamentos: Controle positivo: Fungicida; Extrato de *Diaporthe infecunda*; Controle solvente: Apenas metanol; T4: Extrato de *Diaporthe infecunda* + fungicida; Testemunha positiva: sementes expostas ao patógeno, mas não tratadas; Testemunha negativa: sementes não expostas aos patógenos.

A germinação de sementes de soja em areia também foi maior para os tratamentos sem inoculação dos patógenos (Tabela 3 e Tabela 4). O tratamento com o extrato de *D. infecunda* apresentou germinação de 68%, o fungicida 92%, enquanto o tratamento com

extrato + fungicida não diferiu estatisticamente das sementes não tratadas com germinação de 34% para *C. truncatum* (Tabela 3).

Tabela 4 – Emergência em areia (%), comprimento de plântula (cm), massa fresca (MF, g) e massa seca (MS, g) de sementes de soja cultivar ‘DM 5958 IPRO’ com e sem inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* por meio da restrição hídrica com manitol (-0,6 MPa).

Tratamentos	Emergência (%)	Comprimento (cm)	MF (g)	MS (g)
T1 – Controle positivo	90 a**	39,56 a**	1,44 a*	0,25 a*
T2 – Extrato	60 b	25,42 b	1,15 b	0,17 b
T3 – Controle solvente	46 c	21,64 c	0,82 c	0,11 d
T4 – Extrato + controle positivo	38 bc	17,64 d	1,17 b	0,13 c
T5 – Testemunha positiva	38 bc	21,12 cd	0,75 c	0,11 d
T6 – Testemunha negativa	94 a	40,44 a	1,49 a	0,27 a
CV (%)***	20,64	16,77		

\*Média ± desvio padrão. Letras distintas sobre as colunas indicam diferença estatística pelo teste de Kruskal-Wallis. \*\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). \*\*\*Coeficiente de variação.

<sup>1</sup>Tratamentos: Controle positivo: Fungicida; Extrato de *Diaporthe infecunda*; Controle solvente: Apenas metanol; T4: Extrato de *Diaporthe infecunda* + fungicida; Testemunha positiva: sementes expostas ao patógeno, mas não tratadas; Testemunha negativa: sementes não expostas aos patógenos.

No teste com inoculação de *S. sclerotiorum* o tratamento com fungicida teve apenas 90% de emergência no teste de areia (Tabela 4). Além disso, o comprimento das plântulas de massa fresca e seca também foi maior em comparação ao controle não tratado. Resultados semelhantes foram encontrados por Migliorini et al. (2017), em que todas as sementes de feijão inoculadas com *S. sclerotiorum* produziram mudas com menor massa seca ou teor de parte aérea. O extrato de *D. infecunda* apresentou germinação de 60%, enquanto o tratamento com extrato + fungicida teve 38% da germinação das sementes, não diferindo estatisticamente do controle não tratado (94%). *Sclerotinia sclerotiorum* causou a morte de sementes de canola, cártamo, crambe, girassol, nabo e niger, antes mesmo de iniciar o processo de germinação, o que está associado à agressividade do patógeno (VENTUROSOSO, 2015). Esses resultados reforçam os de outros

autores e confirmam o efeito nocivo do fungo no estabelecimento inicial das lavouras (BOTELHO et al., 2013; REIS et al., 2014; VENTUROSO et al., 2015).

Em estudos realizados por Almeida et al. (2021) avaliando 18 artigos científicos que utilizaram extratos como estratégia para o manejo de patógenos em sementes, 100% deles afirmaram que os extratos são eficientes e 63% proporcionam um aumento na germinação de sementes e apenas 5% tiveram efeito negativo na qualidade fisiológica da semente. Outro fator que pode influenciar no resultado da germinação é a dose do extrato, em que Melo et al., 2021, testando doses do extrato à base de algas, determinaram que acima de 0,09 L.kg<sup>-1</sup> de sementes de soja, houve redução na porcentagem de plantas normais. Esses achados mostram que as pesquisas vêm crescendo seguindo essa via alternativa ao tratamento químico.

Na bioprospecção de compostos produzidos pelo metabolismo secundário de endófitos de aroeira, foi identificada a presença de diaportina e ortosporina no cultivo de *Diaporthe terebinthifolii*, que já possuem comprovada ação antimicrobiana contra patógenos (MEDEIROS et al., 2018). Em outro isolado do mesmo gênero, verbanol, álcool feniletílico, hexadecanoato de metila e isoverbanol foram encontrados no extrato do fungo, o sinergismo entre esses compostos foi eficaz no controle do desenvolvimento do patógeno *Phyllosticta citricarpa* (TONIAL, 2017).

