



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO SUL E SUDESTE DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
FACULDADE DE QUÍMICA**

**MARIA APARECIDA OLIVEIRA DE LIMA**

**POTENCIAL DE FUNGOS ISOLADOS DA ÁREA DE MINERAÇÃO PARA  
BIOCONTROLE DE FITOPATÓGENOS DE SOJA**

**Marabá – PA  
2024**

**MARIA APARECIDA OLIVEIRA DE LIMA**

**POTENCIAL DE FUNGOS ISOLADOS DA ÁREA DE MINERAÇÃO PARA  
BIOCONTROLE DE FITOPATÓGENOS DE SOJA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Química do Instituto de Ciências Exatas, da Universidade do Sul e Sudeste do Pará – UNIFESSPA, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Licenciado em Química .

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. Sebastião da Cruz Silva.

**Marabá – PA  
2024**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará**  
**Biblioteca Setorial II da UNIFESSPA**

---

L732p Lima, Maria Aparecida Oliveira de  
Potencial de fungos isolados da área de mineração para  
biocontrole de fitopatôgenos de soja / Maria Aparecida Oliveira de  
Lima. — 2024.  
45 f.: il., color.

Orientador (a): Sebastião da Cruz Silva.  
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade  
Federal do Sul e Sudeste do Pará, Campus Universitário de  
Marabá, Instituto de Ciências Exatas, Faculdade de Química,  
Curso de Licenciatura em Química, 2024.

1. Fungos fitopatogênicos. 2. Fitopatologia – Controle  
biológico. 3. Plantas – Doenças e pragas – Controle. I. Silva,  
Sebastião da Cruz, orient. II. Título.

CDD: 22. ed.: 632.3

**MARIA APARECIDA OLIVEIRA DE LIMA**

**POTENCIAL DE FUNGOS ISOLADOS DA ÁREA DE MINERAÇÃO PARA  
BIOCONTROLE DE FITOPATÓGENOS DE SOJA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Química do Instituto de Ciências Exatas, da Universidade do Sul e Sudeste do Pará – UNIFESSPA, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Licenciado em Química.

Data de aprovação: Marabá (PA), 29 de fevereiro de 2024

**BANCA EXAMINADORA:**

Documento assinado digitalmente  
 **SEBASTIAO DA CRUZ SILVA**  
Data: 07/03/2024 22:29:48-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Prof. Dr. Sebastião da Cruz Silva**  
**Faculdade de Química – UNIFESSPA - Orientador**

Documento assinado digitalmente  
 **SIMONE YASUE SIMOTE SILVA**  
Data: 07/03/2024 12:40:29-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Profa. Dra. Simone Yasue Simote Silva**  
**Faculdade de Química – UNIFESSPA – Membro**

Documento assinado digitalmente  
 **MARILENE NUNES OLIVEIRA**  
Data: 07/03/2024 11:29:18-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Profa. Dra. Marilene Nunes Oliveira**  
**Faculdade de Química – UNIFESSPA – Membro**

Dedico esse trabalho de conclusão de curso ao meu grande amigo, DEUS que me presenteia todos os dias com a energia da vida.

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS pelo dom da vida e por estar ao meu lado durante toda a minha jornada. Agradeço por me sustentar nos momentos mais difíceis, e por me proporcionar saúde e disposição para lutar pelos meus objetivos.

A minha mãe, Eliete de Souza Oliveira por me ensinar que os obstáculos foram feitos para serem vencidos com força e determinação.

A minha irmã, Patricia de Souza Oliveira, que apesar das diferenças e obstáculos, sempre esteve ao meu lado me ajudando, apoiando e torcendo para que eu fosse feliz e bem sucedida.

Ao meu namorado e amigo, Ayrton Barbosa da Silva, por acreditar em meus sonhos, pela parceria e paciência durante esses meses.

Aos meus amigos que sempre estiveram sempre ao meu lado acreditando no meu potencial e no meu sucesso até aqui alcançado, Jucelia Souza Rocha minha irmã de outra mãe, e ao meu irmão e amigo Werveson Moraes Feitosa que sempre com sua alegria, transmitiu alegria aos meus dias.

A minha parceira de curso, Solange Solano da Silva, que me acompanha desde do início do Curso, sendo uma amiga para todas as horas, amiga além da Universidade.

As amigas que estiveram ao meu lado durante as atividades e trabalhos Mayane Santos e Paola Barros.

A minha companheira de laboratório, Lanniele Drika, que esteve ao meu lado desde do início na pesquisa e pela amizade construída além das portas da Universidade.

Ao grupo de pesquisa, Camylle Carvalho, Hellen Patricia e Carlyne Alecrim pelos sorrisos, amizade e aprendizagem que se estendem até os dias atuais.

Aos professores que conquistaram meu coração, Cláudio Emidio, Marilene Nunes, Adriana Damasceno e Ulisses Albino.

A Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará ( UNIFESSPA), aos técnicos, ao setor administrativo e a todo corpo docente da Faculdade de Química (FAQUIM).

Agradeço especialmente ao meu orientador, Sebastião da Cruz Silva, que me recebeu desde o primeiro período de braços abertos, proporcionando-me uma grande oportunidade na iniciação científica, permitindo-me descobrir o grande potencial que posso ter ao lado da ciência. Obrigada por essa grande oportunidade. Não poderia deixar de agradecer à professora Simone Simote, pelos ensinamentos, carinho, apoio e compreensão deixados com muito amor

e paciência até aqui. Deixo o meu carinho, respeito e admiração, desejando que o Senhor os abençoe.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse sonho.

Muito obrigada!

“Sejam fortes e corajosos. Não tenham medo nem fiquem apavorados por causa deles, pois o senhor, o seu Deus, vai com você; nunca os deixará, nunca os abandonará”.

Deuteronômio 31:6.

## RESUMO

Apesar da utilização de fungicidas sintéticos ser a principal forma de controle de fungos fitopatogênicos, eles podem ter um potencial tóxico à saúde humana e ao meio ambiente. Dessa forma, o controle biológico tem sido utilizado como uma estratégia para minimizar os danos causados por fungos fitopatogênicos em plantas. Diante disso, fungos isolados da área de mineração (R<sub>2</sub>1B<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub>) estão sendo estudados a fim de que possam ser aplicados para o controle de doenças de plantas, que pode ser mais eficiente e menos perigoso para o meio ambiente. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito dos isolados R<sub>2</sub>1B<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub> como potenciais antagonistas sobre os fitopatógenos *Fusarium solani* e *Macrophomina phaseolina* em condições *in vitro*. As análises do confronto pareado e metabólitos voláteis foram feitas em triplicatas com observações diárias durante sete dias. Para os testes realizados utilizou-se o Grid para a contagem do crescimento micelial, teste de pareamento de culturas *in vitro* e teste de metabólitos voláteis. Para o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial foi aplicado a fórmula: % inibição = [(crConfrontamento)/controle] x 100, para a análise de voláteis utilizou-se o percentual (%) inibição = [(crCvoláteis)/controle] x 100. No teste de pareamento de culturas *in vitro*, os isolados fúngicos R<sub>2</sub>1B<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub> apresentaram percentual de inibição de 67,8% para o fitopatógeno *Fusarium solani*, para o *Macrophomina phaseolina* apresentaram 72,64% e 72,2% de inibição respectivamente. Para o teste de metabólitos voláteis, somente o *Fusarium solani* apresentou inibição para os fungos R<sub>2</sub>1B<sub>1</sub> 72,64% e R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub> 72,16%, já para o fungo *Macrophomina phaseolina* não apresentaram inibição. As análises dos micros-extratos não apresentaram resultados consisos sendo necessarios refazer as análises em novos comprimentos de onda para obtenção concreta desses resultados. Com isso, os resultados encontrados neste trabalho estimulam, além da realização dos ensaios laboratoriais, a continuação de mais estudos desses isolados, a fim de verificar sua eficiência no controle *in vivo* de doenças em plantas.

**Palavras-chave:** Controle biológico; fitopatogênicos; fungos de mineração.

## ABSTRACT

Although the use of synthetic fungicides is the main way to control phytopathogenic fungi, they can have a toxic potential to human health and the environment. Thus, biological control has been used as a strategy to minimize the damage caused by phytopathogenic fungi in plants. Therefore, fungi isolated from the mining area (R<sub>2</sub>1B<sub>1</sub> and R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub>) are being studied so that they can be applied to the control of plant diseases, which can be more efficient and less dangerous to the environment. Thus, the objective of the present study was to evaluate the effect of R<sub>2</sub>1B<sub>1</sub> and R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub> isolates as potential antagonists on the phytopathogens *Fusarium solani* and *Macrophomina phaseolina* under in vitro conditions. The analyses were carried out in triplicates with daily observations for seven days. For the tests performed, the Grid was used for mycelial growth counting, in vitro culture pairing test and volatile metabolite test. To calculate the percentage of mycelial growth inhibition, the following formula was applied: % inhibition = [(crConfrontation)/control] x 100, for the analysis of volatiles, the percentage (%) inhibition = [(crCvolatiles)/control] x 100 was used. In the in vitro culture pairing test, the fungal isolates R<sub>2</sub>1B<sub>1</sub> and R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub> showed an inhibition percentage of 67.8% for the phytopathogen *Fusarium solani*, and for *Macrophomina phaseolina* they showed 72.64% and 72.2% of inhibition, respectively. For the volatile metabolites test, only *Fusarium solani* showed inhibition for the fungi R<sub>2</sub>1B<sub>1</sub> 72.64% and R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub> 72.16%, while for the fungus *Macrophomina phaseolina* it did not show inhibition. The analysis of the micro-extracts did not present consistent results and it was necessary to redo the analyzes at new wavelengths to obtain concrete results. Thus, the results found in this work stimulate, in addition to laboratory tests, the continuation of further studies of these isolates, in order to verify their efficiency in the in vivo control of plant diseases.

