UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE DO PARANÁ

***CAMPUS* LUIZ MENEGHEL**

MESTRADO EM AGRONOMIA

NIXAU WAUTERS MACEDO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE *Talaromyces funiculosus* NO BIOCONTROLE DA FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA

BANDEIRANTES, PR, BRASIL

2022

NIXAU WAUTERS MACEDO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE *Talaromyces funiculosus* NO BIOCONTROLE DA FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA

Trabalho de qualificação apresentadoao Programa de Mestrado em Agronomia, da Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus* - Luiz Meneghel.

Orientadora: Profª Drª Mayra da Costa C. G. de Carvalho

BANDEIRANTES, PR, BRASIL

2022

NIXAU WAUTERS MACEDO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE *Talaromyces funiculosus* NO BIOCONTROLE DA FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA

Trabalho de qualificação apresentadoao Programa de Mestrado em Agronomia, da Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus* - Luiz Meneghel.

COMISSÃO EXAMINADORA

ProfªDrª Mayra da Costa Cruz Gallo de Carvalho

Prof.ºDr.º Leopoldo Sussumu Matsumoto

Prof.ºDr.º Admilton Gonçalves de Oliveira Júnior

BANDEIRANTES, PR, BRASIL

2022

Ficha catalográfica elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UENP

Wa

Wauters Macedo, Nixau
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE Talaromyces funiculosus NO BIOCONTROLE DA FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA / Nixau Wauters Macedo; orientador Mayra da Costa Cruz Gallo de Carvalho - Bandeirantes, 2022.
88 p. :il.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Agronomia) - Universidade Estadual do Norte do Paraná, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2022.

1. Biodefensivo. 2. Micoparasitismo. I. da Costa Cruz Gallo de Carvalho, Mayra, orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

À todos aqueles que, apesar das adversidades e falta de incentivo, se dedicam à ciência.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar minha mãe (Edna), meu “pai 2” (Dejair), minha avó (Cida Wauters) e meu tio Fer, por acreditarem, incentivarem e serem meus maiores exemplos de que o esforço leva ao sucesso. A existência de vocês me permite dizer que meus maiores ídolos são pessoas próximas. Ao meu pai (Benê), minha avó (Cida Macedo), minha “mãe 2” (Adriana) meus irmãos Otávio (Dodô), Yasmin, Raíssa, Thainã, Gustavo, Daniel, Isabela e Rebeca.

Às pessoas supra citadas, quero que saibam que minha ausência, consequência da distância (e cada vez mais distante), que por sua vez, é a consequência da luta pelos meus sonhos. Sonhos, estes, que não existiriam sem o amor que sinto por vocês, pois é de vocês que me lembro nos momentos de dificuldades e é de vocês que tiro forças para continuar lutando. A razão disso é que a cada conquista, por menor que seja, é com vocês que quero compartilhar, são vocês quem eu me preocupo em orgulhar!

À minha priminha/irmãzinha Victória (*in memoriam*) e meu avô Paulo Macedo (*in memoriam*), do qual escutei em meados da minha adolescência que sonhava em ter um neto engenheiro. Olha, vô, não sei se era agrônomo, mas não deixa de ser engenheiro (risos). Espero estar orgulhando vocês aí em cima.

Em se tratando do mestrado, às melhores biólogas do mundo, Talita e Sofia. Apesar dos incansáveis elogios e agradecimentos quero deixar aqui registrado que sem vocês NADA disso seria possível. Vocês são as verdadeiras mestres. Obrigado pela honra de poder chama-las de amigas. À professora Mayra por todo ensinamento e por ter aceitado o desafio de ser minha orientadora. Ao professor Leopoldo por compartilhar seu conhecimento e ter participação direta neste trabalho.

Eternamente à turma 86 (a melhor), pois esta, a partir da graduação, terá influência direta em cada etapa da minha vida. Em especial aos amigos Luís Fernando (Fer), Gabriel Ribeiro (Biel), Lucas Jaouiche (Sapo) e Vinicius Valadão por se fazerem presente nesta etapa de pós-graduação.

À família PRZ e FH (o termo família já explica tudo). Rafael Sbardella (Chumbada), Edinan (Pepino), Guilherme (Perdão), Rodrigo (Migorô), Pedro

(Grilo), Arthur Amarante, Lucas Hummel (Lucão), Lucas Bragante (meu músico favorito), Gabriel Prestes (Croc), Gabriel Rosato (Kibão), Junior Lopes (Junin Cabeça), Matheus (Pingo) e por último e não menos importante, VAI PALMEIRAS, Luiz Guilherme (Fadobrin) e Andrey (Purunga). Não tenham dúvidas de que foram essenciais no meu dia a dia; Obrigado por cada “tonteira” e por toda ajuda.

Aos melhores amigos de Bandeirantes Júlia Navarro, Letícia Menegueti, Amanda Falcão, Ana Beatriz Resende, Júlia Zanatta, Felipe Raimundo, Gustavo Oliveira, Lucas Ribeiro (Rattão), Thiago Matias, Maria Eduarda e Julia Silva. Os amigos das horas ruins, portanto, os amigos de verdade.

Aos professores Petrônio Porto, Laila Herta e Sandremir Carvalho. Os quais foram orientadores, mentores e amigos durante todo o período de graduação e pós-graduação. Levarei pra vida os ensinamentos de vocês.

À empresa LEAF agrociência por todo incentivo à ciência e parceria nesta pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

EPÍGRAFE

“*...Não faças do amanhã o sinônimo do nunca, nem o ontem te seja o mesmo que nunca mais.*

Teus passos ficaram.

Olhe para trás... mas vá em frente pois há muitos que precisam que chegues para poderem seguir-te.”

(*Charles Chaplin*)

MACEDO, Nixau Wauters. **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE *Talaromyces funiculosus* NO BIOCONTROLE DA FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA.** 2022. Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel, Bandeirantes, 2022.

RESUMO

A soja é uma das culturas mais plantadas e de maior importância econômica no mundo. Como a maioria das espécies cultivadas, o cultivo da soja enfrenta problemas fitossanitários, como as doenças, sendo a principal, a ferrugem asiática da soja (FAS), doença policíclica causada pelo fungo biotrófico *Phakopsora pachyrhizi*. O manejo químico e a adoção do vazio sanitário são as principais estratégias no combate à doença a campo. No entanto, desde a safra 2004/2005 a eficiência do uso de fungicidas no controle da FAS vem sendo drasticamente reduzida. Assim, o setor tem buscado pelo desenvolvimento de estratégias de controle biológico que possam somar às medidas de manejo adotadas no sentido de potencializá-las e ainda reduzir os impactos ambientais oriundos do massivo uso do controle químico. No presente trabalho, um isolado de *Talaromyces funiculosus* foi identificado e seu potencial de uso como agente de controle biológico da FAS foi observado em ensaios *in vitro* e a campo. A observação da interação entre *Talaromyces funiculosus* e *Phakopsora pachyrhizi* em MEV evidencia a ocorrência de micoparasitismo como um dos possíveis mecanismos de antagonismo. Além disso, o uso da solução de metabólitos secretados por *T. funiculosus*, livre do fungo, é igualmente capaz de reduzir a severidade da ferrugem. Em soma, os resultados obtidos indicam que o isolado identificado possui potencial para desenvolvimento de produto biológico e semioquímico para tratamento preventivo da ferrugem asiática da soja.

PALAVRAS CHAVES: *Phakopsora pachyrhizi,* antagonismo, micoparasitismo, controle biológico, semioquímico.

MACEDO, Nixau Wauters. **THE POTENCIAL USE OF *Talaromyces funiculosus* IN SOYBEAN RUST BIOCONTROL.** 2022. Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel, Bandeirantes, 2022.

ABSTRACT

Soybean is one of the most planted and economically important crops in the world. Like most cultivated species, soybean cultivation faces phytosanitary problems, such as diseases, the main one being soybean rust, a polycyclic disease caused by the biotrophic fungus *Phakopsora pachyrhizi*. Chemical management and the adoption of the sanitary vacuum are the main strategies to combat the disease in the field. However, since the 2004/2005 crop, the efficiency of fungicides in rust control has been drastically reduced. Thus, the sector has sought to develop biological control strategies that can add to the management measures adopted in order to enhance them and also reduce the environmental impacts arising from the massive use of chemical control. In the present work, an isolate of *Talaromyces funiculosus* was identified and its potential use as a biological control agent for soybean rust was observed in *in vitro* and field trials. The observation of the interaction between *Talaromyces funiculosus* and *Phakopsora pachyrhizi* in ESM shows the occurrence of mycoparasitism as one of the possible mechanisms of antagonism. Furthermore, the use of a solution of metabolites secreted by *T. funiculosus*, free from the fungus, is also capable of reducing rust severity. In sum, the results obtained here indicate that the identified isolate has potential for the development of a biological and semiochemical product for preventive management of soybean rust.

KEYWORDS: *Phakopsora pachyrhizi*, antagonism, mycoparasitism, biological control, semiochemical.

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 Morphological characters of *Talaromyces funiculosus* strain BCA1.1 72

Fig. 2 Combined phylogeny of BCA1.1 ITS and BenA sequences 73

Fig. 3 Phenotypic evaluation of rust control by *Tlaromyces funiculosus* strain BCA1.1.....75

Fig. 4 Electron microscope scanning of the mycoparasitic colonization of *P. parchyrizhi* urediniospores by *Talaromyces funiculosus* strain BCA1.1.....77

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13

2. REVISÃO DE LITERATURA 15

2.1 A Cultura da Soja 15

2.2 Principais Doenças da Soja 16

2.2.1 Ferrugem asiática da soja 19

2.3 Manejo da Soja contra Ferrugem Asiática da Soja 22

2.3.1 Manejo biológico 25

2.4 Interação de *Talaromyces* sp. com patógenos de plantas 28

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 31

3. CAPÍTULO 1 41

3.1 Introdução 41

3.2 Estado da arte 43

3.2.1 Proteção de plantas - Histórico 43

3.2.2 Controle biológico – Histórico e conceitos 46

3.2.3 Desafios para alcançar o mercado – Da prospecção a prateleira 51

3.2.4 Considerações finais e Perspectivas Futuras 56

REFERÊNCIAS 59

4. CAPÍTULO 2 64

4.1 ABSTRACT 64

4.2 Introduction 65

4.3 Material and Methods 67

4.3.1 Microorganisms 67

4.3.2 Morphological characteristics of BCA1.1 67

4.3.3 Molecular identification of BCA1.1 67

4.3.2 Evaluating rust control by BCA1.1 68

4.3.3 P. pachyrhizi spore germination inhibition assay 68

4.3.4 BCA1.1 rust control on soybean detached leaves 69
4.3.5 Rust control in soybean plants treated with BCA1.1 70
4.3.6 Ultrastructure of the interaction BCA1.1 and *P. pachyrhizi* 70
4.3.7 Statistical Analysis 71
4.4 Results 71
4.4.2 BCA1.1 Morphological and Molecular Characterization 71
4.4.3 Evaluating rust control by BCA1.1 75
4.4.4 BCA1.1 rust control on soybean detached leaves 76
4.4.5 Rust control in soybean plants treated with BCA1.1 77
4.4.6 Ultrastructure of the interaction BCA1.1 and P. pachyrhizi 77
4.5 Discussion 78
REFERENCES.....82

1. INTRODUÇÃO

A cultura da soja (*Glycine max* [L.] Merril) é originária do leste da China e foi oficialmente introduzida no Brasil em 1914, no estado do Rio Grande do Sul, onde as características climáticas são mais parecidas com a região de origem da cultura (SEDIYAMA et al., 2015). Atualmente, a espécie é uma das mais cultivadas e importantes para economia do Brasil, o qual, na safra 2020/21, produziu 135,9 milhões de toneladas do grão (CONAB, 2021).

Entretanto, como a maioria das espécies cultivadas, a cultura da soja enfrenta problemas fitossanitários, entre eles, as doenças, que anualmente levam os produtores a perderem 15 a 20% da safra (JUHÁSZ et al., 2013; HENNING, 2009). A ferrugem asiática da soja (FAS), agente causal *Phakopsora pachyrhizi*, é considerada a principal doença da cultura, atingindo todas lavouras onde a soja é cultivada e podendo causar até a perda total da safra (YORINORI e al., 2004; GODOY et al., 2014; GODOY et al., 2018 *apud* YORINORI et al., 2005; HARTMAN et al., 2015).

Quando o patógeno se instalou no país, o manejo químico da doença se mostrou eficaz no controle da mesma. Entretanto, a pressão de seleção causada pela extensa área de monocultivo, o uso sequencial de ingredientes ativos dos fungicidas, juntamente com a alta capacidade do fungo de se multiplicar, logo fizeram com que os fungicidas sintéticos perdessem a eficácia no controle (ITO, 2013; GODOY, 2018). Sendo assim, para que haja controle satisfatório do patógeno, estratégias como vazio sanitário (EMBRAPA SOJA, 2019), uso de cultivares resistentes (MAGNANI; ARAÚJO, 2007), somados às aplicações de fungicidas rotacionados são adotadas num manejo integrado da doença.

Além das questões relacionadas a queda na eficiência de controle da ferrugem, o uso massivo dos defensivos agrícolas vem causando problemas ambientais e trazendo preocupações para a saúde humana (BETTIOL e MORANDI, 2009). Nesse sentido, pesquisas que buscam evidenciar agentes biológicos para o controle de doenças e o desenvolvimento de produtos biológicos vem sendo desenvolvidas com o objetivo de maior de diminuir o uso dos defensivos químicos e aumentar o repertório de estratégias de controle dos agente fitossanitários (PARRA et al., 2012; LUZ et al., 2019; ZENY, 2019).

A principal linha de desenvolvimento de produtos biológicos para o controle de fitopatógenos é composta por produtos microbiológicos, ou seja, produtos que em sua formulação levam o agente biológico vivo. Entre os produtos disponíveis no mercado para esse fim, a maior parte corresponde por produtos derivados da bactéria Bacillus e do fungo Trichoderma. No Brasil, líder mundial no mercado de biológicos, 14 fungicidas microbiológicos são hoje disponíveis, dos quais, 9 são feitos a partir de Trichoderma, associados ou não com alguma espécie de Bacillus, que por sua vez, compõe 5 dos 14 biofungicidas citados.

Recentemente foi observado durante ensaios conduzidos em folhas destacadas de soja inoculadas com ferrugem, um fungo que crescia sobre as lesões de ferrugem, a cobrir as mesmas, dificultando a dispersão dos esporos de *P. pachyrhizi*. Esse fungo contaminante foi isolado a partir das lesões de ferrugem e incialmente identificado como *Penicillium* sp. devido as suas características macroscópicas (dados não publicados; informação verbal de CARRETS). Ensaios posteriores *in vitro* e *in vivo* mostraram seu potencial como agente de biocontrole da FAS (ZENY, 2019; BR1020200153234). No entanto, considerando a ampla diversidade de características relacionadas a taxonomia do gênero, o presente trabalho teve por objetivo inicial a identificação polifásica do isolado, associando a identificação morfológica a molecular. Além disso, os estudos preliminares não revelam informações sobre a interação de antagonismo o que pretendeu-se alcançar no presente, evidenciando-se a ocorrência de micoparasitismo. Por fim, os resultados apresentados nesse trabalho indicam a possibilidade de uso do agente biológico tanto para o desenvolvimento de produto microbiológico quanto semioquímico abrindo novas linhas de pesquisa e perspectivas para o manejo da FAS.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Cultura da Soja

Há controversas sobre a evolução genética da atual espécie de soja (*Glycine max* [L.] Merril) cultivada e o local exato do início de sua domesticação, mas há evidências de que seu cultivo teve início na região da Manchúria, leste da China (HYMOWITZ, 1970; BACAXIXI et al., 2011; SEDIYAMA et al.,2015). No Brasil, a produção da leguminosa em escala comercial teve início na década de 70, no Rio Grande do Sul, devido às características das condições climáticas serem parecidas com as do sul dos EUA, região da qual fora trazido o material aqui testado. O baixo custo relativo de produção e a qualidade da proteína, acarretaram no aumento da demanda de seus produtos, principalmente proteína e óleo. Estes fatores, juntamente com programas de melhoramento que permitiram a obtenção de cultivares de alto rendimento adaptadas às diferentes regiões do Brasil, logo fizeram com que o cultivo da soja se difundisse por todo o país (PRIOLLI et al., 2004; PRIOLLI et al., 2011; SEDIYAMA et al., 2015; OLIVEIRA; FERREIRA, 2020).

No ano-safra 2020/21 foram produzidas 135,9 milhões de toneladas de soja em território nacional, números que tornam o país o maior produtor mundial do grão, seguido dos Estados Unidos com 112,549 milhões de toneladas. Em 2021 estima-se que o consumo interno do grão tenha sido de 46,5 milhões de toneladas, enquanto a exportação em grãos, farelo e óleo, 86,108, 17,210 e 1,651milhões de toneladas, respectivamente, tendo movimentado com a exportação o total de 35,232 bilhões de dólares (CONAB, 2021; USDA, 2022; ABIOVE, 2021). O grande interesse comercial sobre o grão é facilmente explicado e compreendido pelos teores de lipídeos e proteínas que o mesmo apresenta, sendo matéria prima fundamental na produção de ração animal, óleo vegetal, biodiesel, lubrificante, alimentos humanos e outros (OLIVEIRA; FERREIRA, 2020; AMAZONAS, 2019; SEDIYAMA et al., 2015).

A importância econômica que a leguminosa adquiriu levou à inúmeras pesquisas envolvendo universidades, instituições e empresas, visando a otimização do cultivo e aumento da produtividade. Isto se deve ao fato de que, apesar dos dados de produção, e de que contarmos com um bom manejo físico e

de fertilidade do solo, a cultura da soja enfrenta várias adversidades que podem comprometer sua produção, como fatores climáticos, insetos-pragas e doenças.

2.2 Principais Doenças da Soja

Entre os principais fatores limitantes para a produção da soja, estão as doenças, que podem ser causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus. Já foram identificadas no mundo mais de 100 doenças para a cultura da soja, das quais, 45 atingem as lavouras brasileiras, sendo 32 causadas por fungos, 3 por bactérias, 4 por vírus e 6 por nematoides (EMBRAPA, 2011). Apesar dos recursos de manejo e estratégias de prevenção disponíveis, problemas como erros na aplicação dos fungicidas, cepas de patógenos resistentes e monitoramento indevido, levam os produtores à perderem 15 a 20% da sua safra para os agentes fitopatogênicos (JUHÁSZ et al., 2013; HENNING, 2009).

Das principais doenças da soja, algumas podem ocorrer em qualquer fase do ciclo da cultura, como a ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*), antracnose (*Colletotrichum truncatum*) e míldio (*Peronospora manshurica*). Já outras, ocorrem apenas em determinadas fases, como as doenças de final de ciclo (DFCs), principalmente mancha-púrpura e septoriose (EMBRAPA, 2011; HENNING, 2009; SEDIYAMA et al., 2015).

A ocorrência de doenças em plantas pode começar antes mesmo da germinação, pelo fato de alguns agentes fitopatogênicos serem transmitidos via sementes, se alojarem no solo ou em restos culturais. Em razão dos níveis de patogenicidade e frequência da ocorrência, os fungos *Phomopsis sojae* (podridão seca), *Colletotrichum truncatum* (antracnose), *Fusarium semitectum* e *pallidoroseum* (fusariose), e *Aspergillus flavus* (podridão das sementes) são considerados os principais agentes transmitidos via semente, podendo causar complicações já nos períodos de germinação e emergência (GOULART, 2018; HENNING, 2009; ITO, 2013).

Alguns dos fungos manifestam seus sintomas de forma tardia, como *Corynespora cassiicola* (mancha alvo), *Colletotrichum truncatum* (antracnose) e *Cercospora kikuchiii* (mancha-purpura). Já os principais fungos de solo, são *Phythophtora sojae* (podridão radicular), *Macrophomina phaseolina* (podridão

cinzenta) e *Sclerotinia sclerotiorum* (mofo branco), podendo atacar a planta em qualquer fase do ciclo (GOULART, 2018; HENNING, 2009; ITO, 2013).

As doenças bacterianas com maiores níveis de patogenicidade como crestamento bacteriano (*Pseudomonas savastanoi*), fogo selvagem (*Pseudomonas syringae*) e pústula bacteriana (*Xanthomonas axonopodis*) atacam a parte aérea, com os sintomas aparecendo normalmente nas folhas. Entretanto, a maioria das cultivares usadas hoje em dia apresentam resistência aos respectivos patógenos (ITO, 2013).

Nematoides são microrganismos vermiformes, de corpo não segmentado e coloração normalmente transparente, não possuindo órgão locomotores. Estes microrganismos habitam o solo e se locomovem poucos centímetros durante seu ciclo. Sua dispersão para novas áreas pode ocorrer por água, transplantio de mudas, implementos e sementes contaminadas. Os nematoides penetram nas plantas perfurando as raízes e podem se locomover para outros órgãos, sendo suas lesões porta de entrada para outros patógenos e ainda podendo ser vetores de outros. Os principais nematoides para cultura da soja são as espécies *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne incógnita*, *Heterodera glycines*, *Rotylenchulus reniformis* e *Pratylenchus brachyurus*. De modo geral, os sintomas na lavoura se manifestam em reboleiras, apresentando subdesenvolvimento das plantas naquela área afetada, podendo apresentar amarelecimento das folhas e abortamento de vagens no estágio reprodutivo. Os sintomas se tornam mais específicos ao serem analisadas as raízes das plantas, apresentando formação de galhas (*Meloidogyne* sp.), cistos (*H. glycines*), necrose das raízes (*P. brachyurus*) e até mesmo ausência de sintomas radiculares (*R. reniformis*). (FAVORETO et al., 2019; SILVA et al., 2018; HENNING et al., 2014; GRIGOLLI; ASMUS, 2014; RITZINGER, 2013).