Os fungos endofíticos são uma fonte para exploração, mas ainda requer desenvolvimento de produtos e produção em larga escala, para que possam ser utilizados no manejo integrado de doenças, representando uma alternativa de controle visando à redução do uso de agrotóxicos.

## 5 – CONCLUSÃO

- Foi evidenciado que a utilização de extratos do fungo endofítico *Diaporthe infecunda* LGMF694 oriundo de folhas de *Schinus terebinthifolius*, apresenta atividade antagônica aos patógenos *Colletotrichum truncatum* e *Sclerotinia sclerotiorum*, sendo capaz de inibir o crescimento micelial e a incidência sob as sementes, no entanto, não asseguraram o potencial germinativo das sementes.
- Esses resultados reforçam a necessidade de desenvolvimento de uma formulação e metodologia de aplicação capazes de manter o potencial biotecnológico favorável sem debilitar as sementes.
- As sementes não inoculadas apresentaram os melhores resultados e o fungicida é o melhor tratamento para as sementes inoculadas, seguido dos tratamentos realizados com o extrato.

## REFERÊNCIAS

ALLEN, T. W.; BRADLEY, C.A; SISSON, A. J.; BYAMUKAMA, E.; CHILVERS, M. I.; COKER, C.M.; COLLINS, A.A.; DAMICONE, J.P.; DORRANCE, A. E.; DUFAULT, N.S.; ESKER, P.D.; FASKE, T. R; GIESLER, L. J.; GRYBAUSKAS, A. P.; HERSHMAN, D. E.; HOLLIER, C.A.; ISAKEIT, T.; JARDINE, D.J.; KELLU, H.M.; KEMERAIT, R.C.; KLECZEWSKI, N.M.; KOENNING, S. R.; KUERLE, J.E.; MALVICK, D.K.; MARKELL, S.G.; MEHL, H.L.; MUELLER, D. S.; MUELLER, D. D.; MULROONEY, R. P.; NELSON, B.D.; NEWMAN, M. A.; OSBORNE, L.; OVERSTREET, C.; PADGETT, G. B.; PHIPPS, P.M.; PRICE, P.P.; SIKORA, E. J.; SMITH, D.L.; SPURLOCK, T.N.; TANDE, C.A.; TENUTA, A.U.; WISE, K.A.; WRATHER, J.A. Estimativas de perda de produtividade da soja devido a doenças nos Estados Unidos e Ontário, Canadá de 2010 a 2014. **Plant Health Progress**, v.18, n.1, p.19-27, 2017.

ALMEIDA, A. R.; SILVA, I. C.; SOUZA, C. A. F.; AVELINO, J. R. L.; SANTOS, J. E. C. C.; MEDEIROS, E. V.; PINTO, K. M.; Plant extract as a strategy for the management of seed pathogens: a critical review. **Reserach, society and development**, v.10, n.14, 2021.

ALMEIDA, J. E. M.; COLLARES, D. G.; BARBOSA, P. F. D. **Biospropeção microbiana**. Embrapa Agroenergia, 2015.

ANKE, T.; OBERWINKLER, F.; STEGLICH, W.; SCHRAMM, G. The strobilurins – new antifungal antibiotics from de basidiomycete *Strobilurus tenacellus*. **The journal of antibiotics**, v.30, n.10, p.806-810, 1977.

ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI, W. J. R.; VAN, J. D.; VAN VUURDE, J. W.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**. 68:4906-4914, 2002.

ARAUJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI, W. JR.; VAN ELSAS, J. D.; VAN VUURDE, J. W.; AZEVEDO, J. L.; Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**. v.68, n.10, 2002.

ARNOLD, A. E.; LUTZONI, F.; Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? **Ecology**, n. 88, v. 3, p. 541- 549, 2007.

ARNOLD, A. E.; MEJÍA, L. C.; KYLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.100, n.26, 2003.

ARSHAD, M. ULLAH, M. I.; CAGATAY, N. S.; ABDULLAH, A.; Field evaluation of water plant extracts on sucking insect pests and their associated predators in transgenic Bt cotton. **Egyptian Journal of pest control**, v. 29, n.1, 2019.

BARBOSA, F. R.; GONZAGA, A. C. O. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2012.

BASSEGIO, E. R.; REIK, G. G.; PIOVESAN, B.; MILANESI, P. M.; Atividade antifúngica de extratos vegetais no controle de patógenos e tratamento de sementes em trigo. **Revista científica rural**, v. 21, n.1, p. 22-33, 2018.

BASTIAS, D.A.; MARTÍNEZ-GHERSA, M.A.; BALLARÈ, C.L.; GUNDEL, P.E. Epichloë Fungal Endophytes and Plant Defenses: Not Just Alkaloids. **Trend in Plant Science**, v.22, n.11, 2017.