**Keywords:** Biological control; phytopathogens; mining fungi.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Observação microscópica da reprodução assexuada. ....	19
<b>Figura 2:</b> Formação das hifas por alongamento a partir do esporo. ....	20
<b>Figura 3:</b> <i>Macrophomina Phaseolina</i> em meio BDA: A- Frente; B- Verso.....	21
<b>Figura 4:</b> Placas de petri com os cultivos dos fungos isolados da área de mineração (A e B) e fitopatógenos de soja (C- <i>F. solani</i> D- <i>M. phaseolina</i> ) – frente.....	24
<b>Figura 5:</b> Placas de petri com os cultivos dos fungos isolados da área de mineração (A e B) e fitopatógenos de soja (C- <i>Fusarium solani</i> e D- <i>M. phaseolina</i> ) – costa.....	25
<b>Figura 6:</b> Método de pareamento em placas de Petri.....	26
<b>Figura 7:</b> Amostras de sobreposição das placas <i>Aspergillus</i> e R <sub>2</sub> A <sub>3</sub> frente aos fitopatógenos de soja.....	26
<b>Figura 8:</b> Grid utilizado para contagem em área total .....	27
<b>Figura 9:</b> Grid para a contagem das áreas das colônias dos Fitopatógenos frente aos fungos de mineração ( A- Cultivo pareado <i>In Vitro</i> ; B- Cultivo pareado <i>In Vitro</i> com Grid). ....	28
<b>Figura 10:</b> Fluxograma de Processos extração do Co-cultivo em meio sólido.....	29
<b>Figura 11:</b> Potencial de inibição dos microrganismos fitopatogênicos de soja A- Controle R <sub>2</sub> 1B <sub>1</sub> ; B- Controle R <sub>2</sub> 2A <sub>3</sub> ; C - Controle <i>M. phaseolina</i> ; D- Controle <i>F. solani</i> ; E - Confrontamento <i>M. phaseolina</i> + R <sub>2</sub> 1B <sub>1</sub> ; F - Confrontamento <i>M. phaseolina</i> + R <sub>2</sub> 2A <sub>3</sub> ; G- <i>F. solani</i> + R <sub>2</sub> 1B <sub>1</sub> e H- <i>F. solani</i> + R <sub>2</sub> 2A <sub>3</sub> .....	32
<b>Figura 12:</b> <i>F. solani</i> em placa de Petri com meio BDA após a exposição aos metabólitos voláteis (A- Controle <i>F. solani</i> ; B- <i>F. solani</i> e R <sub>2</sub> 1B <sub>1</sub> ; C- R <sub>2</sub> 1B <sub>1</sub> ; D- <i>F. solani</i> ; E- <i>F. solani</i> e R <sub>2</sub> 2A <sub>3</sub> ; F- R <sub>2</sub> 2A <sub>3</sub> e G- <i>F. solani</i> ).....	34

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Área de crescimento dos microrganismos e porcentagem de inibição dos fungos patogênicos pelos fungos de rejeito de mineração .....	30
<b>Tabela 2</b> - Percentual de inibição dos Compostos Voláteis dos fungos patogênicos pelos fungos de rejeito de mineração. ....	33

## LISTAS DE GRÁFICOS

- Gráfico- 1:** Representação do crescimento do Co-cultivo dos fungos da área de mineração e o fitopatógeno *Macrophomina phaseolina* em meio sólido ( A- *Aspergillus* (R<sub>2</sub>1B<sub>1</sub> e B- R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub>). ..... 31
- Gráfico- 2:** Representação do crescimento do Co-cultivo dos fungos da área de mineração e o fitopatógeno *Fusarium solani* em meio sólido ( C- *Aspergillus* (R<sub>2</sub>1B<sub>1</sub> e D- R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub>). ..... 31
- Gráfico 3:** Fitopatógeno *Fusarium solani* após exposição aos metabólitos voláteis A- *Aspergillus* (R<sub>2</sub>1B<sub>1</sub>) e B- R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub> após 7 dias de incubação.....33

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de Etila
BDA	Batata, Dextrose e Ágar
B.O.D	Demanda Bioquímica de Oxigênio
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm <sup>2</sup>	Centrimetros quadrados
CRCV	Crescimento radial dos compostos voláteis
CRTE	Crescimento radial da placa controle
g	grama
mL	Milimetro
R <sub>2</sub> 1B <sub>1</sub>	Segundo isolado do primeiro rejeito de concentração 1 crescido no meio BDA
R <sub>2</sub> 2A <sub>3</sub>	Segundo isolado do segundo rejeito de concentração 10 <sup>-3</sup> crescido em meio de Arroz
FAQUIM	Faculdade de Química
% Inibição	Percentual de inibição

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	16
<b>2.1. Objetivo Geral</b> .....	16
<b>2.2. Objetivos Específicos</b> .....	16
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
<b>3.1. A cultura da soja (<i>Glycine max</i> (L.) Merrill)</b> .....	17
<b>3.2. Fungos</b> .....	18
3.2.1. Gênero <i>Aspergillus</i> .....	19
3.2.2. <i>Macrophomina Phaseolina</i> .....	20
3.2.3. <i>Fusarium Solani</i> .....	22
<b>3.3. Cultivo Pareado</b> .....	23
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	24
4.1. Local de pesquisa .....	24
4.2. Seleção das linhagens e patógenos .....	24
4.2.1. Preparo do meio de cultura sólido .....	25
<b>4.3. Teste de pareamento</b> .....	25
4.3.1. Efeito de substâncias voláteis no controle dos fitopatgenos de soja. ....	26
4.3.2. Delineamento experimental e análise do potencial antagonista dos fungos de mineração frente aos fitopatógenos de soja.....	27
<b>4.4. Extração do co-cultivo fúngico em meio sólido.</b> .....	28
4.4.2. Caracterização dos micro-extratos por CLAE .....	29
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	30
<b>5.1. Teste de pareamento de cultura <i>in vitro</i></b> .....	30
<b>5.2. Avaliação dos efeitos dos voláteis</b> .....	32
<b>5.3. Caracterização dos micros-extratos por CLAE</b> .....	34
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	35
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	36

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com os dados do IBGE 2023, a agricultura é a base econômica brasileira, com a produção de milhões de toneladas anuais de cereais, leguminosas e oleaginosas. Os grãos são ricos em proteínas, vitaminas e sais minerais, como o zinco, magnésio, potássio, cobre e fósforo (KRZYZANOWSKI; FRANÇA-NETO; HENNING, 2018). A produção anual de 262.653.469 toneladas de cereais, leguminosas e oleaginosas, teve um aumento de 11,8% ante o ano anterior (IBGE, 2023).

No entanto, o agronegócio sofre diretamente com as doenças causadas por patógenos do solo que podem acontecer em todos os sistemas agrícolas sendo comuns nas principais espécies de plantas cultivadas. Os patógenos ocorrem na maior parte do ciclo de vida no solo (BETTIOL; MORANDI, 1995), tendo a capacidade de permanecerem vivos por períodos prolongados, mesmo em condições edafoclimáticas desfavoráveis e na ausência de um hospedeiro. Esses patógenos podem produzir estruturas de resistência, tais como clamidósporos, esclerócios e ascósporos, entre outras (BELLÉ; FONTANA, 2018).

As principais causas de doenças vasculares e radiculares em culturas são as bactérias, fungos e nematóides, sendo os fungos os principais patógenos (BELLÉ; FONTANA, 2018). Os fungos de solo mais comuns e estudados são *Fusarium spp.*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotium rolfsii*, dentre outros (KHAMARI et al., 2018; KUSHWAHA et al., 2019; NOMILA MERLIN et al., 2013). Esses patógenos são responsáveis por infecções em caules, rizomas e raízes das plantas, o que torna seu controle extremamente complexo, uma vez que evoluíram com as plantas e estão adaptados ao ambiente abaixo do nível do solo. Os sintomas das doenças causadas por esses microrganismos são visíveis somente quando estão em estágios avançados, o que torna praticamente impossível seu controle (MICHEREFF; ANDRADE; MENEZES, 2005).

O controle de doenças radiculares tem como objetivo minimizar os danos causados por esses patógenos, sendo mais eficiente o preventivo. Dessa forma, pode-se utilizar produtos fitossanitários, o que é feito através do cuidado de proteção, para que a doença não atinja a área e não se instale (VIDA et al., 2004). Os agroquímicos tornaram-se a solução ideal para o controle das pragas agrícolas. Não obstante, o uso intensivo destes produtos tem provocado desequilíbrio ambiental, como a resistência de patógenos, desequilíbrio biológico,

contaminação dos alimentos, da água, do solo, e dos animais, além da intoxicação dos agricultores (MASCARIN et al., 2019)

O uso de agentes biológicos é uma das formas de controlar as doenças de forma mais sustentável, incluindo o controle biológico natural realizado por diversos microrganismos. Ademais, os custos relacionados ao controle biológico são menores que os dos tratamentos químicos, representando cerca de um terço dos custos relacionados a fungicidas e agrotóxicos (FANTINEL et al., 2018; MASCARIN et al., 2019).

A fim de que se tenha sucesso no controle biológico, o microrganismo antagonista deve ter um nicho ecológico semelhante ao do patógeno. Sendo crucial que o microrganismo apresente várias características: ser capaz de colonizar e competir com o patógeno em seu ambiente; ser resistente a variações nas condições do meio, como temperatura, umidade e radiação; não causar prejuízos aos homens e aos animais; ter aptidão para diferentes culturas e amplo espectro de ação contra diferentes patógenos; ser de fácil cultivo, multiplicação, aplicação e formulação (BETTIOL; MORANDI, 1995).

Os fungos isolados de área de mineração têm sido utilizados em várias aplicações, sendo muitas vezes aplicações exitosas, sendo muitos deles capazes de crescer em vários substratos orgânicos e possuem rápido crescimento em condições extremas. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi estudar o potencial das espécies fúngicas *Aspergillus* sp. (R<sub>2</sub>1B<sub>1</sub>) e um isolado da área de mineração R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub> como agente de biocontrole dos fitopatógenos de soja *Fusarium solani* e *Macrophomina phaseolina*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial antagônico dos fungos isolados da área de mineração *Aspergillus* sp. (R<sub>2</sub>1B<sub>1</sub>) e R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub> frente aos fungos fitopatógenos de soja *Fusarium solani* e *Macrophomina phaseolina*.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial de biocontrole das linhagens fúngicas *Aspergillus* sp (R<sub>2</sub>1B<sub>1</sub>) e R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub> frente aos fitopatógenos pelo método de cultivo pareado;
- Delinear potencial antagonista dos fungos de mineração frente aos fitopatógenos de soja pelo método do Grid;
- Analisar o crescimento micelial ( % inibição).
- Obter os micro-extratos do co-cultivo fúngico em meio sólido;
- Avaliação do perfil químico dos micro-extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. A cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill)

A soja é uma planta de origem asiática, sua introdução na agricultura ocorreu há mais de 5.000 anos. O seu cultivo é totalmente diferente, uma vez que suas primeiras plantas eram do tipo rasteiras e se desenvolveram próximas a rios e lagos, sendo denominada de soja selvagem (MOZZAQUATRO et al., 2017). Ao longo dos anos, o seu desenvolvimento foi acelerado pelo surgimento de novas espécies das quais surgiram com o cruzamento natural entre duas sojas silvestres, domesticadas e aprimoradas pelos chineses (MORAES et al., 2021).