As principais viroses da cultura da soja são o mosqueado do feijão (*Bean Pod Mottle Virus*), mosaico comum da soja (*Soybean Mosaic Virus*), necrose da haste (*Cowpea Mild Mottle Virus*), queima do broto (*Tobacco Streak Virus*) e mosaico cálico (*Alfalfa Mosaico Virus*). As formas de transmissão das viroses são por sementes infectadas e insetos vetores, como pulgões, mosca branca e tripes. Algumas viroses podem causar redução na germinação da semente, na fixação

de nitrogênio, no tamanho, número e peso dos grãos, abortamento de flores, redução no pegamento de vagens e deformação das vagens, podendo acarretar em perdas de mais de 90% da lavoura (BRIZOLA et al., 2015; HENNING et al., 2014).

De um modo geral, as estratégias propostas pelo Manejo Integrado de Doenças (MID) funcionam para evitar a perda de produtividade causada pelos fitopatógenos (PERES et al., 2021). O MID consiste na combinação de estratégias para controle e prevenção de doenças na lavoura, englobando práticas de controle genético, cultural, biológico e químico (SILVA, 2019; LUCAS et al., 2018; CORREIA et al., 2014). De forma geral, a análise de acidez do solo deve ser realizado para, caso necessário, seja feita a correção do pH e a planta aproveite os nutrientes de forma mais efetiva. Além disso o uso de sementes idôneas é essencial para que não seja semeada lavoura já contaminada, além de, serem respeitados cultivares e época recomendadas para região, de forma que a planta consiga expressar seu potencial genético.

O controle cultural consiste em favorecer o hospedeiro em relação ao patógeno, contando com práticas como vazio sanitário, épocas e densidade de semeadura. Para cultura da Soja se inicia com o vazio sanitário, que objetiva reduzir a fonte de inóculo da Ferrugem Asiática da Soja na entressafra, retardando possíveis epidemias da doença.

É importante destacar que está na escolha da cultivar a oportunidade de exercer o controle genético, optando por aquelas que apresentem resistência ou maiores tolerâncias à maioria dos patógenos (GABARDO, 2018; GODOY, 2019; ITO, 2013).

O tratamento das sementes com fungicidas ajuda a prevenir a contaminação pelos fungos de solo, tendo efeito residual, para caso a contaminação ocorra, a planta já esteja estabelecida e manifeste resposta de defesa. Já o tratamento de sementes com inseticidas como Abamectina, Imidacloprido e Tiodicarbe apresentam efeito supressor de algumas espécies de nematoides (GRIGOLLI; ASMUS, 2014). Já o controle químico da lavoura é fundamentado no uso de fungicidas, que devem ser aplicados de acordo com recomendação para o patógeno em questão, respeitando o limiar de dano

econômico. Alternativamente ao controle químico ou de forma integrada ao mesmo, é possível o uso de estratégias de controle biológico para limitar a ação dos fitopatógenos e reduzir sua disseminação.

A maioria dos agentes patogênicos possuem suas especificidades climáticas, não ocorrendo simultaneamente em todas regiões agrícolas, permitindo com que estratégias de manejo sejam definidas de acordo com o problema pontual (HENNING, 2009; ITO, 2013; LUCAS et al., 2018; GABARDO, 2018). No entanto, é importante enfatizar que a rotação de cultura apresenta papel fundamental no manejo integrado, pois além de variar a espécie hospedeira na área, diminuindo fonte de inóculo e enriquecendo a microbiota do solo, algumas culturas como Crotalária, Sorgo, Mamona, Nabo forrageiro, Aveia preta entre outros, apresentam efeito supressor de nematoides (REIS et al., 2011; GRIGOLLI; ASMUS, 2014; ITO, 2013).

2.2.1 Ferrugem asiática da soja

O fungo *Phakopsora pachyrhizi*, agente causal da ferrugem asiática da soja, é originário da China. A primeira constatação da doença na América foi na cidade de Pirapó, no Paraguai, em Março de 2001. No Brasil ocorreu no estado do Paraná, no mês de maio de 2001, quando ainda se cultivava soja safrinha. Na safra 2001/2002 a doença já atingia cerca de 60% das lavouras de soja no Brasil, tendo sido constatada nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso, causando perdas de até 70% da produção em algumas lavouras, total estimado de 569,2 mil toneladas. Nas safras subsequentes as perdas estimadas foram de 3,3 e 4,6 milhões de toneladas, respectivamente, valor estimado na época em 2,06 bilhões de dólares, somando as três safras (ANDRADE; ANDRADE, 2002; YORINORI et al., 2004).

O nível de importância de uma doença se dá basicamente pela ocorrência e patogenicidade do agente causal (GOULART, 2018). Nesse sentido, a FAS é tida como a principal doença da cultura já que além de seu grande potencial de dano à produtividade, o patógeno pode ocorrer em qualquer fase do ciclo da cultura (SEDIYAMA et al., 2015). O agente causal da ferrugem asiática da soja pertence ao reino Fungi, filo dos Basidiomicetos, classe Urediniomycetes, ordem

Uredinales, família Phakopsoraceae, gênero *Phakopsora* e espécie *Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow e Sydow (ZAMBENEDETTI, 2005).

A reprodução do fungo na natureza ocorre de forma assexual (ANDERSON et al., 2008). Os uredosporos são facilmente disseminados pelo vento a longas distâncias. Uma vez em contato com a folha, o esporo germina em aproximadamente seis horas, se houver molhamento constante neste período, e temperaturas entre 15 e 28ºC (ITO, 2013; YORINORI et al., 2004; PERES et al., 2021). A principal via de penetração de *P. pachyrhizi* nas folhas de soja é através da penetração direta pelas junções das células da epiderme. Após germinação do esporo, desenvolve-se o tubo germinativo a partir do qual ocorre a formação do apressório, estrutura de fixação nas folhas. Esta estrutura se desenvolve nas junções das células devido à topografia foliar e flutuações de nutrientes neste microambiente e exerce de pressão no local facilitando a penetração da hifa (ARAÚJO; MATSUOKA, 2004). A penetração no hospedeiro ocorre entre 7 e 12 horas após o contato do esporo com a folha (MAGNANI et al., 2007). Após a formação do apressório, o fungo desenvolve hifas de penetração, que se ramificam, ocupando o espaço intercelular na epiderme e a célula mãe das estruturas de parasitismo intracelular, denominadas de haustórios. Os hautórios atravessam a parede celular hospedeira e desenvolvem-se no interior do citoplasma vegetal onde absorvem nutrientes e suprimem as respostas de defesa da planta (GOELLNER et al., 2010).

Esta série de eventos até a colonização do citoplasma do hospedeiro, pode levar de 24 a 48 horas após a inoculação do hospedeiro (SILVEIRA et al., 2015). Pouco é observado a penetração pela aberturas dos estômatos, e quando isso ocorre, não há a formação de apressórios, ocorrendo a invasão direta pelo tubo germinativo (MAGNANI; ARAÚJO, 2007). A partir do sexto dia após inoculação, já são observadas a produção de novos esporos, que pode durar por até 3 semanas (ZAMBENEDETTI, 2005; YORINORI et al., 2004; ITO, 2013; SILVEIRA et al., 2015).

Os primeiros sintomas podem ser confundidos com sintomas de crestamento bacteriano, pústula bacteriana e sintomas inicias de mancha parda. Caracterizam-se como pontuações pequenas de coloração verde acinzentada,

mais escuro que a coloração natural da folha, com uma protuberância, correspondendo a formação das estruturas de frutificação do fungo (urédias). Logo, essa protuberância cresce, tendendo à formatos angulares por respeitarem as delimitações das nervuras da folha. Progressivamente as urédias crescem, adquirindo coloração castanho clara a escura, até o rompimento da película, correspondendo à liberação dos uredosporos, iniciando assim, um novo ciclo de infecção. Em condições ideias, o fungo completa seu ciclo em torno de 7 a 10 dias (SILVEIRA et al., 2015), o que permite haver 16 ciclos da doença em uma cultivar precoce. A presença das urédias é a principal característica de distinção dos sintomas de FAS das doenças com sintomas semelhantes (NUNES, 2016; YORINORI et al., 2004; ITO, 2013).

O hospedeiro infectado apresenta queda prematura das folhas, com consequente perda da área fotossintética o que acarreta má formação das vagens e grãos. O fungo interfere no metabolismo da folha absorvendo o conteúdo celular do hospedeiro (ITO, 2013; YORINORI et al., 2004). Fiallos e Forcelini (2011) observaram relação entre a durabilidade dos folíolos de soja e o número de urédias do fungo por unidade de área indicando que quanto maior o número de urédias menor a durabilidade dos folíolos e consequentemente maiores são os danos.

O fungo apresenta grande variabilidade genética, o que o permite adaptar-se a hospedeiros resistentes. Yorinori et al. (2004) avaliando resistência de genótipos de soja percebeu que todas cultivares foram totalmente suscetíveis às estirpes de *P. pachyrhizi* disponíveis em 2003, sendo que, no ano anterior, todas haviam demonstrado níveis de tolerância e resistência. Tschurtschenthaler et al. (2012) relataram que as populações de *P. pachyrhizi* apresentavam diferenças genéticas nas 10 cidades onde o fungo foi coletado para análise. Akamatsu et al. (2013) e Rosa (2015), avaliaram a virulência de isolados de *P. pachyrhizi* coletados à campo em diferentes localidades e relataram diferentes níveis de patogenicidade dos isolados inoculados numa mesma cultivar, indicando variabilidade entre eles. Não à toa, cultivares lançadas como resistentes a ferrugem em uma safra, muito rapidamente mostram quebra de resistência em safras subsequentes.

2.3 Manejo da Soja contra Ferrugem Asiática da Soja

A ênfase para o manejo da ferrugem se deve ao fato da doença ser a principal para a cultura. Todavia, estratégias de manejo e prevenção focando a FAS ajudam no combate à outras doenças.

Um bom manejo do solo, levando em conta suas propriedades físicas, químicas e biológicas, significa um melhor ambiente para crescimento e realização das funções vitais das raízes. Esses cuidados proporcionam maior vigor às plantas, permitindo-as melhores respostas de resistência à colonização dos patógenos e menores danos causados pelos mesmos (ITO, 2013; COLLARES et al., 2006; RAGASSI et al., 2009; FREDDI et al., 2007). Balardin et al (2006) observaram menor severidade da ferrugem em plantas adubadas de acordo com a recomendação, em relação àquelas com quantidade reduzida ou ausência de adubo.

O vazio sanitário é uma medida que visa retardar a epidemia de ferrugem em lavouras de soja. Sendo *Phakopsora pachyrhizi* um fungo biotrófico, a ausência de plantas de soja na entressafra diminui a fonte de inóculo para o iníciodo cultivo, em razão disso, recomenda-se que a semeadura ocorra já no início do período permitido (ITO, 2013; GODOY et al., 2018). A medida instituída pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através de instrução normativa no ano de 2007, consiste em 60 dias com ausência total de plantas de soja em cultivo ou voluntárias (EMBRAPA SOJA, 2019).

Em associação ao vazio sanitário, a escolha da cultivar é essencial para obtenção de melhores respostas a doença. Apesar da ausência de genótipos de soja que apresentem resistência horizontal ou imunidade ao agente causal da ferrugem, a semeadura de cultivares com maiores níveis de resistência deve ser inclusa no manejo integrado da doença, além de, semeadura no início da janela de semeadura proporcionar à cultura menor fonte de inóculo. A associação destes fatores com cultivares de ciclo mais curto confere menor desenvolvimento do patógeno durante o ciclo da cultura, pelo fato da Ferrugem se tratar de uma doença policíclica (GODOY; MARCELINO-GUIMARÃES, 2016; ENGERS, 2019; OGOSHI et al., 2019).

São consideradas resistentes cultivares que apresentam lesões do tipo “reddish brown” (RB), ou seja, lesões de coloração marrom-avermelhada, causadas pela reação de hipersensibilidade a qual é caracterizada por matar as células infectadas com intuito de impedir o progresso da doença, permitindo pouca ou nenhuma esporulação do fungo, em função do(s) gene(s) de resistência que a planta apresenta (GODOY et al., 2017). O manejo genético da doença conta com sete genes de resistência já mapeados, denominados Rpp (Rpp1 a Rpp7). Estes genes são independentes, dominantes e alguns deles apresentam alelos recessivos. Cada um desses genes confere resistência vertical à doença, ou seja, à uma raça específica do patógeno (teoria gene-a-gene), o que permite que a resistência do hospedeiro seja facilmente quebrada devido à variabilidade que *P. pachyrhizi* apresenta. Sendo assim, os programas de melhoramento buscam acumular esses genes em um mesmo genótipo, por meio de técnicas de introgressão e piramidação, numa tentativa de conferir à cultivar maior resistência à doença (CATELLI, 2009; AKAMATSU et al., 2013; ROSA, 2015; GODOY; MARCELINO-GUIMARÃES, 2016; VIGANÓ et al., 2018; LANDIM, 2020; ANDERLI et al., 2021).

Entretanto, a nível comercial, esta realidade acaba se tornando mais complexa e restrita, uma vez que o lançamento de uma cultivar exige competitividade comercial em diversas características, incluindo produtividade, resistência às outras doenças e insetos-pragas, resistência à herbicidas, aliados ainda, à um preço de semente competitivo com as demais cultivares já disponíveis no mercado. Atualmente, há disponível no mercado cultivares com as tecnologias INOX® (TMG – Tropical Melhoramento e Genética) e SHIELD® (EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), que apresentam genes de resistência à ferrugem da soja (SEIXAS et al., 2018; BORNHOFEN, 2019; ZUFFO et al., 2021) mas que requerem aplicações de fungicidas para controle da doença.

A sucessão de culturas tende a aumentar a manifestação de um agente fitopatogênico já presente na área (GOULART, 2018). Sendo assim, a estratégia de rotacionar culturas no espaço tempo auxilia no combate ao patógeno da ferrugem (ITO, 2013; GODOY et al., 2018; HENNING, 2009). Entretanto, uma vez que *P. pachyzhizi* é capaz de completar o ciclo em 6 dias e seus esporos são

facilmente disseminados pelo vento esta estratégia deveria ser adotada emâmbito regional por produtores para aumentar sua eficiência.

No manejo integrado, o controle químico ainda é a principal ferramenta de combate, devendo ser empregado de maneira preventiva no início do período reprodutivo ou assim que constatados os primeiros sintomas. O número de aplicações está em função do início dos sintomas, reincidência da doença e custo/benefício do trato cultural (HENNING, 2009; ITO, 2013). Fungicidas de sítio especifico são aqueles cujo ingrediente ativo age em determinado ponto de uma via metabólica do patógeno, enquanto os multissítios agem em mais de uma, em função do número de ingredientes ativos, desde que seus mecanismos de ação sejam distintos (PERES et al., 2021). Os ingredientes ativos atualmente registrados e indicados para controle da FAS pertencem aos grupos químicos triazóis, benzimidazóis, estrubirulina, carboxamida, ditiocarbamatos, cloronitrila e grupo dos inorgânicos (ENGERS, 2019; EMBRAPA SOJA, 2021).

Ingredientes ativos do grupo das estrobilurinas atuam na mitocôndria, inibindo a transferência de elétrons entre os citocromos b e c1, impedindo a respiração e consequentemente a produção de ATP, bem como as carboxamidas, mas que, por sua vez, inibem a transferência de elétrons no complexo succinato-desidrogenase. Os triazóis causam a desorganização da estrutura celular, acumulando esteróis nas células fúngicas, que promovem a inativação da desmetilação do lanosterol, processo necessário para síntese do ergosterol, componente importante da parede celular fúngica. Os benzimidazóis atuam na mitose, mais especificamente na metáfase. Estes ingredientes ativos agem nas proteínas tubulinas, componentes das fibras do fuso, impedindo a divisão do material genético que resultará em uma célula sem função. O grupo ditiocarbamato e clorinitrila, de forma geral, impedem a produção de ATP, inibindo enzimas que atuam na glicólise, ciclo de Krebs e no catabolismo de aminoácidos e ácidos graxos em acetilcoenzima-A. O oxicloreto de cobre, representante do grupo inorgânico, age assim como as estrubilurinas e carboxamidas, bloqueando a respiração na mitocôndria, e ainda, os íons de cobre têm efeito físico nos esporos do fungo, causando lesões que os levam à desidratação (RODRIGUES, 2006; XAVIER, 2015; OLIVEIRA, 2019; ZORZZI, 2019).

Desde a safra 2003/2004 a Embrapa Soja através de programa de ensaios cooperativos vem testando a eficiência dos ingredientes ativos contra o patógeno. De forma geral, ao longo dos anos esses ingredientes utilizados de forma isolada apresentaram grande queda de eficiência, podendo variar de 30-80% dependendo da estratégia adotada (GODOY et al, 2021). Estas quedas se devem ao fato do patógeno se multiplicar de maneira rápida e em grande quantidade, permitindo que os mutantes resistentes aos ingredientes ativos logo se disseminem. Sendo assim, para que seja diminuída a pressão de seleção de resistência, aplicações sequenciais de fungicidas com mesmo mecanismo de ação, ou ainda, com único mecanismo de ação, devem ser evitadas (ITO, 2013; GODOY et al., 2018; ENGERS, 2019; PERES et al., 2021).

No ensaio cooperativo da safra 2020/2021, o fungicida com maior eficiência no manejo da doença contava com os ingredientes ativos mancozebe, picoxistrobina e tebuconazol pertencentes aos grupos ditiocarbamato, estrobirulina e triazol, respectivamente, tendo apresentado percentual médio de 81% de controle da doença e índice de severidade de 12,6%, enquanto os resultados para os mesmos ingredientes ativos testados de forma isolada foram 33,4% de severidade e 47% de controle para picoxistrobina e 35,2% de severidade e 44% de controle para tebuconazol, não tendo sido testado mancozebe (GODOY et al, 2021).

Levando em conta a inexistência de genótipo totalmente resistente, a perda de eficiência devido à pressão de seleção que os grupos químicos vem apresentando e a severidade da doença, todos métodos de controle e prevenção devem ser adotados, realizando o manejo integrado da ferrugem para que os danos sejam minimizados.

2.3.1 Manejo biológico

Parra et al (2002), define controle biológico como “um fenômeno natural que consiste na regulação de número de plantas e animais por inimigos naturais”.Já na área da fitopatologia, Bettiol (1991) definiu como “o controle de um microrganismo através de outro microrganismo”.

A ação antagonista de um microrganismo em relação à outro pode ocorrer de forma indireta, como por exemplo pela competição de recursos do ambiente (competição trófica), ou de forma direta, como por exemplo por parasitismo das hifas e esporos do outro fungo (micoparasitismo) e/ou produção de metabólitos tóxicos ao fungo patogênico (antibiose) (VAZ et al., 2012; BASTOS, 2009).

Desde a revolução verde, o uso indiscriminado de defensivos químicos vem sendo empregado nas lavouras mundiais (MATOS, 2010). Junto com as altas produtividades que as novas tecnologias conferiram às culturas, desempenhando controle eficiente de pragas e doenças, vieram os efeitos colaterais, como residuais nos produtos finais, contaminação do solo e água, intoxicação de trabalhadores rurais, pressão de seleção de resistência de patógenos e pragas, eliminação de microrganismos benéficos e insetos predadores dos insetos- pragas, entre outros. Desta forma, as preocupações com o meio ambiente, sustentabilidade e saúde humana, despertaram a necessidade de estudos visando formas alternativas de controle para uma agricultura sustentável (BETTIOL, 1991; BETTIOL; MORANDI, 2009).

Além de sua aplicabilidade como defensivos biológicos, os microrganismos são usados e estudados como potencializadores direto das espécies cultivadas. Estes microrganismos, também conhecidos como bioestimulantes ou promotores de crescimento, são capazes de sintetizar fitohormônios e disponibiliza-los para as plantas, como exemplo, *Bacillus subtilis* produtor de auxina em soja (CHAGAS JUNIOR et al., 2022), isolados de *Trichoderma* sp. em associação com *Bradyhizobium* promovendo maior crescimento aéreo e radicular para plantas de soja em relação à inoculação apenas com *Bradyhizobium* (JACQUES, 2021) e *Clonostachys* sp. promovendo maior volume de raiz, altura, número de vagens e grãos por plantas de soja (CASTRO, 2021). Estudos da simbiose de bactérias do gênero *Bradyhizobium* com leguminosas no Brasil, são datados de 1930, pelo Instituto Agronômico de Campinas (FREIRE; VERNETTI, 1997). Mattos (2017) relatou que plântulas de soja cujas sementes foram tratadas com *Bacillus* spp. tiveram velocidade de emergência mais acelerada e maior rendimento em grãos.

Outra abordagem de uso dos biológicos está no emprego de óleos essenciais no controle de doenças. Medicine et al (2007) usando óleos essenciais

de plantas de Eucalipto citridora, Citronela, Nim e Tomilho notou que os mesmos inviabilizaram 100% da germinação dos uredinósporos de *P. pachyrhizi* em ensaio *in vitro*. O mesmo autor mostrou que em plantas de soja em casa de vegetação, as eficiências do controle foram de 34 - 60% na cultivar Conquista e de 45 - 62% na cultivar Suprema, considerando que ambas cultivares são susceptíveis à doença (ALVES et al., 2007).

No entanto, a maior parte dos produtos biológicos comercializados até então são compostos pelos agentes vivos e são baseados na estratégia de promoção de crescimento da planta ou na sua defesa. Na segunda linha de ação destaca-se o gênero *Trichoderma*, que representa o microrganismo mais explorado como agente biológico de controle de doenças de plantas. Segundo Bhattacharjee e Dey (2014), dos 96 microrganismos relatados como agentes de controle biológico para fitopatógenos, 44 pertencem a este gênero. De forma análoga, dos 14 fungicidas microbiológicos registrados para uso nas lavouras do Brasil, 9 são compostos por *Trichoderma sp.*, sendo sete de *Trichoderma harzianum* e outros dois de *Trichoderma asperellum.* No mundo, mais de 60% dos fungicidas biológicos registrados são formulados a partir de espécies do gênero. *Trichoderma* é encontrado naturalmente no solo e tem potencial antagônico à um grande número de fitopatógenos foliares e de solo, como *Rizoctonia solani, Fusarium, oxysporum* e *Sclerotium rolfsii.* Os tipos de antagonismo que as espécies de *Trichoderma* são também variados podem apresentar incluir competição, parasitismo e antibiose (PAPAVIZAS, 1985; WOO et al. 2014; MOTLAGH; SAMIMI, 2013).