BONATELLI, M.L.; TSUI, S., MARCON, J., BATISTA, B.D.; KITAJIMA, E.W.; PEREIRA, J.O.; Atividade antagonista de fungos de lesões de antracnose

em *Paulliniacupana* contra *Colletotrichum* sp. **Journal Plant Pathology**. v. 98, p. 197-205, 2016.

BOTELHO, L. S.; ZANCAN, W. L. A.; MACHADO, J. C.; BARROCAS, E. N. Performance of common bean seeds infected by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of seed Science**, v. 35, n. 2, p. 153-160, 2013.

BOTELLA, L.; DIEZ, J. J.; Phylogenetic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. **Fungal diversity**, v.47, n. 1, p. 9-18, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. MAPA/ACS, 2009.

CADORE, P. C; TORMEN, R. N. Como controlar mofo branco em feijão. **Cultivar Grandes Culturas**, n. 190, p. 38 – 40, 2015.

CAFÊU, M. C.; SILVA, G. H.; TELES, H. L.; BOLZANI, V. S.; ARAÚJO, A. R.; YOUNG, M. C. M.; PFENNING, L .H.; Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 991-995, 2005.

CARD, S.; JOHNSON, L.; TEASDALE, S.; CARADUS, J. Deciphering endophyte behaviour: the link between endophyte biology and efficacious biological control agents. **FEMS Microbiology Ecology**, v.92, 2016.

CARVALHO, W. H. A. N. P.; SILVA, H. F.; SANTOS, A. M. G.; DA COSTA, E. M. Prospecção de *Aureobasidium pullulans*, isolado do bioma caatinga, no biocontrole de *Colletotrichum truncatum* em sementes de soja. **Ensaio**, v.24, n.4, p. 370-380, 2020.

CHADHA, N.; MISHRA, M.; RAJPAL, K.; CHOUDHARY, D.K.; VARMA, A. An ecological role of fungus endophytes to ameliorate plants under biotic stress. **Archives of Microbiology**, v. 197, p. 869-881, 2015.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 421-437, 2013.

CHUNG, W.H.; ISHII, H.; NISHIMURA, K.; FUKAIA, M.; YANO, K.; KAJITANI, Y. Fungicide sensitivity and phylogenetic relationship of anthracnose isolated from various fruit crops in Japan. **Plant Disease**, v.90, n.4. p. 506-512, 2006.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**. Brasília, v. 8, n. 12, 2021.

CONRATH, U.; BECKERS, G. J. M.; LANGENBACH, C. J. G.; JASKIEWICZ, M.R. Priming for enhanced defense. **Annual Review of Phytopathology**, v. 53, n.1, p. 97-119, 2015.

COPPO, J. C., STANGARLIN, J. R., MIORANZA, T. M., COLTRO-RONCATO, S., KUHN, O. J., SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; Sanidade e germinação de sementes de soja tratadas com extratos de plantas e de fungo. **Revista De Ciências Agroambientais**, v. 15, n.2, p. 92–99, 2018.

COZZOLINO, E.; GIORDANO, M.; FIORENTINO, N.; EL-NAKHEL, C.; PANNICO, A.; MOLA, I. D.; MORI, M.; KYRIACOU, M.; COLLA, G.; ROUPHAEL, Y. Appraisal of biodegradable mulching films and vegetal-derived biostimulant application as eco-sustainable practices for enhancing lettuce crop performance and nutritive value. **Agronomy**, v. 10, n.3, p. 427-445, 2020.

CRUCIOL, G. C. D.; COSTA, M. L. N. Influência de metodologias de inoculação de *Macrophomina phaseolina* no desempenho de cultivares de soja. **Summa Phytopathologica**, v. 43, n. 4, p. 337-343, 2017.

CRUZ-SILVA, S. C. B.; MATIAS, R.; BONO, J. A. M.; SANTOS, K.S.; LUDWING, J.; Potencial antifúngico de extratos e frações de folhas de *Randia nitida* em patógenos de soja e sua fitoquímica. **Revista Caatinga**, v. 29, n.3, p. 594-602, 2016.

DAMASCENA, J. F.; OLIVEIRA, P. L. S.; MOCHKO, A. C. R.; ANDRADA, K. S. P., NASCIMENTO, I. O.; Efeitos do extrato de própolis sobre a qualidade sanitária e

fisiológica de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) e soja (*Glycine max*). **Agroecossistemas**, v. 12, n. 2, p. 102 – 115, 2020.

DEMAIN, A.L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 185-201, 2014.

DIAS, M. D.; PINHEIRO, V. F.; CAFÉ-FILHO, A. C. Impact of anthracnose on the yield of soybean subjected to chemical control in the north region of Brazil. **Summa phytopathologica**, v. 42, p. 18-23, 2016.