No Brasil seu cultivo ocorre há mais de 135 anos, obtendo uma extensão em área com 42 milhões de hectares cultivados na safra de 22/23, com produtividade estimada em 3,551 kg ha-1, conforme a CONAB (2022). A cultura é o principal grão comercializado, uma vez que seu crescimento provém dos fatores de autenticação da oleaginosa, uma importante fonte de proteína vegetal. Em geral, para atender à grande demanda de setores voltados a produtos de origem animal e populacional é ofertada *in natura* ou mediante derivados. (HIRAKURI e LAZZAROTTO, 2014).

Com as grandes demandas pela produção do grão, torna-se necessário expandir as fronteiras agrícolas, o que demonstra a intensificação da monocultura e práticas de manejo inadequadas, o que pode prejudicar a produtividade. Para minimizar esses problemas e atender à demanda do mercado, é necessário usar estratégias para aumentar o rendimento das culturas (BOTELHO, 2014).

O tratamento das sementes é considerado um dos principais processos que antecedem o plantio e o cultivo das plantas de soja, evitando, portanto, danos causados por pragas e doenças nas sementes. Essa prática também pode impedir a entrada de patógenos em áreas sem contaminações (MACHADO, 2018).

Os principais objetivos do tratamento da soja são a redução de fungos presentes nas sementes e a eliminação de fungos de solo durante seu desenvolvimento inicial. Além disso, o tratamento promove condições de uniformidade na germinação e emergência, evitando o surgimento de epidemias no campo, proporcionando maior sustentabilidade à cultura através da redução de riscos na implantação da lavoura (PIAS, 2014).

A busca por princípios que possam ser eficazes no controle microbiano e fungicida tem sido interesse de linhas de pesquisa. Dessa forma, produtos naturais têm sido isolados, identificados e se tornado uma das áreas de maior crescimento da química orgânica (BRIZUELA et al., 1998).

Os fungos produzem metabólitos que são uma forma de defesa contra antagonistas naturais. Desde a descoberta da penicilina esses metabólitos têm sido estudados para produção de antibióticos (TAKAHASCHI; LUCAS, 2008). Logo, com a produção de extratos desses fungos é possível obter uma variedade de produtos naturais, que possam atuar como agentes no controle de pragas.

### **3.2. Fungos**

Os fungos são organismos eucarióticos, heterotróficos, que se alimentam de matéria orgânica inanimada ou de nutrição como parasitas de hospedeiros vivos. Estes microrganismos têm um impacto na vida humana, participando de processos benéficos ou prejudiciais. A forma filamentosa é constituída de um conjunto de estruturas tubulares, denominadas de hifas, que quando agrupadas, formam o micélio (TORTORA, 2012).

A classificação taxonômica dos fungos está relacionada, principalmente, à reprodução sexuada. No entanto, quando a forma de reprodução sexuada não é percebida, a classificação é baseada nos órgãos de reprodução assexuada. A reprodução assexuada pode ser formada pela fragmentação das hifas do micélio ou por esporos assexuais produzidos por mitose nas hifas ou por meio das hifas especializadas (OLIVEIRA, 2014).

O reino fungi tem, aproximadamente, 1,5 milhão de espécies que habitam praticamente todos os ecossistemas existentes no planeta. Aproximadamente 70.000 espécies foram descritas até o presente momento, incluindo as que causam micoses em seres humanos, doenças em plantas cultivadas e as de grande relevância biotecnológica (OLIVEIRA, 2010).

Os fungos são utilizados na produção de alimentos, na indústria farmacêutica, na biodegradação e no tratamento biológico de efluentes, atuando na atividade enzimática, ou seja, na produção de enzimas de interesse industrial e na biotransformação. Os fungos são de grande importância agrícola e ecológica, pois mantêm o equilíbrio do meio ambiente, decompondo

restos vegetais, degradando substâncias tóxicas, auxiliando as plantas a crescerem e se protegendo contra os outros microrganismos patogênicos (ABREU et al., 2015).

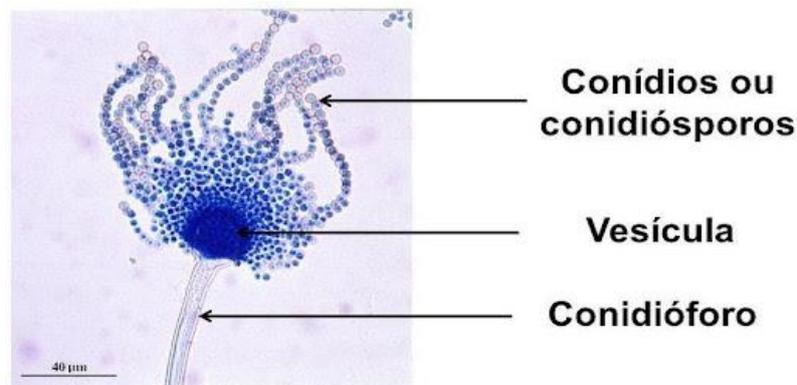
### 3.2.1. Gênero *Aspergillus*

O gênero fúngico *Aspergillus* é composto por cerca de 446 espécies e tem uma distribuição cosmopolita (HOUBRAKEN et al., 2020). A maioria das espécies é rara mas outras estão entre as mais comuns do planeta (KIRK et al., 2008). Os fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* são considerados anamorfos de ascomicetos do reino fungi, divisão ascomycota, e ordem eurotiales e, sendo, caracterizados pela produção de esporos assexuais (KLICH & PITT, 1988), conforme a Figura 1.

A identificação do gênero *Aspergillus* como fungos filamentosos é realizada de acordo com a morfologia apresentada. Dessa forma, sua identificação é fundamentada na avaliação macromorfológica e micromorfológica, observando suas características, tais como: coloração da colônia, taxa de crescimento micelial pigmentação do meio de cultura, textura da colônia e estruturas de produção de esporos (BALAJEE; MARR, 2006; BALAJEE et al., 2007).

A coloração das colônias é uma das principais características observadas em análise macroscópica, que apresenta diferentes tonalidades de verde, amarelo, marrom, branco, preto e cinza (Klich, 2002). A cor branca, dourada ou acastanhada é predominantemente observada no seu anverso. As colônias apresentam características, algodonosas, pulverulentas ou arenosas, as quais podem apresentar rugosidade na parede (LACAZ et al., 2002; SIDRIM, 2004; MURRAY et al., 2010).

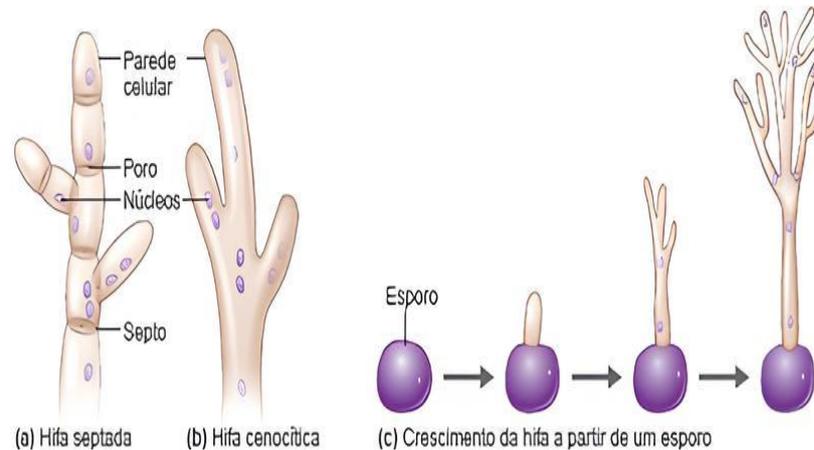
**Figura 1:** Observação microscópica da reprodução assexuada.



**Fonte:** CAVACO, 2015.

Os conídios apresentam uma base na forma de “T ou L”, popularmente chamada de célula pé, que está conectada a uma hifa vegetativa e que circunda as hifas reprodutivas. Sua extensão pode ocorrer das células pé por alguns milímetros de hifas até chegar a vesícula (KLICH, 2002). Suas Hifas aéreas e vegetativas podem contém esporos assexuais frequentemente pigmentados atuando na dispersão do fungo (Figura 2).

**Figura 2:** Formação das hifas por alongamento a partir do esporo.



**Fonte:** TORTORA, 2012

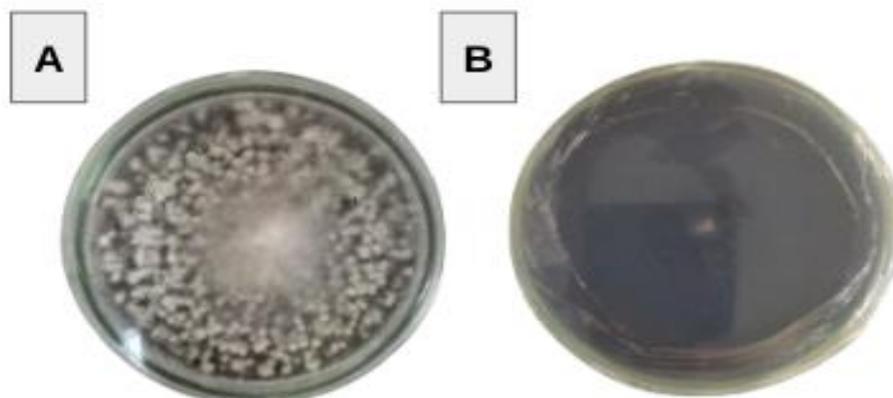
### 3.2.2. *Macrophomina Phaseolina*

A denominação desse patógeno ocorreu por Goidanish (1947) após uma revisão da taxonomia do gênero *Macrophomina*, é composto somente de uma espécie, *Macrophomina phaseolina*. Este fungo pertence ao filo Ascomycota, da família Botryosphaeriaceae (MYCOBANK, 2013).

O fungo apresenta um micélio uninucleado, embora as células das extremidades do micélio, região de crescimento, sejam frequentemente multinucleadas (KNOX-DAVIES, 1967).

A espécie produz picnídios marrom-escuros, solitários ou grupos, com tamanho de 100-200  $\mu\text{m}$  de diâmetro, abrindo-se por ostíolo apical (HOLLIDAY; PUNITHALINGAM, 1970). Em meio BDA, os picnídios apresentam características negras e globosos com tamanho que varia entre 100-250  $\mu\text{m}$  (Figura 3). A variação no tamanho dos picnídios parece estar relacionada ao substrato sobre o qual o fungo se desenvolve (DHINGRA; SINCLAIR, 1978).