As bactérias também apresentam grande potencial como agentes de controle de fitopatógenos. Já explorado como agente entomopatogênico no manejo de insetos-praga, o gênero *Bacillus* apresenta também espécies produtoras de antibióticos e possivelmente substâncias voláteis capazes de inibir ouros microrganismos (KIM et al., 2003). Dos 14 fungicidas disponíveis no mercado brasileiro, relatados anteriormente, cinco contam com espécies de *Bacillus* em sua formulação, sendo estas, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtillis*, *B. velezensis* e *B. pumilus*.

2.4 Interação de *Talaromyces* sp. com patógenos de plantas

Diferenças filogenéticas de *biverticillium* em relação aos demais subgêneros são relatadas desde 1914, quando Wehmer observando o padrão dos conidióforos biverticilados criou um grupo informal para tais espécies, nomeando- o "Verticillatae". Entretanto, só após estudos posteriores de diversos autores foi criado o subgênero *biverticillium*. Em 1985, Malloch sugeriu que tais espécies deveriam compor um gênero separado de *Penicillium* devido às suas características ecológicas e morfológicas. Estudando as relações filogenéticas entre o gênero *Talaromyces* e espécies de *Penicillium* subgênero *biverticillium*, Samson et al (2011) notou que ambos grupos formavam um clado monofilético. Esta descoberta, junto com a mudança no código internacional de nomenclatura para algas, fungos e plantas, fez com que tais espécies fossem realocadas para o gênero *Talaromyces*, pois a nova regra dita que independente de forma sexual ou assexual, espécies filogenéticamente relacionadas devem receber a mesma nomenclatura (VISAGIE et al., 2014; BATISTA et al., 2019; BARRAL et al., 2020).

O gênero *Talaromyces* faz parte dos fungos filamentosos, caracterizado morfologicamente pelas colônias formadas por hifas finas e entrelaçadas, esporos de formatos predominante elipsoidais e conidióforos simetricamente biverticilados (LIMA, 2005). Baseado na filogenia feita a partir das regiões ITS β-tubulina e RPB2, o gênero foi dividido em sete seções, sendo estas, Bacillispori, Helici, Islandici, Purpurei, Subinflati, Talaromyces (contendo as espécies classificadas anteriormente como *Penicillium biverticillium*) e Trachyspermi, as quais abrigam 88 espécies já identificadas (YILMAZ et al., 2014). Membros do gênero são naturalmente encontrados no solo e tecidos vegetais em decomposição, apresentam capacidade de crescer em elevadas temperaturas e exige maiores níveis de umidade (RAMOS, 2018).

A família Trichocomaceae desempenha importante papel ecológico como decompositor e reciclador de matéria orgânica (OLIVEIRA; JESUS, 2015). Podem habitar os tecidos e a rizosfera das plantas, estabelecendo relações mutualísticas ou patogênicas (PALLU, 2010). No meio da agricultura a família já é conhecida devido à espécies do gênero *Penicillium* que atuam como agente causal de doenças, tais como *Penicillium digitatum* causando bolor verde dos citros

(KUPPER et al., 2013; MACHADO et al., 2018), *Penicillium* sp., podridões em pós colheita de maçãs (BOTELHO et al., 2010), *Penicillium italicum*, podridão azul dos citros (NASCIMENTO; ALVES, 2006), *Penicillium sclerotigenum*, podridão verde do inhame (OLIVEIRA et al., 2007), todas doenças de pós colheita, o que se explica pelo fato do gênero, bem como *Talaromyces*, ser considerado bom decompositor de celulose (CHALFOUN et al., 2005; RAMOS, 2018).

Espécies de *Talaromyces*, embora raras, já foram relatas como patógenos de seres humanos, tais como, *T. purpurogenus* e *T. amestolkiae* como agentes causais de doenças pulmonares e *T. marneffei* causando micose (BATISTA et al., 2019). Como característica de fungo decompositor, no meio agronômico, espécies do gênero são relatadas em pós colheita, como *T. flavus* em frutos de tomate (HOFFMANN, 2004), *T. funiculosus* e *T. purpureogenus* em abacaxi (ASSIS et al., 2019), *T. funiculosus* em sementes e grãos de milho (SANTIN, 2001) e 'declínio de pós colheita da uva', causada por *T. rugulosus* em frutas não beneficiadas (YANG et al., 2017). Todavia, espécies de *Talaromyces* atuando como fitopatógenos são muito pouco relatadas.

Outras espécies de *Talaromyces* não apresentam patogenicidade, podendo viver de forma mutualística com as plantas. Chalfoun et al (2005) relataram as espécies *T. variabilis* e *T. minioluteus* (ainda classificadas no artigo como Penicillium) vivendo na rizosfera de lavouras de café em cultivo orgânico, ressaltando que as mesmas não produzem toxinas de importância para esta espécie vegetal, além de, serem solubilizadoras de fosfato, podendo contribuir desta forma com a nutrição das plantas.

Especificidades de interação se fazem presentes entre microrganismos, não sendo diferentes para os fungos. Pallu (2010) avaliando a capacidade de inibição de fitopatógenos (*in vitro*) de 51 isolados de *Talaromyces* (até então todos classificados como *Penicillium*) formaram halo de inibição sobre os fitopatógenos avaliados, tais como, *Ceratocystis paradoxa* (podridão abacaxi da cana de açúcar) sendo inibido por isolado de *Talaromyces pinophilus*, *Colletotrichum acutatum* (podridão floral dos citros) sendo inibido por três isolados de *Talaromyces pinophilus* e um de *Talaromyces radicus*, além de, *Fusarium* verticillioides (podridão das raízes) inibido por nove isolados de *Talaromyces pinophilus*, três de

Talaromyces marneffei, dois de *Talaromyces trachyspermus*, um de *Talaromyces radicus* e *Talaromyces minioluteus*.

Outros autores também já relataram em testes *in vitro* o potencial uso de diferentes espécies de *Talaromyces* no controle de fitopatógenos, por exemplo, diferentes isolados de *T. purpurogenus* exercendo controle sobre *Rhizoctonia solani*, isolados de *T. flavus* e *funiculosus* sobre *R. solani* e *Fusarium oxysporum* (KAVASAKI, 2015), *T. thailandiasis* sobre *Colletotrichum capsici*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora palmivora* e *Lasiodiplodia theobromae*, *T. helicus*, *T. indigoticus*, *T. rotundus*, *T. wortmannii*, com potencial controle sobre *C. capsici*, *F. oxysporum* e *P. palmivora* (MANOCH; DETHOUP, 2011), *T. funiculosus* apresentando parasitismo sobre *Fusarium verticillioides* e *Aspergilus flavus* (CASTELLARI et al., 2021) e *T. flavus* sobre *F. oxysporum* e *Verticillium dahliae*, por sua vez, em tomates em casa de vegetação (BAHRAMIAN et al., 2016).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIOVE – Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais. Disponível em <https://abiove.org.br/estatisticas/> Acesso em: 16 de Janeiro de 2022.

AKAMATSU, H., YAMANAKA, N., YAMAOKA, Y. *et al.* Pathogenic diversity of soybean rust in Argentina, Brazil, and Paraguay. **Journal of General Plant Pathology,** pag. 28–40. 2013.

ALVES, M. C.; POZZA, E. A.; FERREIRA, J. B.; ARAÚJO, D. V.; COSTA, J. C. B.; DEUNER, C. C.; MUNIZ, M. F. S.; ZAMBENEDETTI, E. B.; MACHADO, J. C., **Intensidade da ferrugem asiática (Phakopsora pachyrhizi H. Sydow & P. Sydow) da soja [Glycine max (L.) Merr.] nas cultivares Conquista, savana e suprema sob diferentes temperaturas e períodos de molhamento foliar.** Summa Phytopathologica, v.33, n.3, p.239-244, 2007.

AMAZONAS, L. **Soja, análise mensal.** Conab. Dezembro, 2019.

ANDRADE, Paulino José Melo; ANDRADE, D. F de A. A. Ferrugem Asiática: uma ameaça à sojicultura brasileira. **Embrapa Agropecuária Oeste-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2002.

ASSIS, Isabela Portela et al. FUNGOS EM FRUTAS in natura E EM PRODUTOS INDUSTRIALIZADOS À BASE DE FRUTAS. **Agrotrópica** 31(3): 231-238. 2019.

BACAXIXI, P.; RODRIGUES, L.R.; BRASIL, E.P.; BUENO, C.E.M.S.; RICARDO, H.A.; EPIPHANIO, P.D.; SILVA, D.P.; BARROS, B.M.C.; SILVA, T.F.; BOSQUÊ, G.G. **A soja e seu desenvolvimento no melhoramento genético.** Revista científica eletrônica de agronomia. n 20, Dezembro, 2011.

BAHRAMIAN, Donya; NARAGHI, Laleh; HEYDARI, Asghar. Effectiveness of the chemical stabilizers of Talaromyces flavus in biological control of tomato and greenhouse cucumber vascular wilt disease. **Journal of plant protection research**, 2016.ALVES, M. C.; POZZA, E. A.; FERREIRA, J. B.; ARAÚJO, D. V.; COSTA, J. C. B.; DEUNER, C. C.; MUNIZ, M. F. S.; ZAMBENEDETTI, E. B.; MACHADO, J. C., **Intensidade da ferrugem asiática (Phakopsora pachyrhizi H. Sydow & P. Sydow) da soja [Glycine max (L.) Merr.] nas cultivares Conquista, savana e suprema sob diferentes temperaturas e períodos de molhamento foliar.** Summa Phytopathologica, v.33, n.3, p.239-244, 2007.

BALARDIN, R. S. et al. **Influência do fósforo e do potássio na severidade da ferrugem da soja Phakopsora pachyrhizi.** Fitopatol. bras., Brasília , v. 31, n. 5, p. 462-467, Oct. 2006.

BARRAL, Bastien et al. Diversidade e toxigenicidade de fungos causadores da podridão do miolo das frutinhas de abacaxi. **Toxinas** , v. 12, n. 5, pág. 339, 2020.

BASTOS, C. N. **Controle biológico da vassoura-de-bruxa do Cacaueiro: passado e presente.** MAPA - Boletim técnico Nº 23, 2009.

BATISTA, L. R. et al. Identificação de fungos: gêneros *Aspergillus, Penicillium* e *Talaromyces*. In: OLIVEIRA, L. A. et al. **Conhecimento, conservação e uso de fungos.** Manaus – AM: Editora INPA, 2019. p. (1 - 10).

BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas.** Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, p. 388, 1991.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas.** Embrapa meio ambiente, 2009.

BHATTACHARJEE, R.; DEY, U. An overview of fungal and bacterial biopesticides to control plant pathogens/diseases. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 17, p. 1749-1762, 2014.

BORNHOFEN, E. **Análises genéticas revelam oportunidades e obstáculos da tolerância ao fungo da ferrugem asiática da soja**. 127p. Tese de Doutorado. USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba – SP, 2019.

BOTELHO, R. V. et al., **Quitosana no controle de Penicillium sp na pós-colheita de maçãs.** *Revista Brasileira de Agroecologia*, 5 (2), pp. 200-206. 2010.

BRIZOLA, D. C. et al. Avaliação da reação de linhagens de soja ao vírus do mosaico comum da soja (Soybean mosaic virus) e ao vírus causador da necrose da haste (Cowpea mild mottle virus). In: **Embrapa Soja-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: JORNADA ACADÊMICA DA EMBRAPA SOJA, 10., 2015, Londrina. Resumos expandidos... Londrina: Embrapa Soja, 2015.

CARRETS, L.; ZENY, É. P. **Potencial de Uso de Controle Biológico para Ferrugem Asiática da Soja**. 2019. Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Agronomia - Universidade Estadual do Norte do Paraná, Campus Luiz Meneghel, Bandeirantes, 2019. - Pedido de patente BR 10 2020 010562 0

CASTELLARI, Claudia C.; VALLE, Facundo J. Marcos; PACIN, Ana M. Interacciones entre Fusarium verticillioides (Sacc.) Nirenberg, Aspergillus flavus Link Y Talaromyces funiculosus Thom en ambientes herméticos. **Chilean journal of agricultural & animal sciences**, v. 37, n. 1, p. 11-20, 2021.

CASTRO, J. G. **Clonostachys sp. Como promotor de crescimento vegetal em Soja.** 2021. 33 f. TCC (Graduação) - Curso de Agronomia, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 2021.

CATELLI, L. L. **Resistência da soja à ferrugem asiática e ao oídio: herança de caracteres quali-quantitativos e mapeamento genético.** 106p. Tese de Doutorado – UNESP / *Campus* Jaboticabal, Jaboticabal – SP, 2009.

CHAGAS JUNIOR, A. F et al. Bacillus subtilis como inoculante promotor de crescimento vegetal em soja. ***Diversitas Journal***, *7*(1), 0001-0016. 2022.

CHALFOUN, S. M.; ANGÉLICO, C. L.; BATISTA, L. R.; PEREIRA, M. C. **Predominância do gênero *Penicillium* em solos de cultivo de café pelo sistema orgânico.** Anais. Brasília, D.F. : Embrapa Café, 2005.

COLLARES, G. L.; REINERT, D. J.; REICHERT, J. M.; KAISER, D. R. **Qualidade física do solo na produtividade da cultura do feijoeiro num Argissolo**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, [s.l.], v. 41, n. 11, p.1663-1674, nov. 2006.

CONAB, **Acompanhamento da safra brasileira.**, 2021.

CORREIA, Kamila Câmara; CONFORTO, Cinthia; MICHEREFF, Sami Jorge. Manejo integrado de doenças do sistema radicular: bases científicas, estratégias e práticas. **Sanidade de raízes**, v. 1, p. 191-234, 2014.

EMBRAPA SOJA, **Soja em números (safra 18/19).** Junho, 2019.

EMBRAPA SOJA. **Vazio sanitário e calendarização da semeadura da soja.** 2019.

ENGERS, L. B. O. **Sistema de previsão para o manejo da ferrugem asiática em soja.** Dissertação de Mestrado – Universidade Federal da Fronteira Sul, Cerro Largo-RS, 2019.

FAVORETO, Luciany et al. Diagnose e manejo de fitonematoides na cultura da soja. **Informe Agropecuário, Belo Horizonte**, v. 40, n. 306, p. 18-29, 2019.

FIALLOS, F. R. G.; FORCELINI, C. A. **Progresso temporal da ferrugem e redução sobre a área foliar e os componentes do rendimento de grãos em soja.** Acta Agronômica. 2011.

FREDDI, O. S.; CENTURION, J. F.; BEUTLER, A. N.; ARATANI, R. G.; LEONEL, C. L. **Compactação do solo no crescimento radicular e produtividade da cultura do milho**. Revista Brasileira de Ciência do Solo, [s.l.], v. 31, n. 4, p.627-636, ago. 2007.

GABARDO, Gislaine et al. **Manejo de doenças com produtos alternativos isolados e associados a fungicida na cultura da soja.** Tese (Doutorado em Agronomia – Área de concentração - Agricultura), Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2018.

GODOY, C. V. et al., **Eficiência de fungicidas para o controle de ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2017/2018.** Embrapa, Circular Técnica 138. Londrina. Julho, 2018.

GODOY, C. V. et al. Boas práticas para o enfrentamento da ferrugem-asiática da soja. **Embrapa Soja-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2017.

GODOY, C. V. et al. **Doenças da Soja.** SOCIEDADE BRASILEIRA DE FITOPATOLOGIA (SBF), 2014.

GODOY, C. V. et al. Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, Phakopsora pachyrhizi, na safra 2020/2021: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. **Embrapa Soja-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2021.

GODOY, C. V.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C. Riscos e oportunidades: ferrugem da soja. In: SILVA NETO, S. B. et al. **Desafios do Cerrado: Como sustentar a expansão da produção com produtividade e competitividade.** Cuiabá – MT: Editora Casa da Árvore, 2016. p. (119 - 147).

GODOY, Cláudia V.; KOGA, Lucimara J.; CANTERI, Marcelo G. Escala diagramática para avaliação da severidade da ferrugem da soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 63-68, 2006.

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

GOULART, A.C.P. **Fungos em sementes de soja: detecção, importância e controle.** 2. ed. rev. e ampl. – Brasília, DF: Embrapa, 2018.

GRIGOLLI, J. F. J.; ASMUS, G. L. Manejo de nematoides na cultura da soja. **Embrapa Agropecuária Oeste -** Capítulo em livro científico (ALICE), 2014.

HENNING, A. A. **Manejo de doenças da soja (*Glycine max* L. Merril).** Informativo ABRATES. v. 19, n 3, 2009.

HENNING, Ademir Assis et al. Manual de identificação de doenças de soja. **Embrapa Soja-Documentos (INFOTECA-E)**, 2014.

HIKISHIMA, M. et al. **Quantificação de danos e relações entre severidade, medidas de refletância e produtividade no patossistema ferrugem asiática da soja.** Trop. plant pathol., Brasília , v. 35, n. 2, p. 96-103, Apr. 2010.

HOFFMANN, Marta Valéria Guimarães de Souza. **Estudo da resistência térmica de Byssochlamys nivea e Talaromyces flavus em suco de maçã.** 2004. 102 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. 2004.

HYMOWITZ, T. **On the domestication of the soybean.** Econ. Bot., 1970.

ITO, Margarida Fumiko. Principais doenças da cultura da soja e manejo integrado. **Nucleus**, v. 10, n. 3, p. 83-101, 2013.

JACQUES, A. P. et al. Isolados nativos de *T richoderma* spp. Como promotor de crescimento na fase inicial da cultura da soja. Brazilian Journal of Development ISSN: 2525- 8761 108150 **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.11, p. 108150-108166 nov. 2021.

JUHÁSZ, A. C. P. et al. **Desafios fitossanitários para a produção de soja.** Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 34, n. 276, p. 66-75, set./out. 2013.

KAVASAKI, Kaynara Fabíola Lima. **Densidade populacional de fungos e o potencial biotecnológico em área sob restauração florestal no ecótono cerrado / Amazônia.** 2015. 59 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais, Sinop, 2015.

KIM, Han-Soo et al. Isolation and characterization of Bacillus strains for biological control. **Journal of microbiology**, v. 41, n. 3, p. 196-201, 2003.

KUPPER, K. C. et al. **Avaliação de microrganismos antagônicos, Saccharomyces cerevisiae e Bacillus subtilis para o controle de Penicillium digitatum.** Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal , v. 35, n. 2, p. 425-436, June 2013.

LANDIM, Alice Borges. **Avaliação de parâmetros epidemiológicos da ferrugem-asiática da soja em diferentes genótipos de soja.** 50p. Dissertação de Mestrado – USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba – SP, 2020.

LIMA, S. M. **Estudo da capacidade biodegradadora de culturas mistas de fungos em blendas poliméricas biodegradáveis.** 2005. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. 2005.

LUCAS, KRG et al. Comparação do desempenho ambiental da soja em sistema convencional e em manejo integrado de pragas e de doenças (MIP-MID) por meio da metodologia de avaliação do ciclo de vida (ACV). In: **Embrapa Meio Ambiente-Artigo em anais de congresso** (ALICE). In: CONGRESSO BRASILEIRO SOBRE GESTÃO DO CICLO DE VIDA, 6., 2018, Brasília, DF. Anais... Brasília, DF: Ibict, 2018.

LUZ, L. M.; CEZIMBRA, J. C. G.; BESTER, G. F. B.; BOURSCHEID, C. A.; SOUZA, E. L. **Avaliação de controle biológico sobre a ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) na soja no sul do brasil.** Porto Alegre, UERGS, 2019.

MACHADO, M. J.; BRITO, N. M.; SANTOS, V. J.; MASCARENHAS, L. S. **Controle de *Penicillium digitatum* com extrato vegetal de *Bidens pilosa* L. in vitro.** Textura, Governador Mangabeira-BA, v. 11, n. 20, p. 042-046, jan - jun, 2018.

MAGNANI, E. B. Z.; ALVES, E.; ARAUJO, D. V.. **Eventos dos processos de pré-penetração, penetração e colonização de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de soja.** Fitopatol. bras., Brasília , v. 32, n. 2, p. 156-160, Apr. 2007.

MANOCH, L., DETHOUP, T. A potential use of Talaromyces species as biological agents against plant pathogenic fungi. **Thai J. Agric. Sci**, v. 44, p. 81-91, 2011.

MATOS, A. K. V. **Revolução verde, biotecnologia e tecnologias alternativas.** Cadernos da FUCAMP, v.10, n.12, p.1-17, 2010.

MATTOS, M. **Promoção do crescimento de soja a partir da inoculação de sementes com microrganismos não noduladores.** UFFS, Cerro Largo, 2017.

MOTLAGH, M. R. S., SAMIMI, Z. Evaluation of Trichoderma spp., as biological agents in some of plant pathogens. **Annals of Biological Research**, v. 4, n. 3, p. 173-179, 2013.

NASCIMENTO, L. M.; ALVES, A. F. **Avaliação da eficiência da aplicação de diferentes doses de Sporekill em tangor murcott para o controle de penicillium digitatum.** Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, 2006.

NUNES, J. L. S. **Sintomas**. 2016. Disponível em: https://www.agrolink.com.br/culturas/soja/informacoes/sintomas_361550.html. Acesso em: 30 maio 2020.

OGOSHI, C. et al. Progresso temporal da ferrugem asiática em função de épocas de semeadura e de cultivares de soja em terras baixas. **Brazilian Journal of Development,** Curitiba, v. 5, n. 9, p. 17102 – 17114, sep. 2019.