EDGONGTON, L. V.; KLEW, K. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, v. 61, p. 42-44, 1971.

ETHUR, L. Z.; CEMBRANEL, C. Z.; SILVA, A. C. F. da. Seleção de *Trichoderma* spp. visando ao controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*. **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 885-887, 2001.

FELBER, A. C.; ORLANDELLI, R. C.; RHODEN, S. A.; GARCIA, A.; COSTA, A.T.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A.; Bioprospecting foliar endophytic fungi of *Vitis labrusca* Linnaeus, Bordô and Concord cv. **Annals of Microbiology**, v. 66, p.765–775, 2016.

FERNANDES, E. G. **Fungos endofíticos em soja (*Glycine max*): Diversidade, biocontrole de fitopatógenos e análise de metabólitos**. maio de 2015. (Monografia – Universidade Federal de Viçosa).

FISHER, P.J.; PETRINI O.; SCOTT. H.M.L.; The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L). **New Phytologist**, n.122 p. 299–305, 1992.

FREITAS, R.A.; NASCIMENTO, W.M.; Teste de envelhecimento acelerado em sementes de lentilha. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n.3, p.59-63, 2006.

GALLI, J.A.; PANIZZI, R. C.; VIEIRA, R. D.; Resistência de variedades de soja à morte de plântulas causada por *Colletotrichum truncatum*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 2, p. 163-165, 2007.

- GAO, F.; DAI, C.; LIU, X.; Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n.13, p. 1346–1351, 2010.
- GOMES, R.R.; GLIENKE, C.; VIDEIRA, S.I.; LOMBARD, L.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. **Persoonia**, v. 31, p. 1-41, 2013.
- GORGEN, C. A.; NETO, A. N. S.; CARNEIRO, L. C.; RAGAGNIN, V.; LOGO, M. Controle do mofo-branco com palhada e *Trichoderma harzianum* 1306 em soja. **Fitopatologia – Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 44, n. 12, 2009.
- GUISCHEM, J. M.; FARIAS, S. A.; FIGUEIREDO, T. R.; CHAVES, S. M. A.; FIGUEIREDO, T. B.; PEREIRA, C. F.; ARAUJO, G. R. J.; MARTINS, R. M. Teste de frio e envelhecimento acelerado na avaliação de vigor de sementes de feijão-frade. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 182-191, 2010.
- GUPTA, S.; KAUL, S.; SINGH, B.; VISHWAKARMA, R.A.; DHAR, M.K.; Produção de álcool genticílico a partir de *Phoma herbarum* endofítico em *Curcuma longa* L. e sua atividade antagônica ao patógeno da mancha foliar *Colletotrichum gloeosporioides*. **Aplic. Bioquímica. Biotecnologia**. v. 180, 1093-1109, 2016.
- HANADA R. E.; POMELLA A. W. V.; COSTA H. S.; BEZERRA J. L.; LOGUERCIO, L.L.; PEREIRA J.O.; Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuaçu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. **Fungal Biology**, v. 114, n.11, p. 901–910, 2010.
- HARTMAN, G. L.; WEST, E. D.; HERMAN, T. K. Crops that feed the world 2. Soybean- Worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. **Food Security**, v. 3, n.1, p. 5-17, 2011.
- HEIJDEN, M. G. A.; HARTMANN, M. Networking in the plant microbe. **Plos Biology**, v. 14, n. 2, 2016.
- HENNING, A. A. **Patologia e tratamento de sementes: noções gerais**. Londrina: Embrapa Soja, 2004. 51p. (Documentos, 235).

Henning, A. A. **Patologia e tratamento de sementes: noções gerais**. Embrapa Soja, Documentos, 235, Londrina, 2004.

IASON, G. R.; TAYLOR, J.; HELFER, S. Community-based biotic effects as determinants of tree resistance to pests and pathogens. **Forest Ecology and Management**, v. 417, p. 301-312, 2018.

JI, S. H.; GURURANI, M. A.; CHUN, S.C. Expression analysis of rice pathogenesis related proteins involved in stress response and endophytic colonization properties of 57 gfp-tagged *Bacillus subtilis* CB-R05. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, p. 231-341, 2014.

JULIATTI, F. C.; FIGUEIRO, A. A.; GARCIA, R. A.; SANTOS, J. B.; MACHADO, J. C.; POZZA, E. A.; LOBO JUNIOR, M.; CIVARDI, E. A.; PAULA, J. T. J.; VIEIRA, R. F. LEHNER, M. S.; LIMA, R. C.; JACCOULD FILHO, D. S. *Sclerotinia sclerotiorum* e mofo branco: estudos básicos e aplicados. **Revisão anual de Patologia de plantas**, v. 23, p. 159-194, 2015.