**Figura 3:** *Macrophomina Phaseolina* em meio BDA: A- Frente; B- Verso.



**Fonte:** Autora, 2023.

De acordo com Holiday (1970), os microescleródios apresentam características negras e lisas, medindo em torno de 100 µm de diâmetro (em culturas de 50-300 µm). O fungo produz microescleródios em tecidos infectados em grande quantidade, o que é uma das formas de sobrevivência do fungo, bem como uma das principais fontes de inóculo desse patógeno.

Os microescleródios são originados a partir do micélio, produzindo uma estrutura multicelular, rígida e resistente a condições antagônicas. Eles podem ser encontrados sob a epiderme das raízes, na camada externa do córtex e na região do colo. Os microescleródios são liberados no solo e, ao se aproximarem da região do colo ou da raiz da planta, germinam e infeccionam as raízes. No entanto, nem todas as células têm a mesma taxa de germinação. Desta forma, os microescleródios podem ter células germinando e infectam as plantas em estágios diferentes apresentando podridão do caule e raiz atingindo em média 500 espécies de plantas (ABBAS et al., 2019).

Esse fungo é encontrado de forma natural em solos de mata nativa ou em cultivados (ALMEIDA et al., 2001). Assim, o *Macrophomina phaseolina* pode infectar muitos tipos de plantas, como feijão, milho, amendoim, soja, e girassol no Brasil. (GUPTA et al 2012). Dessa forma, o fungo *Macrophomina phaseolina* é um dos grandes responsáveis por causar doenças, como, praga das plântulas, podridão do carvão, podridão do caule (JACOB et al., 2013; GHOSH et al., 2018).

Os sintomas podem variar de acordo com a idade da planta no momento da infecção, podendo apresentar lesões de coloração marrom-escura, na região do colo. Entretanto, a infecção torna-se mais grave se houver baixa umidade do solo com temperaturas altas (EMBRAPA, 2014). O micélio e os microescleródios se desenvolvem dentro do envoltório (KUNWAR et al., 1986). As sementes, em geral, não apresentam sinais de infecção, entretanto o fungo é transmitido por meio delas.

As plantas de soja são submetidas de forma ininterrupta a altas temperaturas, assim contribui para sua alta produtividade (LUDLOW; MUCHOW, 1990). A preparação adequada do solo permite que as raízes tenham uma melhor distribuição, resultando em uma maior retenção de umidade. Dessa forma, a rigidez da *Macrophomina phaseolina* é, com frequência, associada ao déficit de água e às elevadas temperaturas no solo.

### 3.2.3. *Fusarium Solani*

*Fusarium solani* pode ser considerado um agente etiológico ou saprofítico, devido às suas características morfológicas, tais como crescimento lento em meio sólido de batata (BDA), o que resulta na produção de uma massa de coloração azulada com grande quantidade de macroconídios de tamanhos entre 30-65 µm por 6-8 µm apresentando de 3 a 5 septos com pouca ou nenhuma presença de microconídios (RUPE, 1989; RUPE; WEIDEMANN, 1986).

O *Fusarium solani* provoca podridão nas raízes, caules, frutos e folhas de algumas espécies vegetais (ROSATI et al . 2021). Na raiz apresenta sintoma de uma mancha avermelhada, que é mais visível na raiz principal, geralmente está localizada entre um e dois centímetros abaixo do nível do solo. Ao longo da evolução da infecção, é possível notar uma expansão da lesão, que passa a circundar a raiz, assumindo uma coloração de castanho-avermelhada escura (RUPE; WEIDEMANN, 1986).

A necrose é encontrada no tecido cortical, ao passo que o lenho da raiz tem uma coloração castanho-clara, que se espalha pelo tecido lenhoso da haste crescendo vários centímetros acima do solo (RUPE, 1989; WRATHER et al., 1995). Além disso, ocorre apodrecimento das raízes secundárias em solos úmidos e necrose na base da planta (EMBRAPA, 2006). Outra doença que pode ser causada pelo fitopatógeno, é a fusariose que apresenta o branqueamento das espículas infectadas antes da velhice das plantas (MA et al., 2020).

### 3.3. Cultivo Pareado

O método de cultivo pareado em disco de ágar é usado em estudos de antagonismo *in vitro*, existindo inúmeros relatos de sucesso na seleção de microrganismos, com o objetivo de controlar biologicamente fitopatógenos (MARIANO, 1993). Esse método permite mensurar o crescimento micelial, assim como os tipos de interação, tais como hiperparasitismo, formação de clamidósporos, entre outros (FARIA; CASSETARI NETO; ALBUQUERQUE, 2002).

Os testes *in vitro* permitem a análise de potenciais antagonistas e a análise do mecanismo de ação para facilitar a observação das interações antagonistas-patógenos, em nível ultraestrutural, com a ajuda de microscopia ótica ou eletrônica. Dessa forma, os organismos selecionados no pareamento *in vitro* são capazes de servir para transformação genes e de microrganismos não antagônicos (MARIANO, 1993). O método da cultura pareada é um dos métodos mais utilizados nos trabalhos com antagonismo (FUGA et al., 2016; JANE; SHEILA; JAMES, 2011; LAKHDARI et al., 2018; VIEIRA et al., 2016).

Esse método pode ser feito com ágar em placa, ou em lâmina. O método com ágar em lâmina é considerado uma versão microscópica do método com ágar em placa, tendo vantagem sobre o primeiro, uma vez que permite a visualização da interação entre as hifas dos antagônicos. Além disso, é possível observar a inibição de produção de esporos de um fungo causada pelo antagônico. No entanto, na placa, somente serão visíveis outros tipos de interação, como a sobreposição de micélio, a antibiose que é caracterizada pelo halo de inibição e da lise da colônia (ANDREWS, 1992). Para realizar o método de cultura pareada em disco de ágar, são colocados em placas de petri ou lâmina, contendo o meio de cultura, discos de micélio dos fungos que serão avaliados em lados opostos, sendo um do patógeno e outro do isolado (MARIANO, 1993).

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Local de pesquisa

O trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de ensino, orgânica, microbiologia e análises químicas da Faculdade de Química, Instituto de Ciências Exatas, da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará.

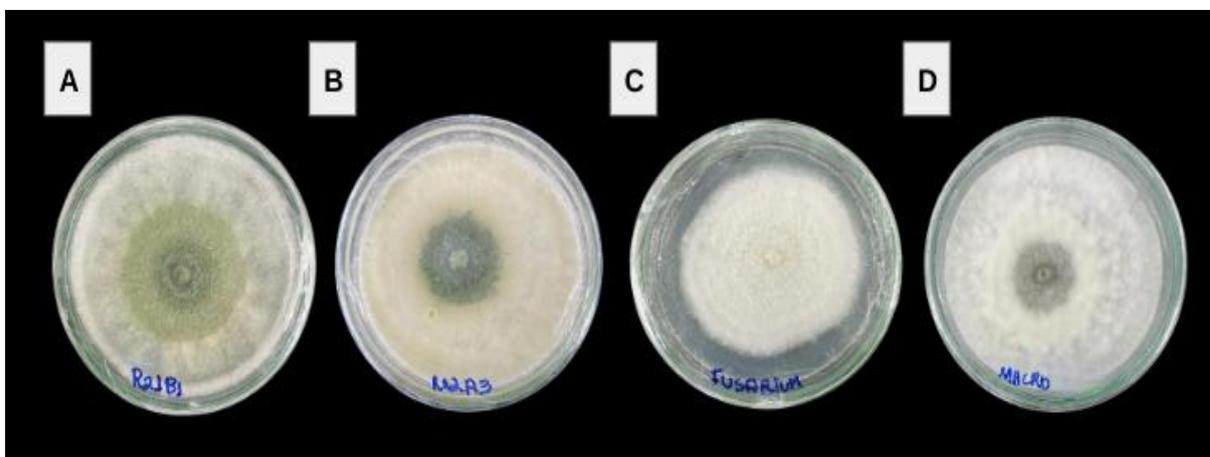
### 4.2. Seleção das linhagens e patógenos

Para este estudo foram selecionadas sete linhagens fúngicas isolados do rejeito e solo de mineração: R<sub>2</sub>3B<sub>3</sub>; R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub>; R<sub>2</sub>1B<sub>1</sub>; R<sub>2</sub>3A<sub>3</sub>; P<sub>1</sub>R<sub>4</sub>5<sub>x</sub>; P<sub>1</sub>Z<sub>1</sub>M<sub>4</sub>; P<sub>2</sub>Z<sub>2</sub>B<sub>1</sub> das quais estão armazenadas na micoteca do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Química da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará - UNIFESSPA.

Para a realização do Co-cultivo por confrontamento pareado selecionou-se as linhagens fúngicas de código, R<sub>2</sub>1B<sub>1</sub> (Segundo isolado do primeiro rejeito de concentração 1 crescido no meio BDA - *Aspergillus*), e a linhagem R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub> (Segundo isolado do segundo rejeito de concentração 10<sup>-3</sup> crescido em meio de Arroz), por apresentarem melhores desenvolvimentos frente ao antagonismo dos fitopatógenos de soja *F. Solani* e *M. phaseolina*

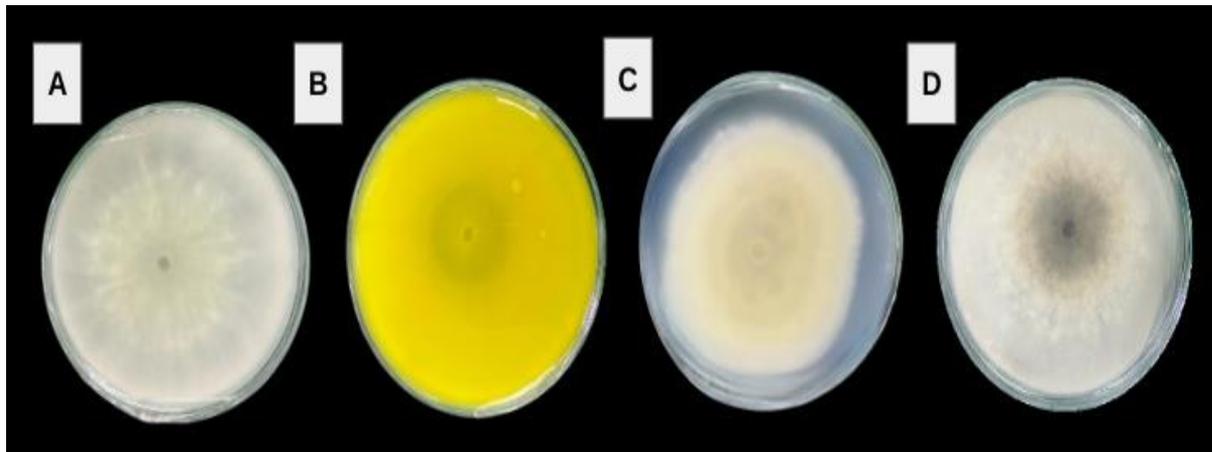
Os fungos fitopatógenos de soja *F. solani* (Figura 4C) e *M. phaseolina* (Figura 4D) foram cedidos pelo Prof. Dr. Leopoldo Sussumu Matsumoto, da Universidade Estadual do Norte do Paraná, conforme as figuras 4 e 5.