OLIVEIRA, A. P.; FERREIRA, B. S. Biotecnologia aliada da agricultura e na produtividade da soja. **Revista Científica Eletrônica de Ciências Aplicadas da FAIT.** N. 2. Novembro, 2020.

OLIVEIRA, D.A.S.; JESUS, M.A. **Identificação e Conservação de culturas *Penicillium* de interesse Agrossilvicultural.** Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, 2015.

OLIVEIRA, I. S. et al. **Distribuição geográfica e diversidade morfológica de culturas de Penicillium sclerotigenum em inhames no Brasil.** Fitopatol. bras., Brasília , v. 32, n. 2, p. 131-136, Apr. 2007 .

OLIVEIRA, Rafael Neres. **MANEJO QUÍMICO DO MOFO-CINZENTO-DA-MAMONA CAUSADA POR Amphobotrys ricini.** 2019. Dissertação (Mestrado em proteção de plantas). Instituto Federal Goiano, *Campus* Urutaí, 2019.

PALLU, A. P. S. **Potencial biotecnológico de fungos de gênero Penicillium e interação com cana-de-açúcar.** Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

PAPAVIZAS, G. C. Trichoderma and Gliocladium: biology, ecology, and potential for biocontrol. **Annual review of phytopathology**, v. 23, n. 1, p. 23-54, 1985.

PARRA, J. R. P. et al. **Controle biológico: terminologia. Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores.** São Paulo. Manole editora, p. 1-16, 2002.

PERES, D. M. et al. Diferentes manejos no controle da ferrugem asiática na cultura da soja. **Revista Cultivando o Saber**, v. 14, n. 1, p. 34-44, 2021.

PRIOLLI, R. H. G. et al., **Diversidade genética da soja entre períodos e entre programas de melhoramento no Brasil.** Pesq. agropec. bras., Brasília , v. 39, n. 10, p. 967-975, Out. 2004.

RAGASSI, C. F.; FAVARIN, J. L.; SHIRAISHI, F. A.; MOITA, A. W.; SAKO, H.; MELO, P. C. T. **Efeito da descompactação profunda de solo na produção da cultura da batata**. Horticultura Brasileira, [s.l.], v. 27, n. 4, p.484-489, dez. 2009.

RAMOS, Sérgio Murilo Sousa. **Diversidade de espécies de Penicillium e Talaromyces em solos usados para o cultivo de cana-de-açúcar (Saccharum officinarum L.) e detecção da produção de micotoxinas**. 2018. 119 f. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. 2018.

REIS, Erlei Melo; CASA, Ricardo Trezzi; BIANCHIN, Vânia. Controle de doenças de plantas pela rotação de culturas. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 3, p. 85-91, 2011.

RITZINGER, C. H. S. P. Nematoides. **Embrapa Mandioca e Fruticultura** - Capítulo em livro científico (ALICE), 2013.

RODRIGUES, Marco Antonio Tavares. **Classificação de fungicidas de acordo com o mecanismo de ação proposto pelo FRAC.** 2006. xxxix, 249 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, 2006.

ROSA, C. R. E. **Identificação de marcadores SNP (Single Nucleotide Polymorphism) associados ao gene de resistência *Rpp4* da soja (*Glycine max* L. Merr.) a ferrugem (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow).** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2015, 116 p. Tese de Doutorado.

SAMSON, R. A. et al. Phylogeny and nomenclature of the genus Talaromyces and taxa accommodated in Penicillium subgenus Biverticillium. **Studies in mycology**, v. 70, p. 159-183, 2011.

SAMSON, R. A. et al. Phylogenetic and taxonomic studies on the genera Penicillium and Talaromyces. **CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre**, 2011.

SAMSON, Robert A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus Aspergillus. **Studies in mycology**, v. 53, n. 1, p. 1-27, 2005.

SAMSON, Robert A.; PITT, John I. (Ed.). Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification. **Springer Science & Business**, 1990.

SANTIN, Joao Anaracy. **Fungos de pré e pós colheita e a qualidade de grãos de milho.** 2001. 219 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2001.

SEDIYAMA, T.; SILVA, F.; BORÉM, A. **Soja: do plantio à colheita.** Viçosa, MG: Ed. UFV, 2015.

SEIXAS, Claudine Dinali Santos et al. Monitoramento de Phakopsora pachyrhizi na safra 2017/2018 para tomada de decisão do controle da ferrugem-asiática da soja. **Embrapa Soja-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2018.

SILVA, L. L.; NETO, N. **Análise de eficiência de diferentes fungicidas no controle do fungo *Phakopsora pachyrhizi* na cultura da soja.** Ciência e Tecnologia. Cruz alta, v. 3, n. 1, 2019.

SILVA, M. S. L. et al. **Principais doenças da cultura da soja (Glycine max (L.) Merrill).** Monografia (Graduação em Agronomia) – Instituto Federal Goiano, *Campus* Rio Verde, 2019.

SILVA, R. A. et al. Efeito da rotação e sucessão de culturas no manejo de nematoides da soja em área arenosa. **Nematropica**, v. 48, n. 2, p. 198-206, 2018.

SILVEIRA et al. **Anatomia da ferrugem asiática da soja em diferentes patossistemas.** Universidade Estadual do Norte do Paraná/ UENP –Jornada de Iniciação Científica/ JOIC, 2015.

SOUZA, Ilva de Fátima. **Isolamento e avaliação de fungos filamentosos naturalmente ocorrentes em biomassas lignocelulósicas para a produção de enzimas holocelulolíticas**. 2015.

TSCHURTSCHENTHALER, N. N. et al. **Variabilidade genética de Phakopsora pachyrhizi avaliada por meio de marcadores microssatélites.** *Pesq. agropec. bras.*, vol.47, n.2. 2012.

USDA – United States Department of Agriculture. Disponível em: < https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/compositeViz> Acesso em: 16 de Janeiro de 2022.

VAZ, A. B. et al. **Seleção *in vitro* de fungos antagônicos a *Phytophthora palmivora* da pupunheira.** Agrotrópica 24 (3) : 157 - 168. 2012.

VIGANÓ, J. et al. Piramidação de genes de resistência à ferrugem asiática da soja (FAS) assistida por marcadores moleculares microssatélites. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 40, 2018.

VISAGIE, C. M; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; HONG, S. B; KLAASSEN, C. H. W; SEIFERT, K. A.; VARGA, J.; YAGUCHI, T.; SAMSON, R. A.; Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*, **Studies in Mycology,** v. 78; p.343-371, 2014.

WOO, Sheridan L. et al. Trichoderma-based products and their widespread use in agriculture. **The Open Mycology Journal**, v. 8, n. 1, 2014.

XAVIER, Sheila Ariana et al. Variação da sensibilidade de populações de Phakopsora pachyrhizi a fungicidas inibidores da desmetilação no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 41, p. 191-196, 2015.

YANG, Qiya et al. Effect of Yarrowia lipolytica on postharvest decay of grapes caused by Talaromyces rugulosus and the protein expression profile of T. rugulosus. **Postharvest Biology and Technology**, v. 126, p. 15-22, 2017.

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

YORINORI, J. T.; JUNIOR, J. N.; LAZZAROTTO, J. J. **Ferrugem “asiática” da soja no Brasil: evolução, importância econômica e controle.** – Londrina: Embrapa Soja, 2004.

ZAMBENEDETTI, E. B. **Preservação de *Phakopsora pachyrhizi* Sydow e Sydow e aspectos epidemiológicos e ultraestruturais da sua interação com a soja (*Glycine max* (L.) Merril).** – Lavras, Dissertação (Mestrado): UFLA, 2005.

ZENY, É. P. **Potencial de Uso de Controle Biológico para Ferrugem Asiática da Soja**. 2019. Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Agronomia - Universidade Estadual do Norte do Paraná, Campus Luiz Meneghel, Bandeirantes, 2019.

ZORZZI, Ivan Carlos et al. **Controle de ferrugem asiática da soja utilizando produtos alternativos**. 2019. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2019.

ZUFFO, A. M. et al. Adubação nitrogenada associada à inoculação de Bradyrhizobium japonicum como estratégia para amenizar os efeitos da desfolha na soja. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 14, n. 1, p. 1-12, 2021.

Capítulo submetido para publicação no livro “Sistemas para produção Agropecuária Sustentável” – Editora: UENP.

3. CAPÍTULO 1

BIOFUNGICIDAS

3.1 Introdução

Alimentos obtidos a partir de plantas perfazem 80% da alimentação humana (FAO, 2021). Desde a revolução verde na agricultura e o estabelecimento dos sistemas intensivos de cultivo, as pragas e doenças têm sido os principais causadores de perdas no setor. Hoje, 20 a 40% da produção é perdida com pragas e doenças sendo que desse montante 14% é atribuído as doenças das quais 83% são causadas por fungos. Como exemplos podemos mencionar o poder destrutivo dos fungos: *Phytophtora*, das ferrugens e *Botrytis*, sobre centenas de espécies cultivadas. Nesse contexto, o desenvolvimento de estratégias para manejar as doenças a campo foi fundamental para sustentar a primeira onda da revolução verde e naturalmente ainda o é já que a população humana permanece em crescimento.

Nas décadas de 70 e 80 o manejo de doenças foi quase que exclusivamente realizado pelo emprego de pesticidas químicos ou fungicidas químicos, no caso das doenças causadas por fungos. Com o emprego desses fungicidas obteve-se um ótimo controle das doenças fúngicas e consequentemente grandes ganhos em produção. Atualmente, de forma geral, o mundo ainda emprega os fungicidas químicos como principal meio de controle das doenças fúngicas. Com o passar dos anos de seu emprego, observou-se que os fungicidas químicos são muito hábeis em proporcionar evolução de resistência entre os patógenos no campo, reduzindo ano a ano a sua eficiência, e com isso, reduzindo os ganhos do produtor ao passo que novos investimentos no desenvolvimento de outras moléculas se fizeram necessários, e é claro, impondo novos custos a produção e ao consumo. Além disso, a literatura passou a apresentar uma série de dados relevantes que mostravam os prejuízos do uso massivo desses químicos ao equilíbrio dos ecossistemas e por fim, a própria saúde humana.

Alternativamente, a partir da década de 90 e de forma mais importante nos anos dois mil, vimos crescer a agricultura orgânica, e com ela a necessidade de

desenvolvimento de formas mais sustentáveis e menos poluentes para o controle de doenças. A área destinada a agricultura orgânica é bastante representativa em países da Europa e na Austrália, mas percebemos que de forma geral, a área destinada ao cultivo livre de pesticidas químicos vem crescendo nos últimos 20 anos. Atualmente estima-se que são 72.285.658 hectares no mundo e 1.283.054 no Brasil (Source: FiBL-IFOAM-SOEL, 2021).

A agricultura orgânica é um conceito complexo de agricultura que prevê o estabelecimento de relações ecologicamente adequadas e práticas sustentáveis, mas uma das principais condições para o seu estabelecimento é o uso do biocontrole de pragas e doenças em substituição ao controle químico. É importante que se entenda, entretanto, que essa substituição se faz primordial não apenas em função da toxicidade e ecotoxicidade dos químicos sintéticos, mas também em função do prejuízo a sustentabilidade econômica do processo que os químicos sintéticos trazem. Assim, é racional compreender porque a agricultura orgânica não é composta por organismos geneticamente modificados (OGMs). Ainda o mais ecologicamente “amigável” OGM impõe ao produtor dependência econômica.

Os agentes de biocontrole (ABCs) são classificados pela Associação Internacional de produtores de biocontrole (IBMA - International Biocontrol Manufacturers’ Association) como macrobiológicos, microbiológicos ou semio-químicos. No Brasil, o Ministério da Agricultura (MAPA, 2019) subdivide os ABCs formados por sbstâncias naturais em duas classes em duas classes: semio-químicos (compostos que induzem respostas no organismo alvo como feromônios e aleloquímicos) e bioquímicos (compostos que controlam doenças como enzimas). Assim, os ABCs destinados ao controle de doenças fúngicas ou biofungicidas podem ser do tipo semio-químico, bioquímico ou microbiológico, e podem ser destinados a agricultura orgânica como também podem ser integrados a agricultura convencional, mas vale destacar que a imensa maioria dos projetos de desenvolvimento de ABCs visam o mercado orgânico.

A maior parte dos biofungicidas disponíveis atualmente no mundo são desenvolvidos a partir de representantes dos gêneros *Trichoderma, Bacillus, Pseudomonas*, *Coniothryium, Streptomyces, Ulocladium, Gliocladium.* No Brasil,

os produtos hoje registrados com ação biofungicida são derivados de *Bacillus*, *Trichoderma*, *Beauveria* e *Clonostachys* (MAPA, 2020). No cenário mundial, 44% do mercado de biológicos é voltado para a soja, principal produto agrícola brasileiro. Não por acaso o Brasil é um dos líderes na adoção de produtos biológicos com mais de 23 milhões de hectares tratados com biocontrole (MAPA, 2021).

Quando comparamos o mercado de fungicidas químicos aos biofungicidas, é claro que há uma grande discrepância tanto no número de produtos, players do mercado, quanto no tamanho do setor. Porém, é certo que o mercado de biológicos vem crescendo e estimativas recentes indicam que deve continuar a crescer até 2050. No Brasil essa tendência pode ser percebida por exemplo em função do aumento significativo no número de produtos biológicos registrados no MAPA; 2020 foi o ano recorde de registro desse tipo de produto. Entretanto, embora o mercado para os biológicos seja altamente promissor, há ainda muitos desafios importantes a serem vencidos no desenvolvimento desse tipo de produto que se relacionam principalmente a formulação e produção em larga escala. Por fim é importante destacar que mesmo embora o mercado para os produtos biológicos seja preferencialmente o da agricultura orgânica, há na literatura uma série de relatos que indicam que o seu uso em combinação aos fungicidas químicos possa não apenas ser viável e efetivo como também ser importante para a redução do uso de químicos na agricultura moderna.

3.2 Estado da arte

3.2.1 Proteção de plantas - Histórico

Os primeiros registros do homem atuando diretamente no manejo depestes são provenientes de escrituras gregas e romanas, onde os agricultores da época realizavam catação manual de gafanhotos. Algumas destas escrituras, datadas por volta de 1000 a.C. já mostravam as mesmas civilizações utilizando arsênico para o controle de pestes nas lavouras. Aproximadamente 2000 anos atrás os chineses extraiam piretrina das flores de crisântemo para utilização como inseticida. Já em 1807, Bénedíct Prevost observou *Tilletia caries* (fungo da cárie do trigo) tendo seu desenvolvimento inibido por cobre embebido em água. No final do mesmo século, na região de Bordeaux, França, o Micologista Alexis Millardet

relatou que um agricultor, numa tentativa de repelir pessoas que roubavam suas uvas, aplicou uma mistura de sulfato de cobre e cal nas videiras. O mesmo observou que as plantas submetidas à aplicação da mistura não apresentaram queda foliar causada por Míldio. Essa descoberta desencadeou pesquisas para descoberta de novas formas de controle de doenças fúngicas (LARGE, 1943; ALVES FILHO, 2002; KLITTICH, 2008; SILVA; COSTA, 2012 *apud* NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2000).

No início do século XX, fitopatologistas foram estimulados a pesquisar sobre possíveis compostos que pudessem atuar na defesa contra fitopatógenos. Ao observarem a tentativa de indústrias farmacêuticas na descoberta sobreefeitos medicinais de compostos metálicos, os pesquisadores criaram o primeiro fungicida desenvolvido em laboratório, o Cloro (2-hidroxifenil) mercúrio (organomercurial), usado para tratamento de sementes. A partir dos anos 40 o manejo das pestes (pragas, doenças e plantas daninhas) no campo passou a ser facilitado pelos defensivos químicos, tendo início com o DDT (diclorodifeniltricloetano), que a priori foi desenvolvido para proteger os soldados da segunda guerra contra mosquitos transmissores de doenças, mas em segundo momento mostrou sua eficácia no combate aos insetos-praga no campo. Com o sucesso dos defensivos e o aumento de sua demanda pelos agricultores, logo vieram maiores investimentos para desenvolvimento de novas moléculas, e como resultado no final dos anos 60 e início dos anos 70, foram lançados fungicidas de efeito sistêmico, tanto para tratamento de sementes quanto para aplicação foliar, cujo ingredientes ativos eram Carboxina e Benzimidazol, respectivamente (JOLY; LEMARIÉ, 2002; BETTIOL; GHINI, 2003; KLITTICH, 2008; BARROS, 2010; SILVA; COSTA, 2012).

Junto com a indústria agroquímica vieram outras inovações tecnológicas em insumos agrícolas químicos (fertilizantes), mecânicos (tratores e implementos)e biológicos (OGMs) caracterizando esta época como a Revolução Verde, um marco na agricultura, que proporcionou aumentando às produtividades das lavouras, simplificando seu manejo (VEIGA, 1994; ALBERGONI; PELAEZ, 2007; BARROS, 2010).

Boa parte dos produtos químicos é perdida para o ambiente pelo simples fato de não ser possível fazer o produto atingir apenas o alvo, o que inclui, erros relacionados à tecnologia de aplicação, aplicações preventivas, feitas antes do nível econômico de dano e pela exclusividade devido à facilidade deste método de manejo. Este uso intensivo gera consequências como contaminação de solo e água, seleção de patógenos, pragas e plantas daninhas resistentes aos ingredientes ativos e eliminação de inimigos naturais, microrganismos antagônicos e benéficos e, ainda, contaminação de trabalhadores rurais e pessoas que ingerem alimentos ou água contaminada (BETTIOL; GHINI, 2003; BRENT; HOLLOMON, 2007; BETTIOL, 1991; BETTIOL; MORANDI, 2009;
BRAUER *et al*., 2019).

Com as denúncias do impacto ambiental que os defensivos causam, feitas pela cientista Rachel Carson, através do livro 'Silent Spring' publicado em 1962, iniciaram-se cobranças mais relevantes por uma agricultura mais segura, tendo sido implementado regulamentações no desenvolvimento de novos produtos, o que dificultou o desenvolvimento e encareceu os mesmos, levando as grandes empresas, no final do século XX, à fecharem acordos de pesquisa e desenvolvimento com empresas menores e universidades que já pesquisavam sobre o tema. A partir desse momento o manejo integrado passou a ser levado em conta, integrando estratégias de prevenção às adversidades, manutenção das melhores condições e não apenas remediação dos problemas apresentados no campo (JOLY; LEMARIÉ; 2002; ALBERGONI; PELAZES, 2007; BARROS, 2010).

Outro fator contribuinte aos maiores investimentos em biotecnologia foi a dificuldade em descobertas de novos ingredientes ativos. O uso intensivo dos defensivos leva à pressão de seleção dos genótipos resistentes aos mesmos, que por sua vez, exigem novos ingredientes ativos ou métodos de controle. Os patógenos apresentam variabilidade genética e um curto ciclo de vida e, desta forma, originam nova população resistente ao ingrediente ativo utilizado em uma velocidade muito difícil de acompanhar, tal fator é ainda mais grave no caso de patógenos policíclicos, como a ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) (VINCELLI, 2014). A depreciação da eficiência dos produtos já existentes no mercado, junto com a queda de aproveitamento na descoberta de novos ingredientes ativos durante os anos e, ainda, a pressão pela sustentabilidade na

agricultura, levaram as empresas a investir em biotecnologia, como estratégia de se manter no mercado (ALBERGONI; PELAEZ, 2007).

O primeiro passo da biotecnologia começou com o investimento, pelas indústrias de defensivos, em sementes geneticamente modificadas. As novas tecnologias do melhoramento genético através da engenharia genética permitiram a introdução de genes de interesse de outras espécies nas espécies cultivadas, com o intuito de eliminar o uso de alguns defensivos, como os inseticidas, através da tecnologia *Bt*, ou potencializar o uso de outros, como as plantas resistentes à herbicidas. As primeiras sementes geneticamente modificadas foram comercializadas nos EUA em meados dos anos 90, sendo as culturas, Algodão, Batata, Milho, Soja e Tomate (ASSOULINE *et al*., 2002; ALBERGONI; PELAEZ; 2007; MATOS, 2010).

A contribuição da tecnologia com o intuito de redução do uso dos defensivos químicos não se limitou apenas à produção de sementes geneticamente modificadas. As diversas ferramentas tecnológicas atreladas aos anos de estudos permitiram o desenvolvimento de recursos como os da agricultura de precisão, onde as aplicações de defensivos limitam-se às áreas infestadas, uso de armadilhas com feromônios sintéticos para os insetos pragas ou a produção massal de inimigos naturais para soltura à campo, desenvolvimento de produtos à base de microrganismos benéficos às culturas e biofungicidas através de microrganismos antagônicos às espécies fitopatogênicas, extratos de plantas e mecanismos de indução de resistência (MELO, 1998; BETTIOL; GHINI, 2003; KOVALESKI *et al*., 2003; DINIZ *et al*., 2008; STANGARLIN, 2011; ALTINTAS *et al*., 2013; INAMASU; BERNARDI, 2014; SHUPING; ELOFF, 2017).

Além disso, a agricultura hoje ainda dispõe de estratégias biotecnológicas não transgênicas para obtenção de melhoramento genético de precisão nas lavouras, como é o caso das tecnologias de RNAi e CRISPR.

3.2.2 Controle biológico – Histórico e conceitos

Controle biológico compreende a ação inibitória de inimigos naturais ou substâncias naturais sobre a população de um determinado hospedeiro. Há dezenas de espécies e substâncias naturais já identificadas como agentes de controle biológico. Entre aqueles identificados como inimigos naturais temos os

que se comportam ecologicamente como predadores, parasitoides ou como patógenos. Predadores são sempre inimigos naturais de vida livre que se alimentam de sua presa exercendo dessa forma a ação de biocontrole. Já os parasitoides são aqueles que completam seu ciclo de vida no hospedeiro e por esse motivo acabam atuando no controle de sua população. Predadores e parasitoides são insetos que se alimentam de outros insetos e por esse motivo são denominados de entomáfagos, no caso dos parasitoides, são as formas larvais do inseto que ao se desenvolver no hospedeiro acaba por controla-lo (BUENO et al., 2015). Por fim, os patógenos são microrganismos que vivem ou sealimentam no seu hospedeiro e podem ser representados por vírus, bactérias, fungos ou protozoários.