KHAN, A. L.; HAMAYUN, M.; KANG, S. M.; KIM, Y. H.; JUNG, H. Y.; LEE, J. H.; LEE, I. J.; Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. **BMC Microbiology**, v. 12, p. 1-14, 2012.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chemistry & Biology**, v. 19, n. 7 p. 792-947, 2012.

LARRAN, S.; PERELLO, A.; SIMON, M.R.; MORENO, V.; The endophytic fungi from wheat (*Triticum aestivum* L.). **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 565-572, 2007.

LEHNER, M.S.; PETHYBRIDGE, S. J.; MEYER, M.C.; DEL PONTE, E. M. Meta-analytic modeling of the incidence yield and incidence sclerotial production relationship in soybean white mold epidemics. **Plant Pathology**, Oxford, 2016.

LEITE, T. S.; CNOSSEN-FASSONI, A.; PEREIRA, O.L.; MIZUBUTI, E. S. G.; ARAÚJO, E.F.; QUEIROZ, M.V.; Novel and highly diverse fungal endophytes in

soybean revealed by the consortium of two different techniques. **Journal of Microbiology**, v. 51, n.1, p. 56–69, 2013.

LEITE, T. S.; FASSONI, C.A.; PEREIRA, O. L.; MIZUBUTI, E. S. G.; ARAUJO, E. F.; QUEIROZ, M.V. Novel and highly diverse fungal endophytes in soybean revealed by the consortium of two different techniques. **Journal of Microbiology**, v.51, n.1, p. 56-69, 2013.

LEME, A. C.; BEVILAQUA, M. R. R.; RHODEN, S. A.; MANGOLIN, C. A.; MACHADO, M. F. P. S.; PAMPHILE, J. A.; Molecular characterization of endophytes isolated from *Saccharum* spp based on esterase and ribosomal DNA (ITS1-5.8S-ITS2) analyses. **Genetics and Molecular Research**, v.12, n.3, p. 4095–105, 2013.

LI, X. J.; ZHANG, Q.; ZHANG, A.L.; GAO, J.M.; Metabolites from *Aspergillus fumigates*, an endophytic fungus associated with *Melia azedarach*, and their antifungal, antifeedant and toxic activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, n.13, p.3424-3431, 2012.

MACHADO, J. C. **Patologia de Sementes: fundamentos e aplicações** Lavras: UFLA/FAEPE. p.106, 1998.

MACHADO, J. C.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M. G. G. C.; ALVES, M. C.; Inoculação artificial de sementes de soja por fungos, utilizando solução de manitol. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.23, n.2, p.95-101, 2001.

MACHADO, J.C. “**Tratamento de sementes no controle de doenças.**” Lavras: UFLA/FAEPE, 2000, p.128.

MANCINI, V.; MUROLO, S.; ROMANAZZI, G. Diagnostic methods for detecting fungal pathogens on vegetable seeds. **Plant Pathology**, v. 65, n. 5, p. 691-703, 2016.

MANGWENDE, E.; KRITZINGER, Q.; AVELING, T. A. S.; Control of *Alternaria* leaf spot of coriander in organic farming. **European Journal of Plant Pathology**, v.154, n.3, p.575-584, 2019.

MARCOS FILHO, J. Testes de vigor: importância e utilização. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Eds.). **Vigor de Sementes: conceitos e testes**. Londrina: Abrates, p. 1-21, 1999.

MARQUES, M. C. S.; CARDOSO, M. G.; SOUZA, P.E.; GAVILANES, M. L.; SOUZA, J. A.; PEREIRA, N. E.; NEGRÃO, I. O.; Efeito fungitóxico dos extratos de *Caryocar brasiliense* Camb. Sobre os fungos *Botrytis cineria*, *Colletotrichum truncatum* e *Fusarium oxysporum*. **Ciência e agrotecnologia**, edição especial, p. 1410 – 1419, 2002.

MÁRQUEZ, S.S.; BILLS, G.F.; HERRERO, N.; ZABALGOGEAZCOA, Í.; Non-systemic fungal endophytes of grasses. **Fungal Ecology**, n. 5, p. 289-297, 2012.

MEDEIROS, A.G.; SAVI, D.C.; MITRA, P.; SHAABAN, K.A.; JHA, A.K.; THORSON, J.S.; ROHR, J.; GLIENKE, C. Bioprospecting of *Diaporthe terebinthifolii* LGMF907 for antimicrobial compounds. **Folia Microbiologica**, v.63, n.4, p.499-505, 2018.

Meyer, M.C.; Campos, H.D.; Godoy, C.V.; Utimada, C.M. **Ensaio cooperativo de controle químico de mofo-branco na cultura da soja** Londrina: Embrapa, 2014. p. 100.  
MEYER, V.; STAHL, U. The influence of co-cultivation on expression of the antifungal protein in *Aspergillus giganteus*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, n.1, p. 68 -74, 2003.