**Figura 4:** Placas de petri com os cultivos dos fungos isolados da área de mineração (A e B) e fitopatógenos de soja (C-*F. solani* D- *M. phaseolina*) – frente.



**Fonte:** Autora, 2023.

**Figura 5:** Placas de petri com os cultivos dos fungos isolados da área de mineração (A e B) e fitopatógenos de soja (C- *Fusarium solani* e D- *M. phaseolina*) – costa.



**Fonte:** Autora, 2023.

#### 4.2.1. Preparo do meio de cultura sólido

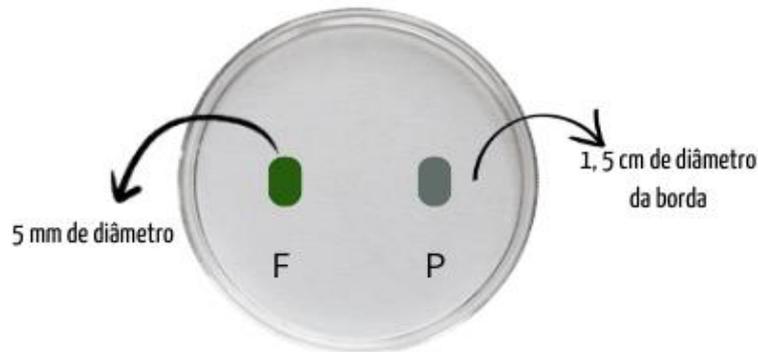
Para o cultivo das linhagens fúngicas, utilizou-se o meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar) de acordo com a metodologia descrita pela biolog , preparado com 60g de batata inglesa, 6 g de dextrose e 5,1g de ágar com 300 mL de água destilada. Em seguida, foi autoclavado por 15 minutos a temperatura de 120° C e pressão de 1 atm. Após a esterilização, o meio BDA foi vertido em placas de petri de 9 cm de diâmetro na capela de fluxo laminar (Veco@), previamente esterilizada com Lâmpada UV Bacteriológica. Depois as placas foram colocadas em uma incubadora B.O.D (Cietec@ e Eletrolab) à temperatura 30±2° C por 24 horas, para observar a presença de possíveis contaminantes.

#### 4.3. Teste de pareamento

Para a avaliação dos isolados *Aspergillus* (R2<sub>1</sub>B<sub>1</sub>) e R2<sub>2</sub>A<sub>3</sub> sobre a inibição do crescimento dos fitopatógenos, foi utilizada uma adaptação do método de pareamento em placas de Petri, de acordo com a metodologia descrita por Cassiolato et al. (1997) e Medrado (2019). Ao centro das placas de Petri, contendo meio BDA foram inoculados discos de micélio (5 mm) dos isolados de fitopatógenos e dos isolados da área de mineração, para a obtenção de matrizes. Após sete dias de, os isolados foram repicados em uma placa de Petri em extremidades opostas (1,5 cm de diâmetro da borda da placa) formando uma combinação de dois isolados de fungos fitopatogênicos com dois isolados da área de mineração, durante os sete dias de incubação,

realizou-se o acompanhamento do crescimento das linhagens diariamente, conforme a Figura 6. Os experimentos foram realizadas em triplicatas.

**Figura 6:** Método de pareamento em placas de Petri

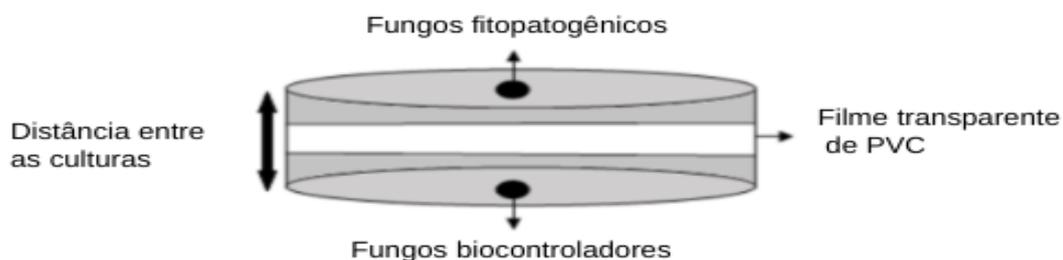


**Fonte:** Autora, 2024

#### 4.3.1. Efeito de substâncias voláteis no controle dos fitopatógenos de soja.

A fim de avaliar se as linhagens fúngicas de rejeitos de mineração  $R_{22A_3}$  e *Aspergillus* ( $R_{21B_1}$ ) estavam produzindo metabólitos voláteis, provocando assim a inibição do crescimento dos fitopatógenos de soja *Macrophomina phaseolina* e *Fusarium solani*, foi utilizado o método de placas sobrepostas (BAKER; COOK, 1999). Discos de micélio (5 mm de diâmetro) de cada um dos fitopatógenos foram repicados no centro de placas de Petri de 9 cm contendo meio de cultura BDA. Paralelamente, discos de micélio das linhagens  $R_{22A_3}$  e *Aspergillus* ( $R_{21B_1}$ ) foram inoculados em placas contendo meio de cultura BDA. Logo após, as placas foram abertas em condições assépticas e as placas contendo os fitopatógenos e os fungos  $R_{22A_3}$  e *Aspergillus* ( $R_{21B_1}$ ) foram sobrepostas e vedadas por meio de filme PVC (Figura 7). Como controle placas repicadas com os fitopatógenos foram sobrepostas a outras contendo apenas o meio de cultura BDA. As placas foram incubadas em câmara tipo BOD, nas mesmas condições do experimento em cultivo pareado (VIEIRA et al., 2016).

**Figura 7:** Amostras de sobreposição das placas *Aspergillus* e  $R_{22A_3}$  frente aos fitopatógenos de soja.

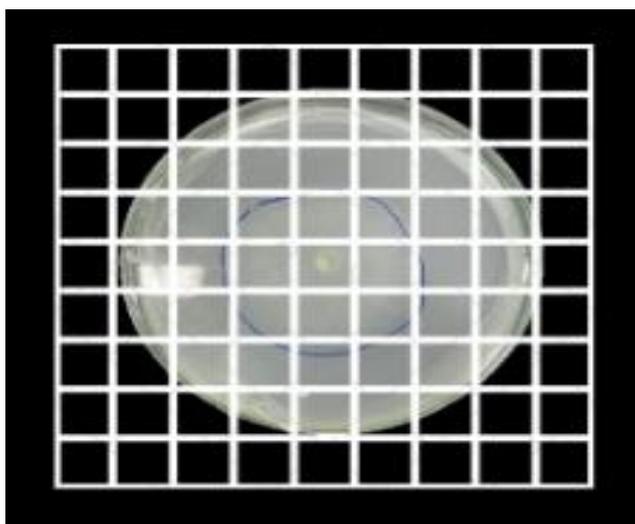


**Fonte:** BIREAHL (2023, p. 38)

#### 4.3.2. Delineamento experimental e análise do potencial antagonista dos fungos de mineração frente aos fitopatógenos de soja

A avaliação do diâmetro micelial dos fitopatógenos *F. Solani* e *M. phaseolina* e dos fungos de mineração R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub> e do *Aspergillus* foi realizada 24 horas após a inoculação dos micélios, utilizando uma lâmina quadriculada de área conhecida (grid). O grid foi desenvolvido a partir de uma adaptação da câmara de Neubauer. A lâmina é composta por 10cmx10cm de acrílico, cada quadrado tem 5 mm de lado, logo a área de cada quadrado é 25 mm. Dessa forma, a cada quatro quadrados pequenos forma a área de 1 cm<sup>2</sup> (Figura 8) Para cálculo de porcentagem de inibição do crescimento micelial, foi aplicada a fórmula: % inibição = [(crCvoláteis) / crcontrole] x 100, onde: crCvoláteis= crescimento radial compostos voláteis; crcontrole= crescimento radial controle.

**Figura 8:** Grid utilizado para contagem em área total de cada colônia fúngica e patogênica.

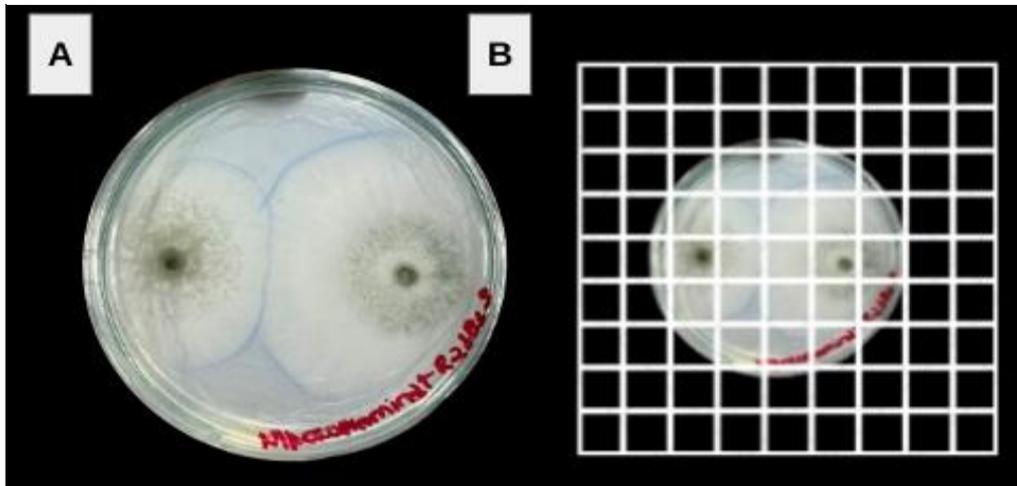


**Fonte:** Autora, 2023.

O grid permite determinar a área total de cada colônia fúngica que cresceu isoladamente na placa de Petri (controle), ou em placas com co-cultivo (confrontamento direto) conforme a Figura 9. A porcentagem de inibição foi calculada de acordo com a equação a seguir. I% é a porcentagem de inibição do fitopatógenos pelos fungos de mineração, C<sub>controle</sub> é a área de crescimento dos fungos cultivados isoladamente e C<sub>co-cultivo</sub> de mineração é a área de crescimento dos fungos cultivados na presença dos fungos de mineração.

$$I\% = \frac{C_{controle}}{C_{co-cultivo}} \times 100$$

**Figura 9-** Grid para a contagem das áreas das colônias dos Fitopatógenos frente aos fungos de mineração ( A- Cultivo pareado *In Vitro*; B- Cultivo pareado *In Vitro* com Grid).