O inseto *Cotesia flavips* é um dos mais importantes exemplos de parasitoide usado no controle da broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*). Como exemplo de predação podemos citar a joaninha *Cryptolaemus Montrouzieri*, predadora de diversas espécies de cochonilhas e pulgões.

Os principais microorganismos usados no controle biológico são fungos e bactérias, em especial os gêneros Trichoderma e Bacillus, respectivamente, mas também são usados protozoários e vírus.

Além dos organismos vivos, que são de fato a principal forma de uso comercial do biocontrole; o controle biológico pode também ser exercido por substâncias naturais produzidas por inimigos naturais ou ainda por plantas tais como extratos e óleos essenciais. Os produtos bioquímicos são substâncias químicas naturais não tóxicas usadas no controle biológico como promotores de processos químicos ou biológicos, abrangendo os hormônios, reguladores de crescimento e as enzimas (Souza 2017; IBAMA 2020)

No geral os agentes de controle biológico comportam-se, portanto como antagonistas da praga ou agente causador da doença que se deseja controlar. Essa relação ecológica de antagonismo por sua vez pode se dar por mecanismos diretos como é o caso da predação e do parasitismo, da antibiose e da produção de enzimas líticas; mas pode também se dar de forma indireta como é o caso da indução de resistência, da indução de resistência sistêmica adquirida, da detoxificação ou degradação de fatores de virulência, competição e promoção de

crescimento na planta. Antibiose ocorre quando uma substância inibitória é produzida pelo antagonista inibindo o crescimento do alvo. Na indução de resistência, o agente biológico é capaz de induzir respostas na planta hospedeira que elevam seu nível de resistência ao patógeno de forma local ou sistêmica. Há também agentes de controle que agem de forma a estimular o crescimento da planta e são, portanto, considerados como promotores de crescimento. Por fim, há ainda um tipo especial de antagonismo exercido por microrganismos que invadem micélios, esporos e outros denominado de hiperparasitismo. Quando esse hiperparasitismo ocorre por fungos que se nutrem a partir de outros fungos, o processo é denominado de micoparasitismo. Os mecanismos de ação podem ser observados individualmente mas também, dependendo do microrganismo e da interação, diferentes tipos de mecanismos antagonistas podem ocorrer de forma combinada (revisado por Köhl et al., 2019)

O uso de agentes de controle biológico na agricultura não é recente, há autores que relatam que já no século III os chineses utilizam predadores como agentes de controle biológico. Nesse caso foram utilizadas as formigas *Oecophylla smaragdina* no controle de pragas dos citros (BERTI FILHO; MACEDO, 2011). Aldrovani, em 1602, na Europa, observou o parasitismo em insetos, e relatou o controle das lagartas *Pieris rapae* pelo inseto parasita *Apanteles glomeratus*, entretanto, ele confundiu os casulos do parasitóide com osovos da lagarta e por esse motivo, Antonio Vallisnieri de Pádua é considerado o primeiro a relatar o uso de parasitóides no controle biológico (PARRA et al., 2002).

A primeira tentativa de utilização do controle biológico clássico, aquele no qual o agente de controle é importado para uso em outro país, foi no ano de 1873; quando uma espécie de ácaro (predador) dos Estados Unidos foi importada para a França com o objetivo de controlar o pulgão *Phylloxera* (GONÇALVES, 1996). Mas o grande sucesso do controle biológico clássico, só ocorreu no ano de 1888, quando o coleóptero *Rodolia cardinalis* foi introduzido na Califórnia para controlar a cochonilha *Icerya purchasi* (GONÇALVES, 1996; PARRA et al., 2002; BERTI FILHO; MACEDO, 2011). No século XIX ainda, levantou - se a ideia que cada espécie de inseto fitófago possuía seu complexo de parasitóide e predador (GONÇALVES, 1996). Após o sucesso da introdução de *Rodolia cardinalis*, alguns locais da Europa, introduziram predadores para combater insetos-praga

(GONÇALVES, 1996). No mesmo período, naturalistas europeus evidenciaram a importância da família Ichneumonidae, como parasitóides de lagartas (GONÇALVES, 1996). A utilização de entomáfagos, ou seja, insetos que no estágio larval parasitam outros insetos, bem como de patógenos cresceu gradualmente no controle biológico a medida que os pesquisadores foram compreendendo a biologia, genética, sistemática e ecologia das interações entre praga-patógenos (FONTES; VALADARES-INGLIS, 2020). Assim como, foram desenvolvidas técnicas mais sofisticadas e criativas para a produção e formulação de agentes de controle biológico (FONTES; VALADARES-INGLIS, 2020).

O controle biológico foi introduzido no Brasil no ano de 1921 com a importação dos Estados Unidos da *Prospaltella berlesei* para combater a cochonilha-branca-do- pessegueiro, *Pseudaulacaspis pentagona* (PARRA et al.; 2002; BERTI FILHO; MACEDO, 2011). Após, outras introduções foram ocorrendo como a do parasitoide *Aphelinus mali*, introduzido do Uruguai para controlar o pulgão lanígero, *Eriosoma lanigerum* no ano de 1923 e a introdução da vespa de Uganda, *Prorops nasuta* trazida da África em 1928 para controlar a broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (PARRA et al.; 2002; BERTI FILHO; MACEDO, 2011). Em 1937, *Tetrastichus giffardianus* foi introduzida do Havaí para controlar a mosca- do-mediterrâneo, *Ceratitis capitata*, e em 1944, *Macrocentrus ancylivorus* veio dos EUA para controlar a mariposa oriental, *Grapholita molesta* (PARRA et al.; 2002; BERTI FILHO; MACEDO, 2011).

Por outro lado, o uso de microrganismos como agentes de controle biológico tem seu início por volta do ano de 1830, quando identificou - se que fungos, bactérias e protozoários causavam doenças em insetos. No ano de 1874, William Roberts usou o termo antagonismo após observar esse efeito em microrganismos, dando início ao desenvolvimento de estratégias de biocontrole para as doenças de plantas. Em 1884, Elie Metchnikoff produziu uma estrutura massal de esporos do fungo *M. anisopliae* para realização de testes de biocontrole a campo contra as larvas do *Cleonus punctiventris*, uma praga da beterraba (GONÇALVES, 1996; FONTES; VALADARES-INGLIS, 2020). Já em 1932,
Weindling reportou a atividade antagonista de *Trichoderma lignorum* contra *Rhizoctonia solani*. Atualmente os fungos Trichoderma foram identificados como

antagonistas de muitos outros patógenos e são frequentemente utilizados no controle biológico de doenças.

Os produtos que usam microrganismos no controle de pragas e doenças são denominados de biopesticidas e podem ser biofungicidas, usados para controlar fungos patogênicos ou bioinseticidas, usados para combater insetos- praga; há ainda os bioherbicidas usados no controle de plantas-pragas. No ano de 2001 haviam 195 agentes biopesticidas registrados e 780 produtos dos quais a maior parte é composta por biopesticidas de microrganismos vivos, principalmente de *Trichoderma*, *Pseudomonas* e *Bacillus*.

O uso de microrganismos não patogênicos como antagonistas de microrganismos fitopatogênicos foi definido por Cook (1993) como um método alternativo ecologicamente mais adequado e seguro para o controle de doenças. Tais agentes de controle conforme Junaid et al. (2013) podem execer biocontrole por meio de interferências em qualquer um dos componentes envolvidos no estabelecimento da doença: na planta, no patógeno ou no ambiente. Espécies de Trichoderma são os principais representes entre os biofungicidas. Na revisão publicada por Bhattacharjee & Dey (2014) 92 espécies de microrganismos são listadas como agentes de biocontrole para doenças de plantas dentre as quais a maior parte é formada por representantes do gênero *Trichoderma*.

Espécies do gênero *Trichoderma*, são isoladas do solo e produzem toxinas e enzimas que controlam um grande número de patógenos foliares e de solo tais como *Fusarium, oxysporum*, *Sclerotium rolfsii* e *Rizoctonia solani*. Tais espécies podem apresentar uma grande variedade de mecanismos de biocontrole os quais incluem: competição (Papavizas, 1985), hyperparasitismo de outros fungos Motlagh & Samimi, 2013), produção de enzimas com atividade lítica, antibiose com produção de diferentes antibióticos anti-fúngicos, produção de metabólitos secundários que induzem resposta de resistência sistêmica adquirida, resistência sistêmica e hipersensibilidade nas plantas. Assim, em função da boa amplitude de mecanismos apresentados o uso de espécies de Trichoderma é favorecido o que pode ser observado em função do fato de que mais do que 60% dos produtos registrados no mundo como biofungicas são produzidos a partir dessas espécies (Woo et al. 2014).

Outros microrganismos importantes presentes nos biofungicidas são as bactérias *Pseudomonas*, naturais da rizosfera das plantas. Tais bactérias atuam no controle dos fungos patogênicos por meio da promoção de crescimento das plantas (Lucy et al., 2004), pela produção de um potente antibiótico anti-fúngico, a phyochelina; e de outras moléculas que também funcionam como antibióticos anti-fúngicos, por competição com outros microrganismos, pela produção de enzimas anti-fúngicas ou ainda pela degradação de substâncias fúngicas necessárias ao estabelecimento da patogenicidade (Morrissey et al., 2004). Além das *Pseudomonas*, bactérias do gênero *Bacillus*, tradicionalmente importantes no controle dos insetos-pragas, também são importantes no controle de fungos fitopatogênicos atuando como produtoras de antibióticos e possivelmente a partir de substâncias voláteis (Kim et al., 2003).

3.2.3 Desafios para alcançar o mercado – Da prospecção a prateleira

O primeiro passo para a produção de um produto de origem biológica como um biofungicida, é a busca e identificação de um microrganismo com ação antagonista ao patógeno. Esse processo de identificação ou prospecção de antagonistas pode ser feito de uma forma ativa ou de forma passiva. Na prospecção ativa podemos testar microrganismos com atividade antagonista já conhecida sobre algum patógeno em novos tipos de interação. É possível também buscar os microrganismos ativamente realizando coletas em locais de alta biodiversidade, tais como solos, água, mar e nas próprias plantas ou em locais de diversidade microbiológica pouco conhecida tais como cavernas. De outra forma, a prospecção pode ser passiva quando isolamos o microrganismo a partir de uma observação de ação antagonista natural. Para todas as situações, os microrganismos isolados deverão ser estabelecidos em culturas puras e identificados de forma adequada antes de prosseguir com os ensaios de biocontrole para teste de sua eficiência como agente de controle biológico.

Como exemplo de identificação passiva é possível citar o caso ocorrido no laboratório de biotecnologia da Universidade Estadual do Norte do Paraná. A equipe do laboratório trabalhava na multiplicação do fungo causador da ferrugem da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, em folhas destacadas de soja cultivadas em placas de petri. O objetivo era produzir lesões de ferrugem suficientes para coleta

de esporos e posterior análises moleculares. No entanto, um problema de contaminação parecia estar impedindo a esporulação do fungo e consequentemente impedindo que novas lesões se formassem, inviabilizando o trabalho. Verificou-se que essa contaminação era na verdade causada por um outro fungo que crescia voluntariamente sobre as lesões de *Phakopsora pachyrhizi* impedindo seu progresso. Esse contaminante foi isolado, mantido em um cultivo monospórico e identificado como uma cepa de *Penicillium* sp. Posteriormente, muitos ensaios *in vitro*, na casa de vegetação e à campo foram conduzidos no sentido de avaliar a eficiência da cepa no biocontrole da ferrugem, todos com resultados muito promissores, inclusive os ensaios de campo nos quaisobteve-se eficiência de controle com o biológico estatisticamente igual a obtida com o controle químico (ZENY, 2020). O conjunto de achados sobre o potencial de uso da cepa identificada de Penicillium sobre o biocontrole da ferrugem asiática da soja foi recentemente publicado por meio da publicização do protocolo de patente no INPI (BR 1020200153234A2).

Atualmente o mestrando Nixau Wauters Macedo e as acadêmicas do grupo PET (Programa de educação tutorial), Talita Rafaela Lima e Sofia Haddad Maluff, têm dado continuidade a investigação da interação Penicillium sp vs. *Phakopsora pachyrhizi* por meio de ensaios adicionais que visam elucidar os mecanismos envolvidos na interação antagônica por meio de identificação de metabólitos e do acompanhamento da interação por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Ensaios de observação dos mecanismos envolvidos na interação, embora fundamentais cientificamente, podem à princípio serem dispensáveis do ponto de vista do estabelecimento de um produto. Porém, vale mencionar que o seu conhecimento pode impulsionar o desenvolvimento de um produto mais eficaz e ainda contribuir para adoção de estratégias que otimizem a sua eficácia como por exemplo pela combinação de mecanismos de ação distintos no controle da doença.

Uma série de ensaios são realizados para verificação de eficiência do agente, estes incluem testes *in vitro* feitos em placas com intervalo de atempo (MARRONE, 2019). Após os testes em laboratório, podem ainda serem feitas análises para identificar os metabólitos presentes no ativo biológico que promovem a proteção da planta (MARRONE, 2019). O experimentador ainda deve

realizar experimentos em casa de vegetação e à campo para análises iniciais de viabilidade de uso do agente no biocontrole da doença. Após as pesquisas e comprovação da eficiência do ativo biológico, inicia - se então o processo de produção massal e formulação do produto biológico.

No entanto, por mais que se colecione evidências da ação antagonista de um agente de biocontrole sobre um patógeno de interesse econômico, muitos são os passos que separam a etapa da prospecção da etapa de comercialização do produto biológico. Na figura 2 os mecanismos de ação antagonista são apresentados bem como são elencados os principais aspectos a serem considerados para atingir o mercado. Os desafios mais iniciais e fundamentalmente importantes são aqueles relacionados a produção massal e a formulação do produto. Posteriormente temos os desafios relacionados a viabilidade de uso do produto em diferentes situações ambientais. Fatores relacionados a essas etapas de desenvolvimento do produto são determinantes para que o biológico reproduza seus efeitos de laboratório no campo e de fato alcance o mercado (Handelsman, 2002, Usta, 2013)

A Produção em massa do microrganismo talvez seja o principal desafio no desenvolvimento do produto uma vez que nessa etapa todas as condições ótimas em termos nutricionais e ambientais devem ser determinadas. Há duas formas de produção em massa, a produção sólida ou a fermentação líquida, sendo a última frequentemente utilizada quando o agente de biocontrole é um fungo. Nesse momento o desenvolvedor deverá se preocupar também com o estabelecimento de um meio de cultivo que não onere a produção e preferencialmente que seja prontamente disponível. São meios frequente os baseados em melaço, farelo de trigo e dextrose batata (PRASAD; RANGESHWARAN 1998, 2000; PRASAD et al. 2002). A fermentação em estado sólido também possui suas vantagens, especialmente para a produção e biofungicidas uma vez que o meio sólido porvê condições para alta produção de conídeos. Aqui, é possível listar vários substratos de baixo custo tais como o painço, ragi e sorgo (LEWIS 1991; JEYARAJAN 2006).

Uma vez estabelecida a condição de produção em larga escala o próximo passo é o desenvolvimento de uma formulação que deve garantir uma concentração estável do inóculo, estabilizar o microrganismo no campo,

promovendo condições para sua máxima eficiência e ainda apresentar as características de ausência de toxicidade, fácil manipulação, vida longa de preteleira, compatibilidade com outros insumos, baixo custo e, preferencialmente estabilidade em uma boa faixa de variação de temperatura (KUMAR et al. 2014). Na literatura a concentração de conídeos dos biofungicas normalmente aparece como 10^6 ml^{-1} no caso dos biofungicas fúngicos e 10^5 a 10^9 CFU ml^{-1} no caso dos bacterianos (HJELJORD et al., 2011, ORIA; VENTURINI, 2017).

Os produtos biológicos podem ser formulados de diversas maneiras, entre elas: concentrado emulsionável, pó molhável, paletes, gel emulsionável, suspensão concentrada, grânulos solúveis e encapsulamento do agente (MARRONE, 2019; CROPLIFE, 2020; AGROFIT 2021). A formulação é responsável em aprimorar características de desempenho do produto, como eficácia, valor, prazo de validade, adequação aos requisitos da agricultura orgânica, solubilidade em água, persistência à chuva, compatibilidade com outros pesticidas e capacidade de pulverização (MARRONE, 2019; CROPLIFE, 2020).

Outro aspecto importante no esteblecimento do biofungicida é o uso de aditivos que mantenham sua eficiência a campo. Vários autores relatam que a perda de eficiência de bioprodutos é muito frequente no campo, especialmente em função de baixas na umidade. Umidade relativa inferiores a 85-90% causam impactos importantes sobre a eficiência dos bioprodutos e por esse motivo o uso de aditivos como surfactantes é fundamental. Detergentes por exemplo são muito eficientes para aumentar a eficiência dos biológicos a campo.uma vez que proporcionam maior aderência dos esporos e também influenciam negativamente no crescimento dos patógenos.

Por fim é importante ainda determinar a forma de uso do biofungicida que pode variar bastante. É possível tratar sementes no caso de doenças de semente e patógenos do solo; realizar o tratamento do solo no momento do plantio ou antes para patógenos do solo; efetuar o tratamento de raízes com incubação em solução de esporos; usar o aplicação foliar para patógenos foliares; ou ainda optar por uma estratégia combinada de formas de uso. O uso de estratégias combinadas de uso frequentemente resulta em ganhos significativos na eficiência do biocontrole como por exemplo, o alcançado com a combinação de tratamento de

sementes e aplicação foliar de *T. viride* para controlar a incidência de *Alternaria cucumerina* (revisado por BABBAL; KHASA, 2017).

Quando pensamos no uso de produtos que tem como base seres vivos é importante considerar a cima de tudo que o uso desses produtos certamente não apresentará eficiência constante em ambientes muito distintos. Isso é esperado já que os organismos adaptam-se aos seus ambientes. Inclusive, agentes de biocontrole apresentam considerável variabilidade quanto a sua eficiência de biocontrole entre diferentes cepas do mesmo agente e por esse motivo podem ser prospectados em diferentes regiões ou ambientes. Da mesma forma, os patógenos por eles controlados poderão apresentar isolados mais sensíveis e menos sensíveis a determinadas cepas do agente de biocontrole usado no desenvolvimento do produto. Além disso, todo biofungicida é um produto destinado a prevenção. Assim, seu potencial de preventivo irá certamente depender do tempo entre a aplicação e a chegada do patógeno, o que é difícil de especificar à campo mas, no laboratório, já foi evidenciado por exemplo aumento na eficiência em mais de 20% em função de variações no momento de aplicação (BEN-SHALOM et al., 2003).

Por outro lado, o uso de bioprodutos não vivos, ou seja, aqueles a base de compostos naturais parece ser um desafio ainda maior para o desenvolvimento comercial de produtos. Isso acontece porque esses compostos são produzidos muitas vezes em condições muito específicas e em concentrações baixas que dificultam sua extração em uma escala comercial (MARTINEZ, 2012). Uma das formas de se lidar com essa limitação da extração de produtos naturais é o desenvolvimento de fórmulas semi-sintéticas nas quais novos produtos sintéticos são sintetizados pelas empresas tendo como base a ação do composto natural, como por exemplo o fluidioxonil, um fungicida usado para controle de *B. cinera* que tem como base um antibiótico natural produzido por *Pseudomonas* e outros agentes (CLOUGH, 2000).

Uma vez vencidas as etapas de determinação da produção massal e da formulação o produto deve retornar aos testes de campo para determinação de sua eficiência ou ainda para avaliação de uso de estratégias distintas de aplicação.

As últimas etapas do desenvolvimento do produto biológico são realizadas junto aos órgãos competentes: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (CROPLIFE, 2020). No início da sua implantação no Brasil, os produtos biológicos obedeciam às mesmas regulamentações destinadas aos agrotóxicos. No entanto, a medida que as organizações mundiais foram entendendo que as regulamentações destinadas aos agrotóxicos não eram aplicáveis aos biológicos, que por sua vez requeriam outros tipos de testes, houve mudança desse cenário no Brasil (decreto de agrotóxicos 4.074-02). Um histórico dessa mudança bem como um passo a passo detalhado das etapas que vão do registro especial temporário (RET) ao registro definitivo são apresentados na publicação da embrapa recursos genéticos e biotecnologia (2004). O produto demora em torno de cinco anos para ser finalizado e comercializado, sendo o investimento total estimado em 2019 de cerca de US $7 milhões (MARRONE, 2019).

O Brasil hoje possui 52 biofungicidas registrados para uso comercial desenvolvidos a partir dos agentes biológicos: *Bacillus velezensis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma asperellum, Trichoderma harzianum, Clonostachys rósea* e *Trichodermax* EC (MAPA, 2020). Entre as empresas do setor estão desde grandes multinacionais até pequenas empresas regionais que têm vivido nos últimos anos o grande crescimento do setor.

3.2.4 Considerações finais e Perspectivas Futuras

O setor dos produtos biológicos está crescendo cada vez mais, e as perspectivas futuras são maiores ainda. Isso se deve aos avanços das tecnologias e a busca por uma agricultura mais sustentável, que trará melhorias na qualidade de vida do homem do campo, e de modo consequente, a população em geral, que irá consumir um produto com menor quantidade de defensivos químicos ou até mesmo, livre deles no caso da agricultura orgânica. Só os produtos microbiológicos, onde inserem-se os biofungicidas, devem vivenciar um ganho de mercado estimado em 70% até o ano de 2050.