MIGLIORINI, P. DORNELES, R. K.; RODRIGUES, F.G.; PAULA, G.; TUNES, M. V. L.; Métodos de inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijão e danos em plântulas. **Biotemas**, v. 30, n. 1, p. 37-43, 2017.

MIGLIORINI, P.; RODRIGUES, G. F.; CHAGAS, H. L.; OLIVEIRA, S.; RAIMUNDA, N.; TUNES, L. V. M. Métodos de inoculação de *sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão. **Enciclopédia Biosfera**, v. 13, n. 23 p. 794-801, 2016.

MORANDI, M.A.B.; BETTIOL W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B.; **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Embrapa Meio Ambiente, p. 341, 2009.

MOSTACERO, N.R.; CASTELLI, M. V.; BAROLO, M. I.; AMIGOT, S.L.; FULGUEIRA, C.L.; LÓPEZ, S.N. Fungal endophytes in *Peperomia obtusifolia* and their potential as inhibitors of chickpea fungal pathogens. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, p. 14-37, 2021.

MOTA, J. M., MELO, M. P., GARCÍA, M. F. M.; SOUSA, E. S.; SOUSA, E. M. J.; Barguil, B. M.; Beserra Jr, J. E. A. Transmissão de *Colletotrichum truncatum* e *Macrophomina phaseolina* por sementes de feijão-fava. **Summa Phytopathologica**, v. 45, n. 1, p. 33-37, 2019.

MUELLER, D. S.; DORRANCE, A.E.; DERKSEN, R.C; OZKAN, E.; KURLE, J.E.; GRAU, C.R; GASKA, J. M.; HARTMAN G. L.; BRADLEY, C.A.; PEDERSEN, W.L. Efficacy of fungicides on *Sclerotinia sclerotiorum* and their potential for control of *Sclerotinia* stem rot on soybean. **Plant Disease**, v. 86, p. 26-31, 2002.

MÜLLER, M.A.; MIORANZA, T.; STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; BATTISTUS, A.; ISTSCHUK, A.; FUCHS, F.; Toxicidade *in vitro* e controle de *Meloidogyne incognita* em soja por extrato de alecrim. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, n.1, p.103-110, 2016.

MUSSI-DIAS, V.; ARAÚJO, A. C. O.; SILVEIRA, S. F.; ROCABADO, J. M. A.; ARAÚJO, K. L.; Fungos endofíticos associados a plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n.2, p. 261-266, 2012.

MYCOBANK. Disponível em: <<http://www.mycobank.org/>>. Acesso em: 07 jan. 2022.

NAVA, F. F. M. **Controle de fitopatógenos por fungos endofíticos de aroeira: ação de um isolado de *Diaporthe* sobre *Fusarium graminearum***. 2020. 98 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, 2020.

NORILER, S.A.; SAVI, D.C.; ALUÍZIO, R.; PALÁCIO-CORTES, A.M.; POSSIEDE, Y.M.; GLIENKE, C. Bioprospecting and structure of fungal endophyte communities found in the Brazilian Biomes, Pantanal, and Cerrado. **Frontiers in Microbiology**, v.9, 2018.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2008.

ORDOÑEZ, L. M. I. **Eficiência de óleos essenciais para o controle de *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *cepae* em sementes de cebola e seu efeito na qualidade fisiológica**. 2016. 86 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2016.

OROLE, O.O.; ADEJUMO T.O.; Bacterial and fungal endophytes associated with grains and roots of maize. **Journal of Ecology and The Natural Environment**. v.3, p. 298-303, 2011.

OWNLEY, B.H.; GWIN, K.D, VEGA F.E.; Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. **BioControl**, v. 55, p. 113–128, 2010.

PENG, X.; SUN, F.; WANG, C.; ZHANG, Y.; WU, Y. Z.; ZHANG, C.; SUN, Y.; W, S.; ZHANG Y.; ZONG, H.; GUO, R.; LOU, H.; New xanthonones with antiagricultural fungal pathogen activities from the endophytic fungus *Diaporthe goulteri* L17. **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 69, n.38, p.216-224, 2021.

PEREIRA, C. E.; OLIVEIRA, J. A.; ROSA, M. C. M.; OLIVEIRA, G. E.; COSTA NETO, J. Tratamento fungicida de sementes de soja inoculadas com *Colletotrichum truncatum*. **Ciência Rural**, v. 39, n. 9, p. 2390-2395, 2009.

PERES, N. A. R.; SOUZA, N.L.; PEEVER, T. L.; TIMMER, L.W.; Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. **Plant disease**, v.88, n.2, p. 125-130, 2004.