**Fonte:** Autora, 2024

As áreas das colônias dos fitopatógenos e dos fungos de rejeito de mineração foram tabuladas e a porcentagem em que cada fitopatógeno na presença e ausência de cada fungo de mineração foi calculada. Dessa forma, foi possível determinar entre os dois fungos de mineração, aquele que apresentou o melhor percentual de inibição contra um dos fungos fitopatogênicos.

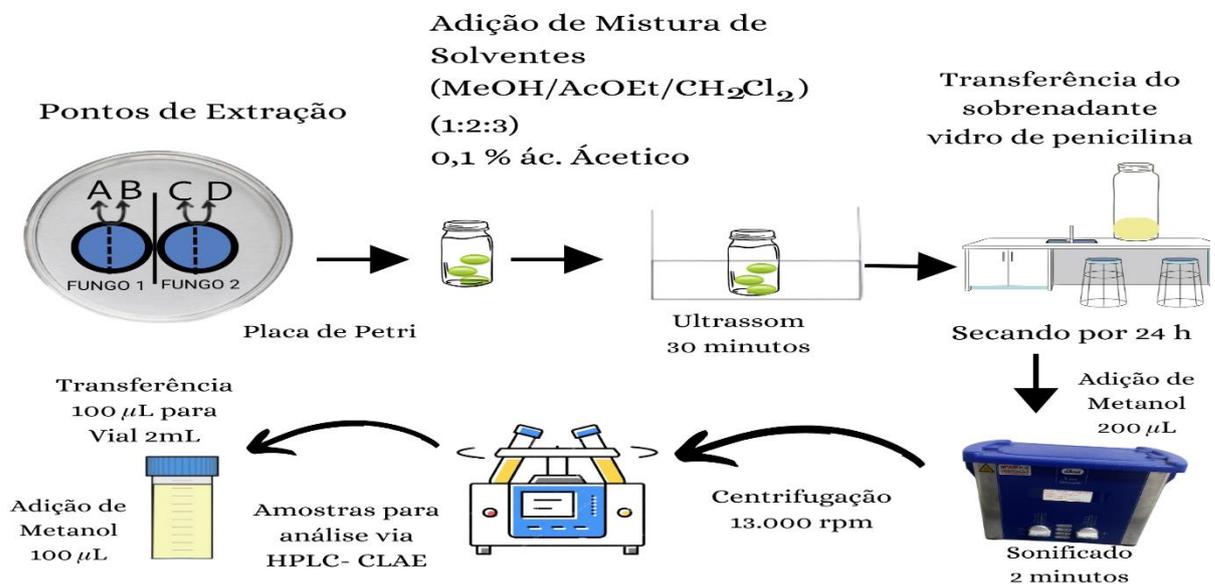
O crescimento dos fitopatógenos em presença de fungos de mineração foi utilizado para a elaboração de curvas de crescimento e determinação do tempo necessário para o início da inibição. Os resultados quantitativos foram avaliados estatisticamente através do teste de TSD ao nível de 95% de confiança ( $\alpha = 0,05$ ), utilizando o software gratuito *Paleontological Statistics* (PAST) (AL-ROBAI et al., 2017).

#### **4.4. Extração do co-cultivo fúngico em meio sólido.**

Os micro-extratos foram obtidos de acordo com a metodologia adaptada de SMEDSGAARD (1997). Com a ajuda de um canudo de 5 mm, foram cortados 21 plugs de 5 mm de diâmetro (7 de cada colônia). Os plugs foram transferidos para um vidro de penicilina. O volume de 2 mL da mistura de solventes MeOH:AcOEt:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:3:2) com 0.1% de ácido acético etílico foi colocado no vidro de penicilina e em seguida foi levado para o banho ultrassom (Quimis), por 30 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro

vidro de penicilina. Depois de deixar secando por 24 horas, o conteúdo foi ressolubilização em 200  $\mu\text{L}$  de MeOH e foi sonificado durante 2 minutos, o material foi transferido para um eppendorf e em seguida foi centrifugado em centrífuga refrigerada (Solab) por 10 minutos, sequencialmente, 100  $\mu\text{L}$  do volume foram transferidos para um vial de 2 mL e finalmente foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de metanol HPLC para análise em CLAE (DIONEX). As regiões de micro-extração podem ser visualizadas abaixo, pontuadas em regiões de interface de crescimento entre os fungos (região e extremidades).

**Figura 10:** Fluxograma de Processos extração do Co-cultivo em meio sólido.



**Fonte:** Autora, 2024.

#### 4.4.2. Caracterização dos micro-extratos por CLAE

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência dos micro-extratos foi realizada no Laboratório de Análises Químicas da Faculdade de Química da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará – UNIFESSPA, localizado na Unidade II, Folha 17, Quadra 04, Lote especial, s/ nº. O equipamento utilizado foi o HPLC Dionex, operado no foi realizado um gradiente exploratório (MeOH:H<sub>2</sub>O) iniciando com 5% de MeOH aumentando gradativamente até 95% em uma análise de 60 minutos. A coluna usada foi uma C18, com fluxo de 1 mL/min

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A reativação dos dois isolados *Aspergillus* e R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub> e os dois fitopatogênicos *Fusarium solani* e *Macrophomina phaseolina* apresentaram resultados positivos.

### 5.1. Teste de pareamento de cultura *in vitro*

No teste de pareamento *in vitro*, foi possível verificar que os isolados *Aspergillus* e R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub> apresentaram maior competitividade, pois cresceram por cima do patógeno *F. Solani* ocupando 100% da placa de Petri, conforme a Figura 9. O rápido crescimento dos isolados *Aspergillus* e R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub> em relação aos fitopatógenos *F. solani* e *M. phaseolina* pode indicar que estes isolados podem ser altamente competitivos por espaço e nutrientes em meio de cultura BDA.

De acordo Bosah et al. (2010), a avaliação do teste de cultura pareada é de grande relevância na área de controle biológico de fitopatógenos, uma vez que o alto desempenho neste teste sugere que os isolados *Aspergillus* e R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub> avaliados no teste de pareamento são eficazes na colonização rápida das estruturas do patógeno, o que aumenta o potencial do isolado para exercer o hiperparasitismo e, sobretudo, a competição por espaço e nutrientes (MARTINS-CORDER; MELO, 1998; CARVALHO et al., 2011). É importante salientar que os mecanismos de ação avaliados neste teste de pareamento, estão de acordo com o crescimento medido pelo Grid, em comparação com as placas controles, conforme a Tabela 1.

**Tabela 1** – Área de crescimento dos microrganismos e porcentagem de inibição dos fungos patogênicos pelos fungos de rejeito de mineração

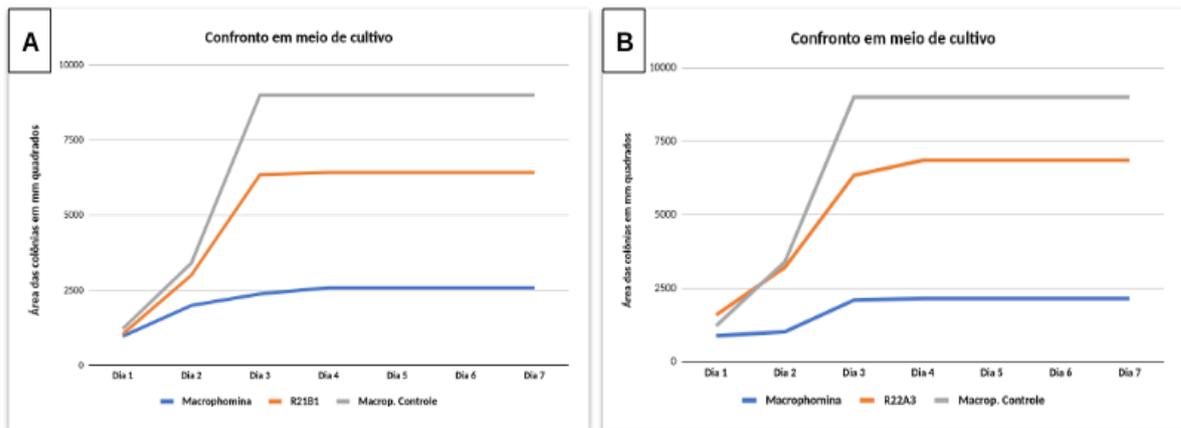
Microrganismos	Controle (mm <sup>2</sup> )	Confronto (mm <sup>2</sup> )	Inibição (%)
<b><i>Aspergillus</i> (R<sub>2</sub>1B<sub>1</sub>)</b>			
<i>Macrophomina phaseolina</i>	9000	2583,33	71,3
<b>R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub></b>			
<i>Macrophomina phaseolina</i>	9000	2150,00	76,11
<b><i>Aspergillus</i> (R<sub>2</sub>1B<sub>1</sub>)</b>			
<i>Fusarium solani</i>	3441,67	1108,33	67,8
<b>R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub></b>			
<i>Fusarium solani</i>	3441,67	1108,33	67,8

**Fonte:** Autora, 2024.

Conforme Monte et. al. (2019) os mecanismos que inibem os fungos fitopatogênicos, tais como as espécies *Aspergillus* e R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub> são o micoparasitismo, a antibiose e a competição. Na maioria dos casos, quanto mais complexo o mecanismo que o isolado oferece, melhor será o seu poder de controlar o fitopatógeno