O sucesso para os produtos em desenvolvimento deverá vir do refinamento nas etapas de produção e formulação bem como no estabelecimento de estratégias integrativas de aplicação que proporcionem a combinação de diferentes agentes de biocontrole compatíveis e/ou da combinação de mecanismos de antagonismo, combinação de diferentes métodos de aplicação e ainda uma possível integração a químicos já estabelecidos. Embora o objetivo inicial de desenvolvimento de um bioproduto não seja seu uso combinado a químicos sintéticos, esse tipo de estratégia pode aumentar os efeitos benéficos do biológico e reduzir o uso de químicos sintéticos, o que já é um ganho. Nesse caso, é claro, estudos devem ser conduzidos no sentido de avaliar a compatibilidade doproduto biológico com os sintéticos. Além disso, deve-se também levar em consideração a taxa de incidência da doença na região de forma a avaliar se a integração com químicos sintéticos oferecerá mais ganhos que prejuízos. A estratégia de uso do biofungicida certamente será determinante na evolução da resistência do patógeno alvo, assim quanto mais diversificada a estratégia, menora velocidade de evolução dessa resistência. De forma análoga, quanto mais pontual, como por exemplo no caso de uso de compostos naturais, mais rápido se dá esse processo.

No futuro próximo teremos ainda produtos biológicos produzidos a partir de engenharia genética, onde genes que aumentam a eficiência do biocontrole serão isolados e inseridos nos genomas dos agentes biológicos como já relatado por alguns autores (DJONOVIC et al., 2007, MCDOUGAL et al., 2012). Tal estratégia, entretanto, deverá pesar os benefícios dos ganhos com a tecnologia em relação aos prejuízos que certamente virão da associação de uma tecnologia “amiga do ambiente” ao desenvolvimento de um organismo geneticamente modificado (OGM).

Por fim, vale destacar que os biofungicidas proporcionam maior retorno financeiro as empresas quando comparados aos químicos sintéticos e que, muito importante, são comercializados a valores menores. Assim, além de todos os benefícios que essa tecnologia pode trazer a saúde humana e ambiental, o uso de bioprodutos ainda pode ser considerado uma estratégia mais sustentável em termos de redução dos custos da produção. Certamente pela somatória desses fatores a adoção de biodefensivos movimentou mais de U$5 bilhões em 2020 com

crescimento de 14,4% ao ano, principalmente evidenciado em países da União Europeia e nos Estados Unidos, mas, entre os países da América Latina, o Brasil é líder na adoção de biodefensivos (croplife https://croplifebrasil.org/produtos-biologicos/).

REFERÊNCIAS

ALBERGONI, L., PELAEZ, V. Da revolução verde à agrobiotecnologia: ruptura ou continuidade de paradigmas?. **Revista de Economia**, v. 33, n. 1, 2007.

ALTINTAS, A., TABANCA, N., TYIHÁK, E., OTT, P.G., MÓRICZ, A. M., MINCSOVICS, E., WEDGE, D. E. Characterization of volatile constituents from Origanum onites and their antifungal and antibacterial activity. **Journal of AOAC International**, v. 96, n. 6, p. 1200-1208, 2013.

BABBAL, A., KHASA, Y. P. Microbes as Biocontrol Agents. In: Kumar V., Kumar M., Sharma S., Prasad R. (eds,) **Probiotics and Plant Health**, Springer, Singapore, 2017.

BARROS, B. Há 40 anos, DDT precipitou restrições. **Valor Econômico**, São Paulo, v. 22, p. B12, 40. 2010.

BEN-SHALOM, N.; ARDI, R.; PINTO, R.; AKI, C.; FALLIK, E. 2003. Controlling gray mould caused by Botrytis cinerea in cucumber plants by means of chitosan. **Crop Protection**, v. 22, n. 2, p. 285-290, 2003.

BERTI FILHO, E., MACEDO, L. P. M. **Fundamentos de controle biológico de insetos-praga,** 2011.

BETTIOL, W., GHINI, R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. **Embrapa Meio Ambiente -** Capítulo em livro científico (ALICE), 2003.

BETTIOL, W. *et al*. Controle biológico de doenças de plantas na América Latina. **Embrapa Meio Ambiente-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2008.

BHATTACHARJEE, R., Dey, U. An overview of fungal and bacterial biopesticides to control plant pathogens deseases. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 17, p.1749-1762, 2014.

BRAUER, V. S., REZENDE, C. P., PESSONI, A. M., DE PAULA R. G., RANGAPPA, K. S., NAYAKA, S. C., GUPTA, V. K., ALMEIDA, F. Antifungal agents in agriculture: Friends and foes of public health. **Biomolecules**, v. 9, n. 10, p. 521, 2019.

BRENT, K. J., HOLLOMON, D.W. Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed? Bristol: **University of Bristol**, 2007.

BUENO, R.C., YAMAMOTO, P., MOUZINHO, M., BUENO, N. Occurrence of Helicoverpa armigera (hÜbner, 1808) on citrus in the state of Sao Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, 2014.

CALVO, H., MARCO, P., BLANCO, D., ORIA, R., VENTURINI, M.E. Potential of a new strain of Bacillus amyloliquefaciens BUZ-14 as a biocontrol agent of postharvest fruit diseases. **Food Microbiology**, v. 63, p. 101-110, 2017.

CLOUGH, J. M. The strobilurin fungicides-from mushroom to molecule to market. **Special Publication – Royal Society of Chemistry**, 257, 277-282, 2000.

COOK, R.J. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. **Annu Rev Phytopathol**, v. 31, p. 53–80, 1993.

CROPLIFE. Disponível em: https://croplifebrasil.org/. Acessado em 06 de julho de 2021.

DE CARVALHO, M.C.C.G.; ZENY, E.P.; CARRETTS, L.A. Protocolo de patente de invenção junto ao INPI. 28 de julho de 2021. **Instituto Nacional de Propriedade Industrial**. BR 1020200153234A2.

DINIZ, F. R., RODRIGUES, K. F., ROSSI, M. M. Produção do parasitoide *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) para controle biológico da broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*)(Lepidoptera: Crambidae). **Nucleus**, n. 1, p. 1-10, 2008.

DJONOVIC S, VARGAS WA, KOLOMIETS MV, HORNDESKI M, WIEST A, KENERLEY CM. A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. **Plant Physiol**, v. 145, p. 875–889, 2007.

FiBL-IFOAM-SOEL. Disponível em https://statistics.fibl.org/. Acessado em 06 de junho de 2021.

FISHER M. C., HENK D. A., BRIGGS C. J., BROWNSTEIN J. S., MADOFF L. C., MCCRAW S. L., et al. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. **Nature**, v. 484, p. 186–194, 2012.

FONTES, E.M.G., VALADARES-INGLIS, M.C. Controle biológico de pragas da agricultura. Brasília, DF, **Embrapa,** p. 510, 2020.

FAO. Global trade in food and agricultural products more than doubles in last two decades. 2020 [23 September 2020]. Disponível em http://www.fao.org/news/story/en/item/1309369/icode/. Acessado em 10 de julho de 2021.

GONÇALVES, L. Fatos históricos do controle biológico. **Floresta e Ambiente**, v. 3, p. 96-101, 1996.

HANDELSMAN, J. Future trends in biocontrol. **Biological control of crop diseases**. New York, NY: Marcel Dekker, p. 443–448, 2002.

HJELJORD, L., GUNN, B., STRØMENG, M., BULLET, A., TRONSMO, A., BULLET, A., SØNSTEBY, A., STENSVAND, A. Attempts to Reduce Strawberry Grey Mould (Botrytis cinerea) in Norway Using Fungal Antagonists, **The European Journal of Plant Science and Biotechnology**, v. 5, n.1, p. 78-85, 2011.

INAMASU, R. Y.., BERNARDI, A. C. C. Agricultura de precisão. **Embrapa Instrumentação-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2014.

ITO, M. F. Principais doenças da cultura da soja e manejo integrado. **Nucleus**, v. 10, n. 3, p. 83-101, 2013.

ITURRIAGA, L.; OLABARRIETA, I.; MARAÑÓN, I.M. 2012. Antimicrobial assays of natural extracts and their inhibitory effect against Listeria innocua and fish spoilage bacteria, after incorporation into biopolymer edible films. **International Journal of Food Microbiology**, v. 158, n. 1, p.58-64, 2012.

JEYARAJAN, R. Prospects of indigenous mass production and formulation of *Trichoderma.* In: **Current status of biological control of plant diseases using antagonistic organisms in India**, 2006.

JUNAID, J. M., BHATTA, D. N., BHATMA, B. Commercial biocontrol agents and their mechanism of action in the management of plant pathogens. **Int J Mod Plant Anim Sci**, v. 1, p. 39–57, 2013.

KIM, H. S., PARK, J. Y., CHOI, S. W., CHOI, K. H., LEE, G. P., BAN, S. J., LEE, C. H., KIM, C. S. Isolation and Characterization of Bacillus Strains for Biological control. **Journal of Microbiology**, v. 41, n.3, p. 196-201, 2003.

KLITTICH, C. J. Milestones in fungicide discovery: chemistry that changed agriculture. **Plant Health Progress**, v. 9, n. 1, p. 31, 2008.

KÖHL, J., KOLNAAR, R., RAVENSBERG, W.J. 2019. Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 845, 2019.

KOVALESKI, A., BOTTON, M., NAKANO, O., VILELA, E. F., EIRAS, A. E. Concentração e tempo de liberação do feromônio sexual sintético de *Bonagota cranaodes* (Meyrick)(Lepidoptera: Tortricidae) na cultura da macieira. **Neotropical Entomology**, v. 32, p. 45-48, 2003.

KUMAR, S., THAKUR, M., RANI, A, *Trichoderma*: mass production, formulation, quality control, delivery and its scope in commercialization in India for the management of plant diseases. **Afr J Agric Res**, v. 9, p. 3838–3852, 2014.

LARGE, E. C. Control of potato blight (*Phytophthora infestans*) by spraying with suspensions of metallic copper. **Nature**, v. 151, n. 3820, p. 80-81, 1943.

LEWIS, J.A. Formulation and delivery system of bio-control agents with emphasis on fungi. In: **The rhizosphere and plant growth**, Springer, Dordrecht, pp 279–287, 1991.

MAPA. Disponível em https://www.gov.br/agricultura/pt-br. Acessado em 06 de julho de 2021.

MARRONE, P.G. Pesticidal natural products – status and future potential. Pest Management Science, v. 75, n. 9, p. 2325-2340, 2019.

MATOS, A. K. V. Revolução verde, biotecnologia e tecnologias alternativas. **Cadernos da FUCAMP**, v. 10, n. 12, p. 1-17, 2011.

McDOUGAL R., STEWART A., BRADSHAW R. Transformation of *Cyclaneusma minus* with green fluorescent protein (GFP) to enable screening of fungi for biocontrol activity. **Forests**, v. 3, n. 1, p. 83-94, 2012.

MORRISSEY, J. P., DOW, J. M., MARK, G. L., O'GARA, F. Are microbes at the root of a solution to world food production? Rational exploitation of interactions between microbes and plants can help to transform agriculture. **EMBO Rep**, v. 5, n. 10, p. 922-926, 2004.

OLIVEIRA-FILHO, E. C., FARIA, M DE R, CASTRO, M.L.M.P. Regulamentação de produtos biológicos para controle de pragas agrícolas. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, p. 34, 2004.

PAPAVIZAS, G. C. Trichoderma and Gliocladium: biology, ecology, and potential for biocontrol. **Annual review of phytopathology**, v. 23, n. 1, p. 23-54, 1985.

PARRA, J. R. P. et al. Controle biológico: terminologia. **Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores. São Paulo. Manole editora**, p. 1-16, 2002.

PRASAD RD, RANGESHWARAN R, ANUROOP CP, PHANIKUMAR PR. Bioefficacy and shelf life of conidial and chlamydospore formulation of *Trichoderma harzianum*. **J Biol Control**, v. 16, p. 145–148, 2002.

PRASAD, R. D., RANGESHWARAN, R. Shelf life and bioefficacy of *Trichoderma harzianum* formulated in various carrier materials. **Plant Dis Res**, v. 15, p. 38-42, 2000.

SHUPING, D. S. S.; ELOFF, J. N. The use of plants to protect plants and food against fungal pathogens: A review. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 14, n. 4, p. 120-127, 2017.

SOUZA, J. I. T., SCHAFER, J.T., CORRÊA, B. O., FUNCK, G. D., MOURA, A. B. Expansion of the biocontrol spectrum of foliar diseases in rice with combinations of rhizobacteria. RCA **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, n. 3, 2017.

USTA, C. 2013. Microorganisms in Biological Pest Control — A Review (Bacterial Toxin Application and Effect of Environmental Factors), **Current Progress in Biological Research**, Marina Silva-Opps, IntechOpen, 2013.

WOO, S. L., RUOCCO, M., VINALE, F., NIGRO, M., MARRA, R., LOMBARDI, N., PASCALE, A., LANZUISE, S., MANGANIELLO, G., LORITO, M. *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. **Open Mycol J**, v. 8, p. 71–126, 2014.

ZENY, E. P. Potencial de uso de controle biológico para a ferrugem-asiática da soja. **Dissertação apresentada ao programa de mestrado em agronomia – UENP**, Bandeirantes, 2020.

Artigo submetido para publicação na revista Biocontrol

4. CAPÍTULO 2

A Biological Control Agent for Asian Soybean Rust

4.1 ABSTRACT

Soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* (Sydow & Sydow), is the most destructive disease for this crop. Control strategies include fungicide applications, the use of less susceptible cultivars and the establishment of soybean-free periods. However, rust control in the field has been mainly impared by the loss of efficiency of fungicide. In addition, interest in products that use fewerchemical pesticides and reduce their impact on the environment is increasing. Recently, we isolated a fungi strain growing voluntarily on rust sporulating uredinias and showing a inhibition effect on its development. We characterized theisolated strain based on morphological characteristics and multi- locus phylogeny as *Talaromyces funiculosus* (Thom) Samson, Yilmaz, Frisvad & Seifert. Further, biocontrol assays were done in order to validate our initial hypothesis. The potential of biocontrol activity was evaluated using spore suspension and fermentation extract. All tests showed statistically significant disease control rates varying in efficiency from 19% - 97% according to the methodof biocontrol application used and experimental condition. Scanning electronmicroscopy was used to observe the development of *P. pachyrhizi* under biological control assays evidencing mycoparasitism and the collapse of rust urediniospores under both treatments, spore suspension and fermentation extract solution. In general, our results supportthe hypothesis that the isolated strain of *Talaromycesfuniculosus* functions as a biological control agent of *P. pachyrhizi* development and therefore can be used in the development of microbiological and biochemical formulations for soybean rust control.

Key words: Eurotiales:Trichocomaceae, Pucciniales: Phakopsoraceae, biopesticide, mycoparasitism.

4.2 Introduction

The soybean crop in the 2020/2021 harvest reached a world production of 362.947 million tons with a planted area of 127.842 million hectares (USDA 2022). The biggest health challenge for crop production is soybean rust caused by the biotrophic fungus, Phakopsora pachyrhizi Sydow & Sydow (Pucciniales: Phakopsoraceae). This pathogen infects soybean leaves causing losses of up to 80% due to photosynthetic losses at the multiple sites where rust lesions form (ROSA et al. 2015).

The main management practices used to disease control are i) the application of chemical fungicides, which imposes additional costs on production, ii) the establishment of soybean-free periods, to reduce the inoculum pressure in the field, and iii) the use of early-maturing cultivars, since there are no varieties with durable resistance to rust (GODOY et al. 2016). Undoubtedly, successive applications of chemical fungicide is the most widely used form of rust control. However, this unrestricted practice has led to the selection of P. pachyrhizi mutants with reduced sensitivity to currently available chemical groups (SCHMITZ et al. 2013). Overall, this scenario reveal how difficult the sustainability of soybean culture can be without the association of other rust control strategies (GODOY et al. 2016). Furthermore, the use of chemical fungicides imposess otherdeleterious issues from health problems to changes in soil quality with consequent problems to agriculture (ALENGEBAWY et al. 2021). Alternative strategies such as the use of biopesticides are being investigated (PANDIT et al. 2022).

The term biopesticide can be used to define organisms or substances derived from organisms that are used for crop protection. Biopesticides can be represented by microbial products, that are composed by the organisms or biochemical products, which are represented by naturally occurring substances or its synthetically derived equivalents. Genetically modified organisms that are engineered to produce plant-incorporated protectants (PPIs) are also considered biopesticides (RUIU 2018). Regardless of the category of a biopesticide, the nature of their specific action *per si* makes them environmentally safer and a promising future to agriculture (MAHMOOD et al. 2016). Overall, biopesticides may involve one or more mechanisms of action and their interactions, such as antibiosis through the

production of secondary metabolites, competition, mycoparasitism, predation, hypovirulence, growth promotion in plants and induction of host defense (LAHLALI et al. 2022).

Most biofungicides are derived from live microorganisms, mainly from Pseudomonas spp. (Pseudomonadales: Pseudomonadaceae) , Bacillus spp. (Bacillales: Bacillaceae), Burkholderia spp. (Burkholderiales: Burkholderiaceae), and Trichoderma ssp. (Hypocreales: Hypocreaceae) (Lahlali et al. 2022). However, other biological control agents as Penicillium spp. (Eurotiales: Trichocomaceae) and Talaromyces spp (Eurotiales:Trichocomaceae) have been extensively tested for their ability to exert beneficial effects on plants (ABBAS et al. 2021). A very diverse set of secondary active metabolites produced from Penicillium ssp., *Talaromyces* ssp showing antifungal and insecticide acativity have been identified (NICOLETTI et al. 2018). *Talaromyces* ssp. function as plant growth promoting, mycoparasit, and promotes the induction of defense-related genes (DETHOUP et al. 2018; ABBAS et al. 2021).

Until know there are no biological products designed for soybean rust control commercially available and theliterature is scarce concerning the potential of exploration of biological control strategies for soybean rust management. *Simplicillium lanosoniveum* Grams, *Trichothecium* ssp. (Hypocreales), *Tuberculina* ssp. (Hypocreales), and *Verticillium* ssp. (Plectosphaerellaceae) were all identified as hyperparasites of P. pachyrhizi urediniospores (SAKSIRIRAT; HOPPE, 1991, WARD et al. 2012) and bacterial strains of Bacillus and Pseudomonas were able to reduced P. pachyrhizi infection (DORIGHELLO et al. 2015, DOS SANTOS et al. 2021).

In this study, we isolated a fungi strain named BCA1.1 (biocontrol agent strain 1.1) which grow over rust lesions on soybean leaves and tested the hypothesis that BCA1.1 could interfere on *P. pachyrhizi* development, reducing disease severity. Rust severity was reduced in soybean exposed to BCA1.1 spore suspension or to its fermentation extract.

4.3 Material and Methods

4.3.1 Microorganisms

P. pachyrhizi spore suspensions were prepared from naturally infected soybean plants growing in a field at Ponta Grossa (Latitude: 25° 5' 40" South, Longitude: 50° 9' 48" West), Paraná, Brazil in 2019 and stored at -80 ºC until use. Spore concentration was adjusted with sterile water to $1x10^5$ spores mL^{-1} and Tween 20 (0.01%) for dispersing. The BCA strain inoculum was obtained from colonies that grew spontaneously on sporulating rust lesions in a system of co-cultivation on detached soy leaves inoculated with *P. pachyrhizi*s. BCA strain colonies were collected and purified by subculturing on PDA medium plates incubated at 24±2 ºC until and then used to generate a monosporic isolate (BCA1.1).

4.3.2 Morphological characteristics of BCA1.1

For macromorphologic characterization, the purified BCA1.1 isolate was placed in three-point fashion onto the Czapek yeast extract agar (CYA), malt extract agar (MEA), dichloran 18 % glycerol agar (DG18), oatmeal agar (OA), yeast extract sucrose agar (YES) and creatine sucrose agar (CREA) medias (SAMSON et al. 2010), using 90 mm Petri dishes. Colonies were maintained for 7 days of incubation at 25°C in the dark. After, morphological parameters as mycelia color, topology, reverse color, and production of exudates and soluble pigments were noted. The 7-day old colonies growth on MEA media were also used for the observation of micromorphological characters with a light microscope (YILMAZ et al. 2014).

4.3.3 Molecular identification of BCA1.1

Genomic DNA of BCA1.1 was extracted following the CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) method with slight modifications (VOIGT et al. 1999). PCR amplifications were carried out for the barcodes internal transcribed spacer region (ITS) using the primers ITS1/ITS4 and β-Tubulin (BenA) using the primers Bt1a/Bt1b as previously described (WHITE et al. 1990; GLASS; DONALDSON, 1995). Sequences were submitted to blast(n) analysis in the National public database Center for Biotechnology Information (NCBI). The obtained contigs of BCA1.1 were included in a data set composed of all reference sequences for *Talaromyces* section *Talaromyces* obtained from Yilmaz et al.

(2014) (Online resouce 1). The dataset for each contig was individually alingned using the MUSCLE software included in the MEGA v. 11 (TAMURA et al. 2021). Then, a concateneted tree was generated using the best-fit model Kimura 2-parameter + G2 (K2 + G) according to BIC for the combined gene datasets, and a neighbor-joining tree was constructed using the combined data with default parameters in MEGA 11. *T. purpureus* and *T. rademirici* were used as outgroups *(Talaromyces* sect. purpurei) for *Talaromyces* sect. *Talaromyces* and *Trichoma paradoxa* (Eurotiales: Trichocomaceae) and *Penicillium chrysogenum* were selected as outgroups for the *Talaromyces* genus. Statistical confidence for the phylogeny tree was tested by the bootstrap method using 1,000 replicates.