PESQUEIRA, A. S.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L. Fungicide association in the control of anthracnose in the soybean in Mato Grosso do Sul. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 47, n. 1, p. 203-212, 2016.

PETERS, LP, PRADO, LS, SILVA, FIN, SOUZA, FSC, E CARVALHO, CM; Seleção de endófitos como antagonistas de *Colletotrichum gloeosporioides* em açaizeiro. **Biological Control**, v.150, 2020.

PRETO, G.; MARTINS, F.; PEREIRA, J. A.; BAPTISTA, P. Fungal community in olive fruits of cultivars with different susceptibilities to anthracnose and selection of isolates to be used as biocontrol agents. **Biological Control**, n. 110, p. 1-9, 2017.

QUIROGA, E.N.; SAMPIETRO, A.R.; VATTUONE, M.A. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.74, p.89–96, 2001.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2019.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. 2019.

RAI, M.; AGARKAR, G. Plant-fungal interactions: what triggers the fungi to switch among lifestyles? **Critical reviews in Microbiology**, v. 42. n.3, p. 428-438, 2016.

RAMDIAL, H.; ABREU, K.; RAMPERSAD, S. N. Fungicide sensitivity among isolates of *Colletotrichum truncatum* and *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex infecting bell in trinidad. **Plant Pathology**, v.33, n.2, p. 118-124, 2017.

REIS, E. M.; REIS, A. C.; CARMONA, M. A. **Manual de Fungicidas: guia para o controle químico de doenças de plantas**. 6 ed. Passo Fundo: Ed. Universidade de Passo Fundo, 2010.

REIS, G. F.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L.; HIRATA, L. M.; PONTIM, B. C. A. Viabilidade de armazenamento de sementes de soja inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* em meio com restrição hídrica. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 2, p. 168-173, 2014.

RIBEIRO, A.S.; POLONIO, J.C.; COSTA, A.T.; SANTOS, C.M.; RHODEN, S.A.; AZEVEDO, J.L.; PAMPFILE, J.A. Bioprospection of culturable endophytic fungi associated with the ornamental plant *Pachystachys lutea*. **Current Microbiology**, v.75, p.588–596, 2018.

ROCHA, R.; LUZ, D. E.; ENGELS, C.; PILEGGI, S. A. V. JACCOUD, D.S.; MATIELLO, R. PILEGGI, M. Selection of endophytic fungi from comfrey (*Symphytum officinale* L.) for *in vitro* biological control of the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.). **Brazilian Journal Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 73-78, 2009.

RODRIGUEZ, R. J.; WHITE, J. F.; W, ARNOLD, A.E.; REDMAN, R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, v.182, n. 2, p. 314- 330, 2009.

ROGÉRIO, F.; CAMPI-GUILLARDI, M.; BARBIERI, M. C. G.; BRAGANÇA, C. A. D.; SEIXAS, C. D. S.; ALMEIDA, A. M. R.; MASSOLA, J, N.S. Phylogeny and variability of *Colletotrichum truncatum* associated with soybean anthracnose in Brazil. **Journal of Applied microbiology**, v. 122, n.2, p. 402-415, 2017.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S.H.; HELANDER, M.; SULIVAN, T.J. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.29, p.319-343, 1998.

SANTOS, P. J.; SAVI D. C.; GOMES, R. R.; GOULIN, E. H.; SENKIV, C. C.; TANAKA, F. A.; ALMEIDA, A. M.; GALLI- TERASAWA, L.; KAVA, V.; GLIENKE, C. *Diaporthe endophytica* and *D. terebinthifolii* from medicinal plants for biological control of *Phyllosticta citricarpa*. **Microbial Research**, v.186-187, p.153- 160, 2016.

SAVI, D.C.; ALUIZIO, R.; GLIENKE, C. Brazilian plants: An unexplored source of endophytes as producers of active metabolites. **Planta medica**, v.85, n.8, p.619-636, 2019.

SCHWARTZ, H. F.; HARVESON, R. M.; STEADMAN, J. R. **White mold of dry beans**. Published by University of Nebraska-Lincoln Extension, Institute of Agriculture and Natural Resources, 2012.

SELOSSE, M. A.; BAUDOIN, E.; VANDENKOORNHUYSE, P. Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. **Comptes Rendus Biologies**, v. 327, p. 639-648, 2004.

SILVA, D. D. de; CROUS, P.W.; ADES, P. K.; TAYLOR, P. W. J. Life styles of Coleletotrichum species and implications for plant biosecurity. **Fungal Biology Reviews**, v. 31, n.3, p. 155-168, 2017

SILVER, L.L. Natural products as a source of drug leads to overcome drug resistance. **Future Microbiology**, v.10, n.11, p.1711-1718, 2015.