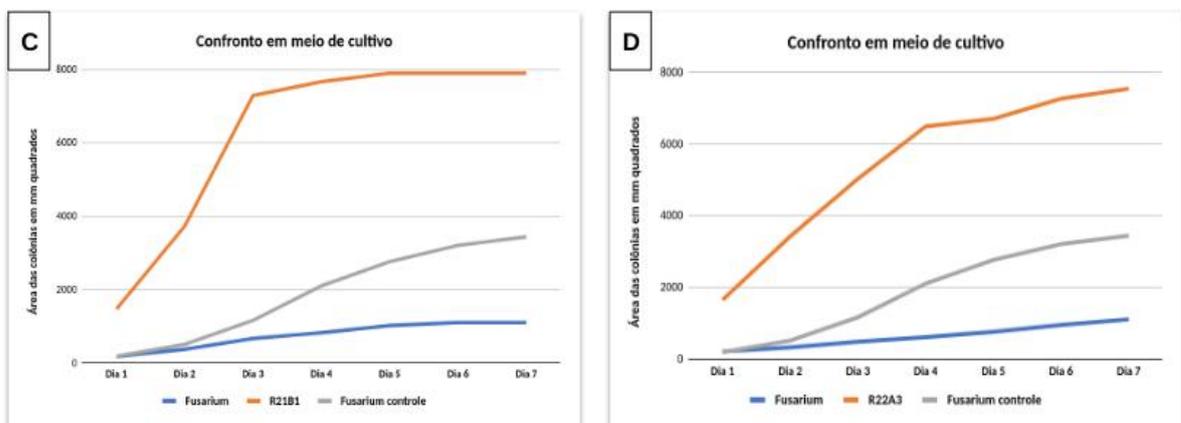
Os fungos de rejeito de mineração *Aspergillus* e R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub> empregados nesse estudo, revelaram a ação antagonista frente aos dois fungos fitopatogênicos (*F. solani* e *M. phaseolina*). Dessa forma, foi possível determinar os valores percentuais de inibição de cada fungo em confronto pareado, por meio do crescimento das colônias, segundo os Gráficos ( 1 e 2).

**Gráfico- 1:** Curva de crescimento do Co-cultivo dos fungos R<sub>2</sub>1B<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub> e o fitopatógeno *M. phaseolina* em meio sólido ( A- *Aspergillus* (R<sub>2</sub>1B<sub>1</sub>) e B- R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub>).



Fonte: Autora, 2024.

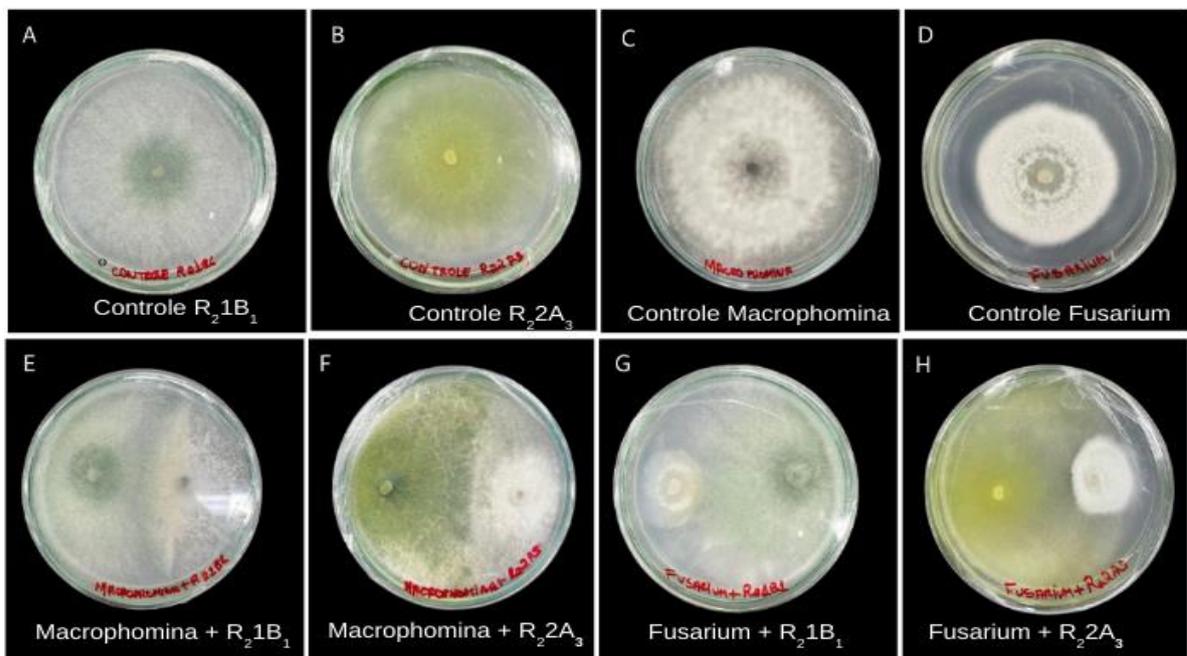
**Gráfico- 2:** Curva de crescimento do Co-cultivo dos fungos da área de mineração e o fitopatógeno *F. solani* em meio sólido ( C- *Aspergillus* (R<sub>2</sub>1B<sub>1</sub>) e D- R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub>).



Fonte: Autora, 2024

Após as análises, verificou-se que os isolados *Aspergillus* inibiram cerca de 71,3% do *M. phaseolina*, enquanto o R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub> apresentou de 76,11%, entretanto para o *F. solani* o *Aspergillus* e R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub> inibiram 67,8% para ambos (Figura 10). De acordo com Lana et al. (2016) a inibição do crescimento micelial acima de 50% demonstra seu potencial como agente de biocontrole. Em função desse resultado, os microrganismos foram selecionados para cultivo líquido e obtenção de extratos.

**Figura 11:** Potencial de inibição dos microrganismos fitopatogênicos de soja A- Controle R<sub>2</sub>1B<sub>1</sub>; B- Controle R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub> ; C - Controle *M. phaseolina*; D- Controle *F. solani*; E - Confrontamento *M. phaseolina* + R<sub>2</sub>1B<sub>1</sub>; F - Confrontamento *M. Phaseolina* + R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub>; G- *F. solani* + R<sub>2</sub>1B<sub>1</sub> e H- *F. solani* + R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub>.



**Fonte:** Autora, 2024.

## 5.2. Avaliação dos efeitos dos voláteis

Os resultados observados em relação ao efeito dos metabólitos voláteis constam na Tabela 2. Os isolados *Aspergillus* e R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub> apresentaram diferentes respostas em relação à inibição do crescimento dos patógenos. Em relação ao percentual de inibição do crescimento micelial, os isolados *Aspergillus* e R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub> testados apresentaram uma produção de metabólitos capazes de inibir o crescimento micelial do fungo *Fusarium solani*.

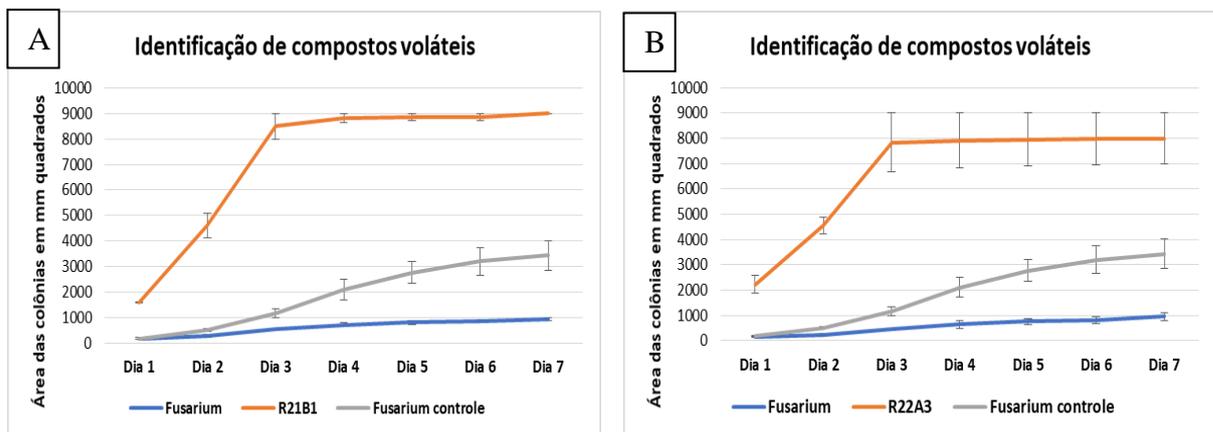
**Tabela 2-** Percentual de inibição dos Compostos Voláteis dos fungos patogênicos pelos fungos de rejeito de mineração.

Microrganismos	Controle (mm <sup>2</sup> )	Compostos voláteis (mm <sup>2</sup> )	Inibição (%)
<b><i>Aspergillus</i> (R<sub>2</sub>1B<sub>1</sub>)</b>			
<i>Macrophomina phaseolina</i>	9000	9000	0,0
<b>R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub></b>			
<i>Macrophomina phaseolina</i>	9000	9000	0,0
<b><i>Aspergillus</i> (R<sub>2</sub>1B<sub>1</sub>)</b>			
<i>Fusarium solani</i>	3441,67	941,6667	72,64
<b>R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub></b>			
<i>Fusarium solani</i>	3441,67	958,3333	72,2

**Fonte:** Autora, 2024.

Nos testes para a análise dos metabólitos voláteis, as placas controles contendo os patógenos colonizaram grande parte da superfície do meio de cultura. Após a exposição aos metabólitos voláteis, verificou-se uma redução no crescimento micelial do fitopatógeno *Fusarium solani* em comparação com o tratamento controle, conforme o Gráfico 3.

**Gráfico 3:** Fitopatógeno *Fusarium solani* após exposição aos metabólitos voláteis A- *Aspergillus* (R<sub>2</sub>1B<sub>1</sub>) e B- R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub> após 7 dias de incubação.