4.3.4 Evaluating rust control by BCA1.1

BCA1.1 inoculum production

We used different methods to prepare BCA1.1 treatments as follows. One treatment utilized a BCA1.1 spore suspension (SS) obtained from PDA plates using autoclaved distilled water at a concentration of $1x10^5$ spores mL^{-1} and Tween20 dispersant (0.01%). The other three methods used the supernatant of liquid PD medium after BCA1.1 growth, i.e. the fermentation extract (FE). For these treatments 1 ml of the spore suspension ($1x10^5$ spores mL^{-1}) was inoculated on 80 ml of PD medium in a 250 ml Erlenmeyer flask left under 24 ± 2 ºC and constant agitation for 72 hours. The fermentation extract was centrifuged at 4,000 rpm in a 15 mL Falcon tube for 25 minutes, the supernatant was collected with a 10 mL syringe; filtered with a PES membrane of 0.22 µm and autoclaved. This fermentation extract solution was used pure (PFE) and diluted to 1:10 (FE1:10) in biocontrol assays. All experimental tests designed for the investigation of the biocontrol potential of BCA1.1 over *P. pachyrhizi* used a chemical standard treatment with the commercial product based on copper oxychloride Status® (concentration of 588 g a.i. L^{-1}).

4.3.5 P. pachyrhizi spore germination inhibition assay

Spore germination inhibition tests were done on 1% water-agar Petri dishes. A suspension of 200 µL *P. pachyrhizi* spores (see microorganisms**)** was distributed

in petri dishes plus 200 µL of each BCA1.1 treatments, spore suspension (SS), pure fermentation extract (PFE), fermentation extract (FE) 1:10. Five replicates were performed for each treatment. Plates were incubated for 12hrs in the B.O.D incubator (Biochemical Oxygen Demand) with a controlled temperature of 24 ºC and in the absence of light. Readings were taken using a binocular optical microscope with 100x magnification. We considered as germinated spores only those in which the length of the germ tube was twice the size of the *P. pachyrhizi* spore. The values were represented in percentage of spores germinated and converted to percentage of rust control.

4.3.6 BCA1.1 rust control on soybean detached leaves

The leaves used were obtained from soybean plants (M 5917 Ipro) grown in five-liter pots under irrigation in a rust-free greenhouse. Leaves were collected from the third trefoil, were washed in running water, followed by immersion in a 2.5% (v/v) acetic acid solution for 15 minutes and then left in distilled water to rinse for thirty minutes. Then, each leaf was positioned with the upper side in contact with the medium (1% water-agar). In order to maintain the agar humidity and to guarantee the leaves longevity, a small portion of sterile cotton was used and moistened with autoclaved distilled water every two days. BCA1.1 treatments, SS, PFE and FE 1:10 were all applied preventively to *P. pachyrhizi* inoculation. After 24 hours we sprayed the *P. pachyrhizi* spore's suspension on soybean leaves. Forthe control treatment, only *P. pachyrhizi* spore's were sprayed on soybean leaves.We also maintained soybean leaves without *P. pachyrhizi* inoculation as a false inoculated treatment to guarantee the absence of a preliminary rust occurrence. Five replicates of each treatment were performed.

Petri dishes were randomly incubated in a BOD with controlled temperature (22 ºC), in the absence of light for only the initial 12 hours to favor spore germination. 21 days after *P. pachyrhizi* inoculation we mensuared rust severity using the diagrammatic scale (GODOY et al. 2006). Based on the severity data, the area under the disease progress curve (AUDPC) was calculated and converted to perentage of rust control.

4.3.7 Rust control in soybean plants treated with BCA1.1

Soybean plants (cultivar M 5917 Ipro) were grown with controlled conditions, in five-liter pots with eight plants in each pot, under irrigation, substrate and fertilization suitable for plant good development in a greenhouse. Plants with six to eight fully expanded trifoliate leaves were sprayed with BCA1.1 treatments (see BCA1.1 inoculum production) followed by *P. pachyrhizi* inoculation (see microorganisms). Inoculation procedures simulated the best possible coverage of leaf canopy, without draining, under temperature conditions below 30 ºC, relative humidity above 50%, no wind, at the end of the afternoon (after 6 pm). To guarantee the germination of rust spores, the spore suspension was sprayed at night and we used moist plastic bags on the plants during the night to provide a moist chamber. The plastic bag was removed the next day. In order to maintain the preventive character of BCA1.1 treatments a second round of inoculation was performed before the first rust sporulation cycle, which occurred 18 days after the *P. pachyrhizi* inoculation. Five repetitions per treatment were arranged entirely randomly inside the greenhouse. Disease severity was evaluated after 36 days post inoculation. Severity data, AUDPC and the percentage of rust control in relation to the control were estimated as previously described.

4.3.8 Ultrastructure of the interaction BCA1.1 and *P. pachyrhizi*

To further observe the ultrastructure of BCA1.1 during interaction with *P. pachyrhizi*, soybean detached leaves inoculated with BCA1.1 and rust spores were observed under electron scaning. For this study only BCA1.1 SS, PFE and control leaves were evaluated. Inoculations were done as previously described (see section BCA1.1 rust control on soybean detached leaves) and 14 days after inoculation soybean leaves were cut into pieces approximately of 0.5cmx 0.5 cm in size on the sites of spores inoculation. Leaves sections were immersed in 4.0% glutaraldehyde (pH7). Then, samples were dehydrated for 30 min each in 30, 50, 70, 80, 90 and 100% ethanol series, and finally dried in a CO2 vacuum, and sputter coated with gold (E-1045,Hitachi,Japan) for SEM examination (S- 4800, Hitachi, Japan).

4.3.9 Statistical Analysis

Phenotypic parameters: AUDPC and percentage of rust control were submitted to Hartley tests, to verify the homoscedasticity of the variances, and Shapiro-Wilk test, to examine the normality of the data. Treatments were submitted to variance analysis and means were compared by Tukey's test ($p < 0.05$) using SASM-Agri software version 8.1 (CANTERI et al 2001).

4.4 Results

4.4.4 BCA1.1 Morphological and Molecular Characterization

Macromorphological characteristics of BCA1.1 were evaluated on CYA, OA, DG18, MEA, YES and CREA media. CYA colonies were substantially sulcate, the mycelia was flat with a green color and raised in the center, the center of the colony was grayish white; the margins were grayish white and the texture floccose. We could see exudates as clear droplets but no pigment production was observed, the reverse of CYA colonies was light orange to brown. MEA colonies showed floccose texture, mycelia white and slightly pink at the center with sparse sporulation and grayish and reverse yellow to reddish. DG18 colonies showed white mycelia and conidia in a dull green mass with exudates as clear droplets. OA mycelia was white to grayish green with light brown at the center; funiculose texture and conidia in grayish mass. Colonies on YES media were slightly raised at the center, sulcate with white mycelia and funiculose texture; CREA colonies were white and granular with strong acid production. In micromorphological observation, conidiophores formed from hyphae showed biverticillate metulae and ellipsoidal conidia with smooth walls (Fig 1).

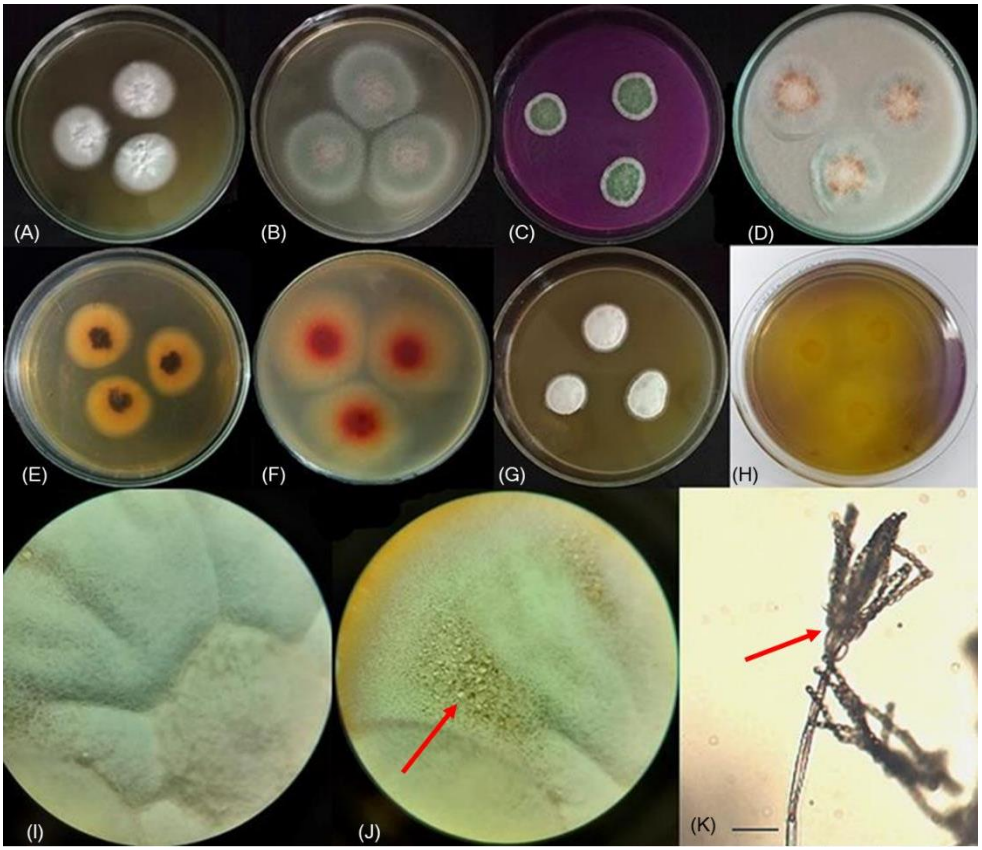

Figure 1: Morphological characters of *Talaromyces funiculosus* strain BCA1.1. Top row: Colonies from left to right on (A) CYA, (B) MEA, (C) DG18 and (D) AO. Middle row: Colonies from left to rigth on (E) CYA reverse, (F) MEA reverse, (G) YES and (H) CREA. Bottom row from left to rigth: (I) Colonytexture on MEA after 1 wk incubation, (J) droplets on DG18, (K) Conidiophores observed on 100xlight microscope. Scale bar 50µm.

Blast(n) analysis for BCA1.1 ITS2 contig revealed identities with sequences identified as *Talaromyces* ssp and *Penicillium* sp. All retrieved sequences showed identities between 97-98% being: *T. funiculosus*, *T. stollii* Yilmaz, Houbraken, Frisvad & Samson, *T. amestokiae* Yilmaz, Houbraken, Frisvad & Samson, and *Penicillium* sp. The BenA contig of strain BCA1.1 shared a similarity of 92- 98 % with *T. stollii*, *T. amestolkiae*, *T. ruber* Yilmaz, Houbraken, Frisvad & Samson, *T. funiculosus* and *Penicillium* sp. Except for the sequence identified in the genbank as *Penicillium* sp, all other sequences similar to our ITS2 or BenA contigs belong to *Talaromyces* section Talaromyces. Multilocus analysis of ITS2 and BenA resulted in a concatenated tree that shared the same topology presented by single-

locus analysis showing *Penicillium chrysogenum* and *Trichocoma paradoxa* Junghuhn as outgroups for all the other branches and *T. purpureus* (E. Muell. & Pacha-Aue) Stolk & Samson and *T. rademirici* (Quintan.) Samson, Yilmaz & Frisvad as an outgroup for *Talaromyces* ssp in the section Talaromyces (Fig 2).

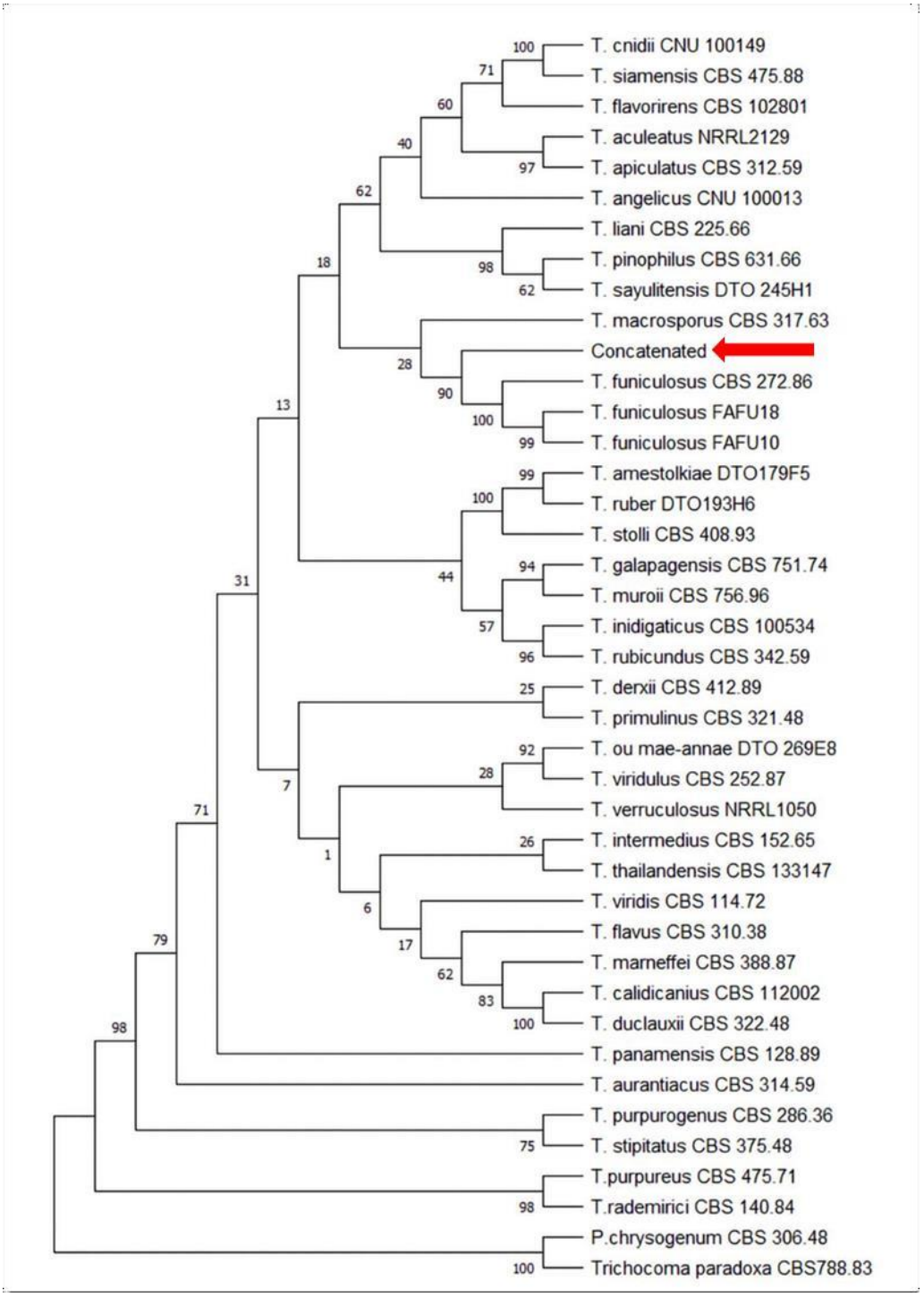

Figura 2: Combined phylogeny of BCA1.1 ITS and BenA sequences. The concateneted (red row) neighbor-joining tree was done using the best-fit model Kimura 2-parameter + G2 (K2 + G) in MEGA 11. Reference sequences of *Talaromyces* ssp. described in Yilmazet al. (2014) were included in the analysis. BCA1.1 combined sequence is named “concatenated” in the tree. *Talaromyces purpureus* and *Talaromyces rademirici* were usedas outgroups for *Talaromyces* section Talaromyces and *Trichocoma paradoxa* and *Penicillium chrysogenum* were selected as outgroups for *Talaromyces* genera. Statistical confidence for the phylogeny tree was tested by the bootstrap method using 1,000 replicates

BCA1.1 formed a cluster with the of *T. funiculosus* reference sequences with a bootstrap support of 90%. The concatenated phylogeny resulted in the formation of a higher clade where the BCA1.1 sequence was positioned. This clade was

subdivided into two new clades, one being composed by BCA1.1 and *T. funiculosus* sequences. T. purpurogenus Samson, Yilmaz, Houbraken, Spierenburg, Seifert, Peterson, Varga & Frisvad complex was also evidenced by a clade formed by *T. amestolkiae*, *T. ruber* and *T. stolli* sequences (Fig. 2).

4.4.5 Evaluating rust control by BCA1.1

P. pachyrhizi spore germination inhibition assay

Both, BCA1.1 and rust inoculums used in the biocontrol assays showed high germination rates, above 80%. The chemical treatment resulted in complete inhibition of rust spore germination in petri dishes, showing the highest rate of control (100%). The treatments derived from the BCA1.1 strain also showed significant reductions in the *P. pachyrhizi* germination rates. SS treatment resulted in 74% of control while PFE and FE1:10 treatments showed rates of 90% and 76%, respectively. Overall, the best rate of biocontrol was obtained from the PFE treatment (Fig 3A and 3B).

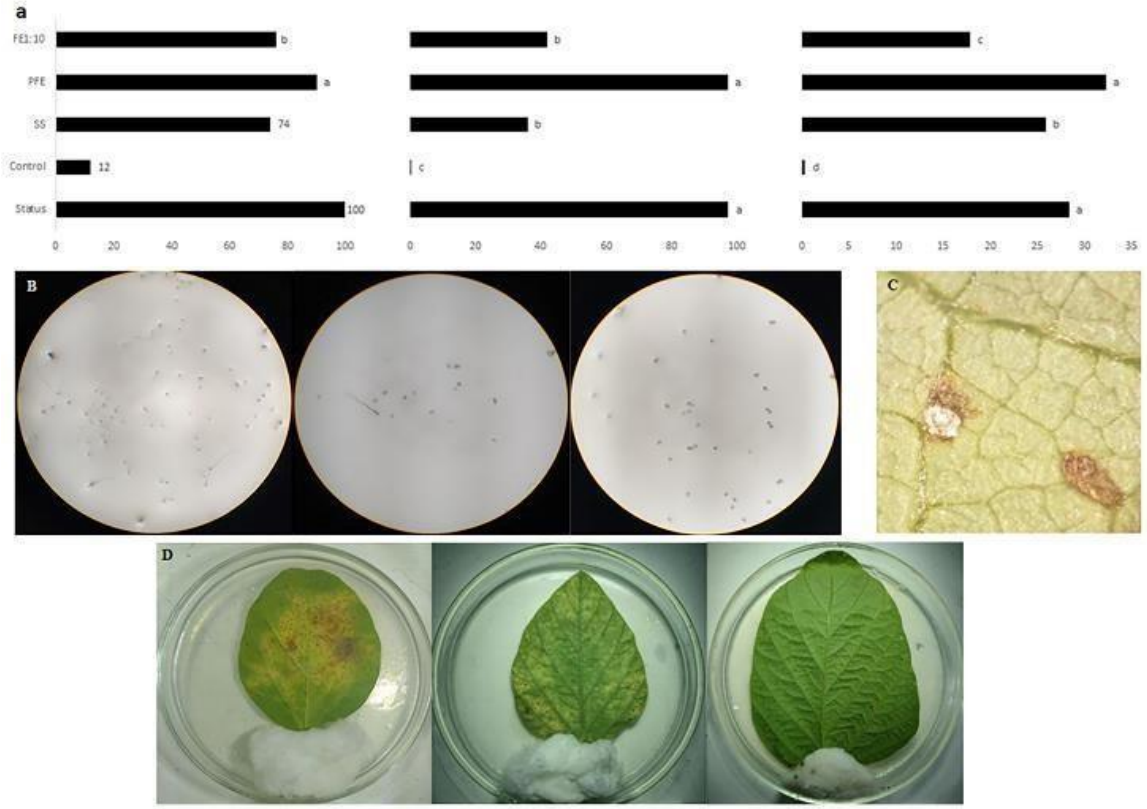

Figura 3: Phenotypic evaluation of rust control by *Tlaromyces funiculosus* strain BCA1.1. (A) Percentage of rust control by BCA1.1 from left to rigt: *P. pachyrhizi* spore germination inhibition assay, deteched soybean leaves and greenhouse experiment. (B) *P. pachyrhizi* spore germination inhibition assay, from leaft to right: control, BCA1.1 spore suspension (SS) and BCA1.1 pure fermentation extract (PFE) treatment. (C) *Talaromyces funiculosus* growing over rust lesion. (D) Rust control on soybean deteached leaves, from left to right: control, BCA1.1 spore suspension, BCA1.1 PFE treatment.

4.4.6 BCA1.1 rust control on soybean detached leaves

Soybean false inoculated leaves showed no development of rust symptoms during the assay, confirming the absence of *P. pachyrhizi* in the leaves collected for the treatment's establishment. The chemical treatment was most efficient showing 97% rust control. The biocontrol treatments also resulted in significant rust control percentages ranging from 36% to 97% (Fig 3A). The lowest control efficiency in the detached leaves assay was obtained from SS treatment (36%) while the highest rate was obtained from PFE (97%) (Fig 3A and 3D). In leaves treated with the BCA1.1 SS, it was possible to observe the development of BCA1.1 on rust lesions, thus suggesting its mycoparasitic action on *P. parchyrizhi* (Fig 3C). Soybean leaves inoculated only with *P. pachyrhizi* showed the expected

characteristic of rust lesions, without the whitish color observed in the lesions of BCA1.1 treatment (Fig 3D).

4.4.7 Rust control in soybean plants treated with BCA1.1

The falsely inoculated soybean plants showed no rust lesions during the experiment while in control plants it was possible to observe rust lesions at 10 dpi. Under greenhouse conditions all the treatments used were statistically efficient in rust control. The chemical treatment and the treatment with PFE were equally efficient showing rust control rates of 28% and 32%, respectively (Fig 3A). Thus, the copper oxychloride treatment showed a clear reduction in its effectiveness under greenhouse conditions compared to the petri dishes assays while the biocontrol treatments maintained significant control rates.