SOUZA, A.E.F.; ARAÚJO, E.; NASCIMENTO, L.C.; Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, n.6, p. 465-471, 2007.

SRIVASTAVA, N.; SINGH, A.; KUMARI, P.; NISHAD, J. H.; GAUTAM, V. S.; YADAV, M.; BHARTI, R.; KUMAR, D.; KHARWAR, R. N.; Advances in extraction technologies: isolation and purification of bioactive compounds from biological materials. **Compostos bioativos naturais**. Capítulo 21. P. 409 – 433, 2021.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.67, n.4, p.491-502, 2003.

TONIAL, F. **Atividade antimicrobiana de endófitos e extratos foliares de *Schinus terebinthifolius Raddi* (Aroeira)**. 2010. 141f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

TONIAL, F.; MAIA, B.H.L.N.S.; SOBOTTKA, A.M.; SAVI, D.C.; VICENTE, V.A.; GOMES, R.R.; GLIENKE, C. Biological activity of *Diaporthe terebinthifolli* extracts against *Phyllosticta citricarpa*. **FEMS Microbiology Letters**, v.364, n.5, 2017.

VEJA, F.E.; SIMPKINS, A.; AIME, M.C.; POSADA, F.; PETERSON, S.W.; REHNER, S.A.; INFANTE, F.; CASTILLO, A.; ARNOLD, A.E.; Fungal endophyte diversity in coffee 52 plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico. **Fungal Ecology**, n. 3, p. 122-138, 2010.

VENTUROSOS, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L.; VENTUROSOS, L. A. C.; PONTIM, B. C. A.; REIS, G. F. Inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de oleaginosas: transmissão e seus efeitos sobre a emergência de plantas. **Ciência Rural**, v. 45, n.5, p. 788-793, 2015.

VINAYARANI, G.; PRAKASH, H.S. Fungal endophytes of turmeric (*Curcuma longa* L.) and their biocontrol potential against pathogens *Pythium aphanidermatum* and *Rhizoctonia solani*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.34, n.49, p.9-17, 2018.

WEDGE, D. E.; SMITH, B. J.; QUEBEDEAUX, J. P.; CONSTANTIN, R. J. Fungicide management strategies for control of strawberry fruit rot diseases in Louisiana and Mississippi. **Crop Protection**, v.26, n.9, p. 1449-1458, 2007.

WILBUR, J.; MCCAGHEY, M.; KABBAGE, M.; SMITH, D. L. Na overview of the *Sclerotinia sclerotiorum* pathosystem in soybean: Impact fungal biology, and current management strategies. **Tropical Plant Pathology**, v. 44, n.1, p. 3-11, 2019.

WONG, F. P.; MINDLAND, S. L.; Sensitivity distributions of California populations of *Colletotrichum cereale* to the DMI fungicides propiconazole, myclobutanil, tebuconazole, and triadimefon. **Plant Disease**, v. 91, n.12, p. 1547-1555, 2007.

YAN, D.H.; SONG, X.; LI, H.; LUO, T.; DOU, G.; STROBEL, G. Antifungal activities of volatile secondary metabolites of four *Diaporthe* strains isolated from *Catharanthus roseus*. **Journal of Fungi**, v.65, n.4, 2018.

YANG, H.C.; HARTMAN, G.L. Anthracnose. In: HARTMAN, G. L.; RUPE, J.C.; SIKORA, E. J.; DOMIER, L.L.; DAVIS, J.A.; STEFFEY, K.L. **Compendium of Soybean Diseases and Pests**. 5 ed. St. Paul: APS Press, 2016.

YEDIDIA, I.; BENHAMOU, N.; KAPULNIK, Y.; CHET, I. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite

*Trichoderma harzianum* strain T-203. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.38, p.863-873, 2000.

YORINORI, J. T., HENNING, A. A. Doenças da soja. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 4.ed. São Paulo: Ceres. 2005. v. 2. p.165-180.

YU, H.; ZHANG, L.; LI, L.; ZHENG, C.; GUO, L.; LI, W.; QIN, L.; Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. **Microbiological research**, v. 165, n.6, p. 437-449, 2010.

ZANG LE, Y.; WEI, W.; GUO, Y.; WANG, T.; JIAO, R. H. Sesquiterpenoids from the mangrove-derived endophytic fungus *Diaporthe* sp. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 10, p. 1744-1749, 2012.

ZUBRICK, J. W. **Manual de Sobrevivência no Laboratório de Química Orgânica: guia de técnicas para o aluno**. 9. ed. Rio de Janeiro, RJ: LTC, 2016.



## **PPGAgro**

Programa de Pós-Graduação em Agronomia  
**Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - FAMV**