4.4.8 Ultrastructure of the interaction BCA1.1 and P. pachyrhizi

Scanning electron microscope observation of soybean leaves during interaction of BCA1.1 *T. funiculosus* strain and *P. pachyrhizi* was evaluated at 14 days post inoculation and showed that BCA1.1 can act as a *P. pachyrhizi* mycoparasite. BCA1.1 hyphae growths surrounding rust urediniospores and evolving then into a web of collapsed *P. pachyrhizi* spores (Fig 4A, D-F). In addition, the PFE although free of BCA1.1 fungal structures, also resulted in the observation of collapse *P. pachyrhizi* urediniospores as seen in Fig 4B and 4C.

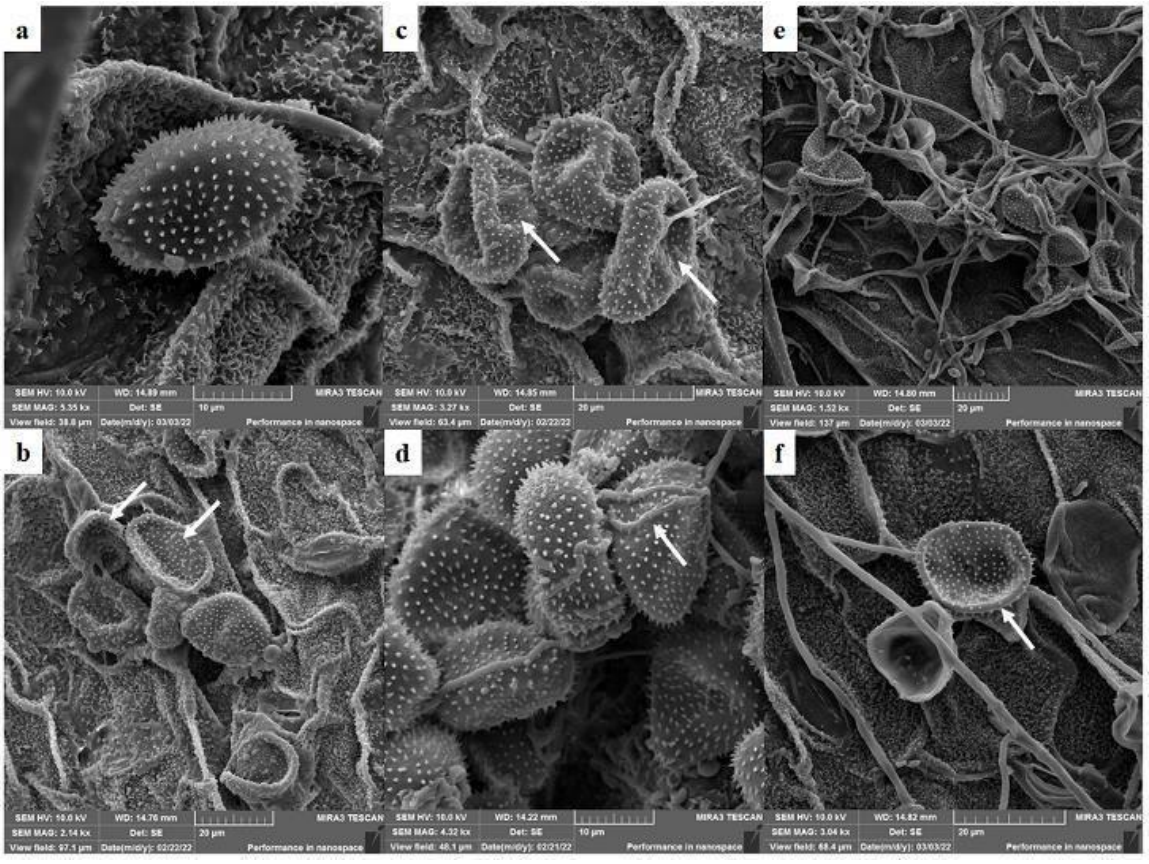

Figura 4: Electron microscope scanning of the mycoparasitic colonization of P. parchyrizhi urediniospores by Talaromyces funiculosus strain BCA1.1. (A) Control treatment - rust urediniospores in normal shape. (B and C) Pure fermentation extract treatment (PFE) - shriveled P. parchyrizhi urediniospores (white rows). (D – F) BCA1.1 spores suspension (SS) treatment - mycoparasitic infection of P. parchyrizhi urediniospores (white row), note the shriveled urediniospores (white rows).

4.5 Discussion

Talaromyces is a monophyletic genus, divided into seven sections and consisting of polyphagous sexual, asexual and both sexual and asexual species. This genus is found in food, fruits, cereals, air, but mainly in the soil (rhizosphere), including soils in agricultural areas (SUN et al. 2022). The *Talaromyces* genus recently came to include the species of the *Penicillium* biverticillium subgenus. This taxonomic reorganization occurred after several studies showed that the asexually reproducing *Penicillium* species classified in the subgenus Biverticillium and the sexually reproducing *Talaromyces* species form a monophyletic clade that is distinct from *Penicillium* sensu stricto. This observation led to the transfer of most species from subgenus *Penicillium* biverticillium to *Talaromyces* (SAMSON et al.

2017). For this reason, the specie species previously named *Penicillium funiculosum*, one of the species of the subgenus biverticillium was renamed as *Talamomyces funiculosus* (YILMAZ et al. 2014).

As observed by micromorphological analysis, the strain BCA1.1 produced biverticillate conidiophores (Fig 1) which exclude its identification as *Penicillium*, although the Blast(n) results returned a sequence identified as *Penicillium* ssp. In view of the reorganization of the genus, and the fact that the other sequences that returned from blast analysis were all attributed to species of the *Talaromyces* sect. Talaromyces, it is possible to suggest that the sequence identified as *Penicillium* ssp. in genbank is actually a sequence of a *Talaromyces* isolate.

The individual phylogenetic trees of BenA and ITS (not shown) as well as the multi-locus phylogeny constructed from the combined BCA1.1 ITS and BenA sequences and the reference sequences for the group strongly indicate that BCA1.1 is a *T. funiculosus* strain (Fig 2). Furthermore, the morphology of conidiophores with subterminal branches, occurrence of ellipsoid conidia, funiculartexture in MEA and OA, presence of sulcate mycelia, the occurrence of exudates as clear droplets in MEA and AO as well as the strong aicd production in CREA, corroborate the molecular identification of BCA1.1 as *T. funiculosus* (Fig 3) (Yilmaz et al. 2014). The ITS and BenA barcodes were recently used to identify isolates of *T. apiculatus* Samson, Yilmaz & Frisvad and proved sufficient for this function (GOH et al. 2020) as in the present study. The ITS region is accepted as the official DNA barcode for fungi (SCHOCH et al. 2012) however, its use alone does not allow some interspecific distinctions in the genus *Talaromyces*. On the other hand, the combined use of phylogenies constructed by the combined ITS and β-tubulin (BenA) sequences was sufficient for the construction of the new sectional classification of the genus and BenA can, according to the authors, be considered as a secondary molecular marker for species identifications in *Talaromyces* (YILMAZ et al. 2014).

The genus *Talaromyces* is important in medicine, both in disease promotion and in the production of anticancer, antibacterial and antifungal compounds (BLADT et al. 2013; ZHAI et al. 2016; NICOLETTI et al. 2018), food industry (YILMAZ et al. 2012), biotechnology and in agriculture (ABBAS et al.

2021). *Talaromyces* ssp. shows plant growth-promoting effects and are able to suppress the development of Fusarium, Colletotrichum, Phytophthora, Rhizoctonia and Sclerotium species (MANOCH; DETHOUP 2011, ABBAS et al. 2021, SUN et al. 2022). The mode of action of *Talaromyces* ssp. includes solubilization and mineralization of essential nutrients, production volatile defense compounds, regulation of phytohormones that control pathogenic microorganisms, direct mycoparasitism, synthesis of antifungal substances, secretion of enzymes that degrade pathogen cell walls and activation of defense pathways in the plant (MADI et al. 1997; MIYAKE et al. 2012; ABDEL-RAHIM; ABO-ELYOUSR 2018; HALO et al. 2019).

T. flavus (Klöcker) Stolk & Samson is one of the most important antagonists of soil pathogens. It is a control agent of *Verticillium* wilt of tomato, eggplant and potato (FAHIMA; HENIS 1995), white mold, Rhizoctonia disease of white potato, bean stem rot (MCLAREN et al. 1986), *Pythium* damping-off, *Fusarium equisetii* (Corda) Sacc disease (HALO et al. 2019), *Rhizoctonia solani* Kühn and *Botrytis cinerea* Pers (ALAGESABOOPATHI 1994; ABDEL-RAHIM; ABO-ELYOUSR, 2018; ABBAS et al. 2021).

An isolate of *Talaromyces funiculosus* obtained from the rhizosphere was identified as a biological control agent for *Colletotrichum capsici* (Schwein.) Andrus & W.D. Moore, a pathogen that causes anthracnose (NAZIYA et al. 2020). *T. funiculosus* was most efficient as a conidial suspension in seed treatment, inducing defense enzymes related to lignin and callose production in the plant. The BCA1.1 strain of *Talaromyces funiculosus*, in the present study was identified as an antagonist of *P. pachyrhizi*. *T. funiculosus* grows on the uredinia of *P. pachyrhizi*, covering them and changing their color pattern to whitish (Fig 3C).

Analysis of scanning electron microscopy images of colonized rust lesions shows that *T. funiculosus* directly parasitizes *P. pachyrhizi* promoting the collapse of urediniospores and significantly reducing rust severity (Fig 2). Similar results were reported by Ward et al. (2012) who identified *Simplicillium lanosoniveum* as a mycoparasite of *P. pachyrhizi*. Three other *Talaromyces* species, *T. pinophilus*, *T. flavus*, and *T. apiculatus* were previously reported to act as mycoparasites of *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani, Sclerotium rolfsii* Sacc, *Verticillium dahliae*

Kleb and *Ganoderma boninense* Pat (Madi et al. 1997; Nicoletti et al. 2018; ABDEL-RAHIM; ABO-ELYOUSR 2018, GOH et al. 2020). Our results indicate *T. funiculosus* acts directly as a mycoparasite of *P. pachyrhizi* but also that metabolites produced by *T. funiculosus* are able to promote the wilting and collapse of rust spores, preventing infection (Fig 2B and 2C). Furthermore, the growth of *T. funiculosus* on rust uredinia creates a network that can act as an obstacle to the spread of rust spores in the plant, interfering with the severity of thedisease.

In trials which both *T. funiculosus* spores and the fermentation extract were applied prior to inoculation with *P. pachyrhizi*, the fermentation extract, especially the pure solution, were significantly more effective in controlling the disease, showing control rates similar to those obtained with the chemical pesticide Status® (Fig 3A). Thus, it is safe to say that in addition to the direct mycoparasitism of rust lesions, other control pathways are exerted by *T. funiculosus*.

Talaromyces species produce a wide variety of bioactive secondary metabolites, mainly identified from *T. flavus*, including alkaloids and peptides, esters, polyketides, quinones, steroid and terpenoids (ZHAI et al. 2016). Among these different classes of metabolites, duclauxin, 3-O-Methylfunicone, chrodrimanin B. pyripyropene A, rugulosin and vermiculine have diverse activities against fungi and arthropods (NICOLETTI; BECCHIMANZI, 2022)

In the preliminary tests, the conidial suspension and the fermentation extract of *T. funiculosus* were efficient to inhibiti the germination of *P. pachyrhizi* spores as well as in the rust control in detached soybean leaves and in soy plants. These results, adding the ultrastructural evidence of the inhibitory action of *T. funiculosus* on *P. pachyrhizi*, spurred the create new partnerships with the perspective of developing commercially available biopesticide formulations based on *T. funiculosus* strain BCA1.1 in the near future. It is especially encouraging that not only a microbiological product but also biochemical products can be developed from *T. funiculosusi* BCA1.1. In this sense, we are advancing in the identification of the metabolic compounds produced by BCA1.1 as well as in the establishment of scaling conditions and efficient formulations for soybean rust control under field conditions.

REFERENCES

ABBAS, A.; FU, Y.; QU, Z.; ZHAO, H.; SUN, Y.; LIN, Y. Isolation and evaluation of the biocontrol potential of Talaromyces spp. against rice sheath blight guided by soil microbiome. **Environ Microbiol.** 2021.

ABDEL-RAHIM, I. R; ABO-ELYOUSR, K. A. *Talaromyces pinophilus* strain AUN-1 as a novel mycoparasite of *Botrytis cinerea*, the pathogen of onion scape and umbel blights. **Microbiol Res**. 2018.

ALAGESABOOPATHI, C. Biological control of damping-off disease of cotton seedling. **Curr Sci.** 66: 865–868. 1994.

ALENGEBAWY, A.; ABDELKHALEK, S.T.; QURESHI, S. R.; WANG, M. Q; Heavy Metals and Pesticides Toxicity in Agricultural Soil and Plants: Ecological Risks and Human Health Implications. **Toxics.** 2021.

BLADT TT, FRISVAD JC, KNUDSEN PB, LARSEN, TO (2013) Anticancer and antifungal compounds from Aspergillus, Penicillium and other filamentous fungi. **Molecules.** 2013.

CANTERI MG, ALTHAUS RA, DAS VIRGENS FILHO JS, GIGLIOTI EA, GODOY CV. SASM-AGRI-Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. Embrapa Soja-Artigo em periódico indexado (ALICE). 2021.

DETHOUP T, KAEWSALONG N, SONGKUMORN P, JANTASORN A. Potential application of a marine-derived fungus, *Talaromyces tratensis* KUFA 0091 against rice diseases. **Biol Control.** 2018.

DORIGHELLO DV, BETTIOL W, MAIA NB, DE CAMPOS RMVB. Controlling Asian soybean rust (Phakopsora pachyrhizi) with Bacillus spp. and coffee oil. **Crop Prot.** 2015.

DOS SANTOS IMO, ABE VY, DE CARVALHO K et al., Secondary Metabolites of Pseudomonas aeruginosa LV Strain Decrease Asian Soybean Rust Severity in Experimentally Infected Plants. **Plants.** 2021.

FAHIMA T, HENIS Y. Quantitative assessment of the interaction between the antagonistic fungus *Talaromyces flavus* and the wilt pathogen Verticillium dahliae on eggplant roots. **Plant Soil.** 1995.

FRISVAD JC, YILMAZ N, THRANE U, RASMUSSEN KB, HOUBRAKEN J, SAMSON RA. *Talaromyces atroroseus*, a new species efficiently producing industrially relevant red pigments. **PloS One.** 2013.

GEBREMICHAEL DE, HAILE ZM, NEGRINI F, SABBADINI S, CAPRIOTTI L, MEZZETTI B, BARALDI E. RNA Interference Strategies for Future Management of Plant Pathogenic Fungi: Prospects and Challenges. **Plants.** 2021.

GLASS NL, DONALDSON GC. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **App Environ Microbiol.** 1995.

GODOY CV, KOGA LJ, CANTERI MG. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. **Fitopatol Bras.** 2006.

GODOY CV, SEIXAS CDS, SOARES RM, MARCELINO-GUIMARÃES FC, MEYER MC, COSTAMILAN LM (2016) Asian soybean rust in Brazil: past, present, and future. **Pesqui Agropecu Bras.** 2016.

GOH YK, MARZUKI NF, TUAN PA TNF, GOH TK, KEE ZS, GOH YK. Biocontrol and plant-growth-promoting traits of *Talaromyces apiculatus* and *Clonostachys rosea* consortium against Ganoderma basal stem rot disease of oil palm. **Microorganisms**. 2020.

HALO BA, AL-YAHYAI RA, MAHARACHCHIKUMBURA SS, AL-SADI AM. *Talaromyces variabilis* interferes with *Pythium aphanidermatum* growth and suppresses Pythium-induced damping-off of cucumbers and tomatoes. **Sci Rep**. 2019.

HOSSAIN MM, SULTANA F, HYAKUMACHI M. Role of ethylene signalling in growth and systemic resistance induction by the plant growth-promoting fungus *Penicillium viridicatum* in Arabidopsis. **J Phytopathol.** 2017.

INGLIS GD, KAWCHUK LM. Comparative degradation of oomycete, ascomycete, and basidiomycete cell walls by mycoparasitic and biocontrol fungi. **Can. J Microbiol.** 2022.

KHALMURATOVA I, KIM H, NAM YJ, OH Y. Diversity and plant growth promoting capacity of endophytic fungi associated with halophytic plants from the west coast of Korea. **Mycobiology**. 2015.

LAHLALI R, EZRARI S, RADOUANE N, KENFAOUI J, ESMAEEL Q, EL HAMSS H, BELABESS Z, BARKA EA. Biological Control of Plant Pathogens: A Global Perspective Microorganisms. 2022.

MADI L, KATAN T, KATAN J, HENIS Y. Biological control of *Sclerotium rolfsii* and *Verticillium dahliae* by *Talaromyces flavus* is mediated by different mechanisms. **Phytopathology.** 1997.

MAHMOOD I, IMADI SR, SHAZADI K, GUL A, HAKEEM K.R (2016) Effects of Pesticides on Environment. In: Hakeem K., Akhtar M., Abdullah S., editors. Plant, **Soil and Microbes.** Springer; Cham, Switzerland. 2016.

MANOCH L, DETHOUP T. A potential use of Talaromyces species as biological agents against plant pathogenic fungi. Thai J Agric Sci. 44:81-91. 2011.

MCLAREN DL, HUANG HC, RIMMER SR. Hyperparasitism of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Talaromyces flavus*. **Can J Plant Pathol.** 8(1), 43-48. 1986.

MIYAKE T, KATO A, TATEISHI H, TERAOKA T, ARIE T (2012) Mode of action of Talaromyces sp. KNB422, a biocontrol agent against rice seedling diseases. **J Pestic Sci.** 2012.

MURALI M, NAZIYA B, ANSARI MA et al., Bioprospecting of rhizosphere-resident fungi: their role and importance in sustainable agriculture. **J Fungi.** 2021.

NAZIYA B, MURALI M, AMRUTHESH KN. Research Article Agronomic Survey and Screening of Genotypes for Anthracnose Infection in *Capsicum annuum* L. **Asian J Plant Sci** 19 (4):.354-360. 2020.

NICOLETTI R, LOPEZ-GRESA MP, MANZO E, CARELLA A, CIAVATTA ML (2007) Production and fungitoxic activity of Sch 642305, a secondary metabolite of *Penicillium canescens*. **Mycopathologia.** 2007.

NICOLETTI R, BECCHIMANZI A. Talaromyces – **Insect Relationships Microorganisms.** 2022.

NICOLETTI R, SALVATORE MM, ANDOLFI A. Secondary metabolites of mangrove-associated strains of Talaromyces. **Mar Drugs.** 2018.

PANDIT MA, KUMAR J, GULATI S, BHANDARI N, MEHTA P, KATYAL R, RAWAT CD, MISHRA V, KAUR J.; Major Biological Control Strategies for Plant Pathogens. Pathogens. 2022.

ROSA CRE DA, SPEHAR CR, LIU JQ.; Asian Soybean Rust Resistance: An Overview. **J Plant Pathol Microb.** 2015.

RUIU, L. Microbial Biopesticides in Agroecosystems. **Agron.** 2018.

SAKSIRIRAT W, HOPPE HH.; Degradation of uredospores of the soybean rust fungus (*Phakopsora pachyrhizi Syd.)* by cell-free culture filtrates of the mycoparasite *Verticillium psalliotae* Treschow. J Phytopathol. 1991.

SAMSON RA, YILMAZ N, HOUBRAKEN J et al.; Phylogeny and nomenclature of the genus Talaromyces and taxa accommodated in Penicillium subgenus Biverticillium. **Studies in Mycology.** 2007.

SANTAMARINA MP, SANCHIS V, JIMENEZ M, GARCIA F, HERNANDEZ E; A strain of *Penicillium funiculosum* Thorn with activity against insects and mites. **J App Entomol.** 1988.

SCHMITZ HK, MEDEIROS AC, CRAIG IR, STAMMLER G.; Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* towards quinone-outside-inhibitors and demethylationinhibitors, and corresponding resistance mechanisms. **Pest Manag Sci.** 2013.

SCHOCH CL, SEIFERT KA, HUHNDORF S, ROBERT V et al.; From the cover: nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. **Proc Natl Acad Sci USA.** 2012.

SUN XR, XU MY, KONG WL et al.; Fine Identification and Classification of a Novel Beneficial Talaromyces Fungal Species from Masson Pine Rhizosphere. **Soil J Fungi.** 2022.

TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. **Mol Biol Evol.** 2021.

TONG S, LI H, WANG L, TUDI M, YANg L (2020) Concentration, Spatial Distribution, Contamination Degree and Human Health Risk Assessment of Heavy Metals in Urban Soils across China between 2003 and 2019–A Systematic Review. **Int J Environ Res Public Health.** 2020.

USDA. United States Department of Agriculture. Production, Supply and Distribution. www.apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.htmL#/app/downloads. Accessed on 07 jan 2022.

VOIGT K, CIGELNIK E, O'DONNELL K (1999) Phylogeny and PCR identification of clinically important Zygomycetes based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. **J Clin Microbiol.** 1999.

WARD NA, ROBERTSON CL, CHANDA AK, SCHNEIDER RW. Effects of *Simplicillium lanosoniveum* on *Phakopsora pachyrhizi*, the soybean rust pathogen, and its use as a biological control agent. **Phytopathology.** 2012.

WHITE TJ, BURNS T, LEE S, TAYLOR J. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. 1990.

YILMAZ N, HOUBRAKEN J, HOEKSTRA ES, FRISVAD JC, VISAGIE CM, SAMSON RA. Delimitation and characterisation of *Talaromyces purpurogenus* and related species. **Persoonia.** 2010.

YILMAZ N, VISAGIE CM, HOUBRAKEN J, FRISVAD JC, SAMSON RA (2014) Polyphasic taxonomy of the genus Talaromyces. **Stud Mycol.** 2014.

ZHAI, M. M; LI, J.; JIANG, C. X; SHI, Y. P; DI, D. L; CREWS, P; WU, Q. X. The Bioactive Secondary Metabolites from Talaromyces species. Nat Prod **Bioprospecting.** 2016.