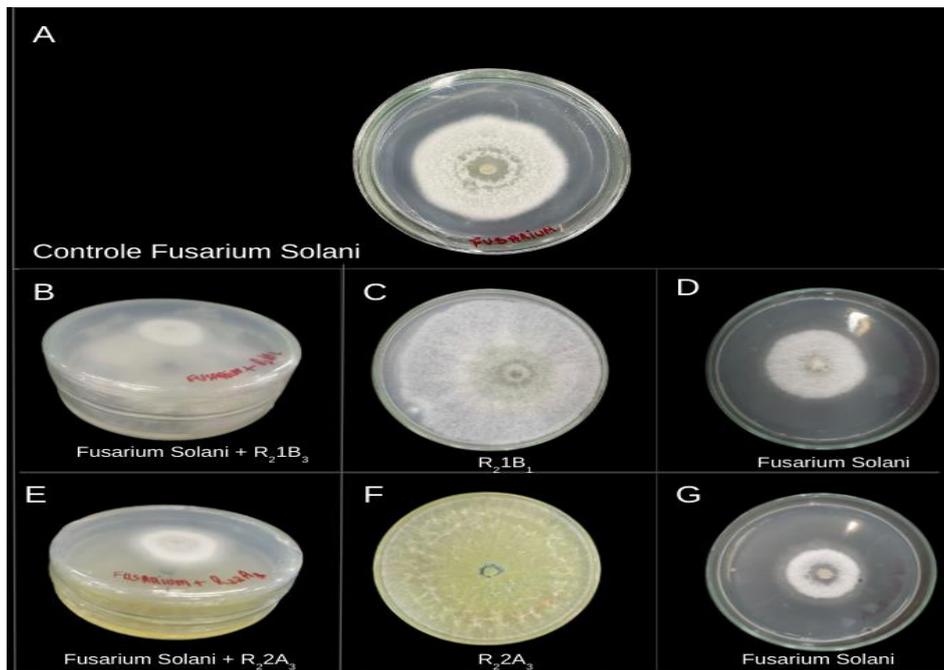


**Fonte:** Autora, 2024.

Segundo Chargas junior et al. (2018) verificou-se que após as medições os isolados *Aspergillus* (R<sub>2</sub>1B<sub>1</sub>) inibiram cerca 72,64% *F. solani*, enquanto o R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub> apresentou 72,2% do *F. solani* (Figura 11). Entretanto, assim como o *M. phaseolina* o *Aspergillus* (R<sub>2</sub>1B<sub>1</sub>) e R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub>

produzem compostos voláteis mas somente o *F. solani* é sensível à exposição deles. Isso dependerá da atividade de defesa desempenhada, da produção de substâncias inibitórias e da estrutura física dos isolados .

**Figura 12:** *Fusarium solani* em placa de Petri com meio BDA após a exposição aos metabólitos voláteis (A- Controle *Fusarium*; B- *Fusarium* e R<sub>2</sub>1B<sub>1</sub>; C- R<sub>2</sub>1B<sub>1</sub>; D- *Fusarium solani*; E- *Fusarium* e R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub>; F- R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub> e G- *Fusarium solani*).



Fonte: Autora, 2024

### 5.3. Caracterização dos micros-extratos por CLAE

Após a análise do HPLC, as amostras apresentaram resultados divergentes do que se estava esperando, uma vez que, na área de contato, esperava-se, que fossem produzidas substâncias capazes de inibir os fungos fitopatogênicos ou que nas áreas de controle fossem produzidas alguma substância mais intensa que fosse capaz de inibir o crescimento micelial dos os fungos patogênicos. No entanto, o que verificou-se foi que os fungo patogênicos estavam inibindo os fungos de mineração. Dessa forma, para que essas afirmações fossem confirmadas seria refazer as análise selecionando novos comprimentos de onda entre 215 nm, 254 nm, 280 e 365nm para que, dessa forma, obtivessem resultados mais concretos.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No teste de pareamento de culturas *in vitro*, para os fungos fitopatógenos *F. solani* e *M. phaseolina* frente aos isolados R<sub>2</sub>1B<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub> apresentaram mecanismos capazes de inibir o crescimento micelial dos mesmos. Os isolados R<sub>2</sub>1B<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub> inibiram 71,3 % e 76,11% do *M. phaseolina*, para o *F. solani* o percentual de inibição foi de 67,8% micelial para ambos.

Para o teste de metabólitos voláteis, os isolados R<sub>2</sub>1B<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>2A<sub>3</sub> apresentaram maior inibição para o fungo *F. solani* de 72,64% e 72,2%, entretanto para o *M. phaseolina* não apresentaram sensibilidade aos compostos voláteis visto que ambos produzem compostos voláteis.

No entanto, para a caracterização dos micros-extratos não foi possível apresentar resultando concisos, sendo necessário reafazer as análises observando novos comprimentos de onda para que se obtivessem resultados mais concretos.

Com isso, os resultados encontrados neste trabalho estimulam além da realização dos ensaios laboratoriais, mais estudos desses isolados, afim de verificar sua eficiência no controle *in vivo* de doenças em plantas.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos de Interesse: Aplicações Biotecnológicas. Universidade Estadual de Maringá – UEM. **Revista UNINGÁ Review** - Vol. 21, nº 1, pp.55-59. 2015.
- ABBAS, H. K. *et al.* Toxin production in soybean (*Glycine max* L.) plants with Charcoal Rot disease and by *Macrophomina phaseolina*, the fungus that causes the disease. **Toxins**, v. 11, n. 11, p. 645, 2019.
- ANDREWS, J. A. Biological control in the phyllosphere: realistic goal or false hope? **Canadian Journal of Plant Pathology**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 300–307, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07060669009501004>.
- ARNHOLD, E. R-environment package for regression analysis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s. l.] v. 53, n. 7, p. 870–873, jul. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2018000700012>
- BAKER, K. F.; COOK, R. J. **Handbook of Biological Control**. San Francisco. Elsevier, p. 778-782. 1999.
- BALAJEE, S. A. *et al.* Aspergillus species identification in the clinical setting. **Studies in mycology**, v. 59, p. 39-46, 2007.
- BALAJEE, S. Arunmozhi; MARR, Kieren A. **Phenotypic and genotypic identification of human pathogenic aspergilli**. *Future microbiology*, 1, 435-445.2006. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/17460913.1.4.435> .
- BLACKBURN, C. DE. **Food spoilage microorganisms**. 1. ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1201/9781439824573>.
- BELLÉ, R. B.; FONTANA, D. C. Patógenos de solo: principais doenças vasculares e radiculares e formas de controle. **Centro Científico Conhecer**, [s. l.], v. 15, n. 28, p. 779, 2018. Disponível em: [https://doi.org/10.18677/EnciBio\\_2018B65](https://doi.org/10.18677/EnciBio_2018B65)

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Eds.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p.334. 1995.

BOSAH, O.; IGELEKE, C. A.; OMORUSI, V. I. *In vitro* microbial control of pathogenic *Sclerotium rolfsii*. **International Journal of Agriculture & Biology**, v.12, n.3, p.474- 476, 2010.

BOTELHO, L. da S. **Detecção, transmissão e efeitos de Sclerotinia sclerotiorum em sementes de soja**. 2014. 156 f. Tese de doutorado – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/1666>. Acesso em: 19 de novembro de 2023.

BRIZUELA, M.A.; GARCÍA, L.; PÉREZ, L.; MANSUR, M. Basidiomicetos: nueva fonte de metabólitos secundários. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.15, p.69-74, 1998. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/247820>. Acesso em: 19 de novembro de 2023.

BIERHALS, Juliana Aparecida Teixeira Stanck. Dissertação (mestrado)- **Espécies de Trichoderma como bioncontrolador de Cyllindrocladium candelabrum e como promotores de crescimento em mudas de Eucalyptus benthammi** - Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Curitibanos, Programa de Pós-Graduação em Ecossistemas Agrícolas e Naturais, Curitibanos, 2023.

CHAGAS JUNIOR, A. F. et al. Ação de Trichoderma spp. no controle de Fusarium sp., Rhizoctonia solani e Sclerotium rolfsii. **Revista Agri-Environmental Sciences**, Palmas-TO, v. 4, n. 2, 2018.

CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO JÚNIOR, M.; SILVA, M. C. Controle de Fusarium oxysporum f.sp. phaseoli in vitro e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por Trichoderma harzianum. **Tropical Plant Pathology**, v.36, n.1, p.28-34, 2011.

Cassiolato, A. M. R. *et al.* Ação de mutantes de *Trichoderma harzianum* na formação, germinação carpogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* e sobrevivência de plantas de alface. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 34-38, 1997.

CAVACO, T. 2015. **Isolamento e Observação Microscópica de Fungos**. Aula Prática 13 – Isolamento e Observação Microscópica de Fungos. Disponível em: <https://slideplayer.com.br/slide/2756376/> . Acesso em: 16 novembro 2023.

COTRIM, G. S *et al.* Glycine max (L.) Merrill. (Soybean) metabolome response to potassium availability. **Phytochemistry**, p. 112472, 2022.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina***. Viçosa: UFV, 1978. 166 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA. **Tecnologia de produção de soja** - região Central do Brasil. Londrina, 2006.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA. **Macrophomina phaseolina em soja: sistema de semeadura, sobrevivência em restos de cultura e diversidade genética**. Londrina, 2014. 55p. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/989352/1/Doc.346OL.pdf>. Acesso em: 23 nov. 2023.

FANTINEL, V. S. et al. Biocontrole in vitro de *Colletotrichum siamense* utilizando *Trichoderma* spp. e *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. **Revista Ciência Agrícola**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 43, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.28998/rca.v16i3.4818>.

FARIA, A. Y. K.; CASSETARI NETO, D.; ALBUQUERQUE, M. C. A. Atividade antagônica in vitro de *Trichoderma harzianum* a patógenos de sementes de algodoeiro. **Revista Agricultura Tropical**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 59–68, 2002.

FUGA, C. A. G. *et al.* Efficiency and compatibility of *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. isolates on the inhibition of *Sclerotium cepivorum*. **Científica**, [s. l.], v. 44, n. 4, p. 526, 2016.

DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.15361/1984-5529.2016v44n4p526-531> .

GOIDANISH, G. Revisione del genere *Macrophomina* Petrak. Species tipica: *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. nov. comb. nec. *M. phaseoli* (Maubl.) Ashby. **Annali della Sperimentazione Agraria**, v. 1, p. 449-461, 1947.

GUARRO, Josep; XAVIER, Melissa Orzechowski; SEVERO, Luiz Carlos. Differences and similarities amongst pathogenic *Aspergillus* species. In: **Aspergillosis: from diagnosis to prevention**. Springer Netherlands, 2010. p. 7-32.

HIRAKURI, M. H., & LAZZAROTTO, J. J. (2014). O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro. **Embrapa Soja-Documentos** (INFOTECA-E), p. 70. 2014.

HOLLIDAY, P.; PUNITHALINGAN, E. *Macrophomina phaseolina*. **CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria**, n. 275, 1970. 2 p.

HOUBRAKEN, J. et al. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. **Studies in Mycology**, [s. l.], v. 95, p. 5–169, mar. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.05.002>.

IBGE, 2023. **Produção de cereais, leguminosas e oleaginosas**: Comparativo entre a safra 2022 e as estimativas para 2023, Brasil. URL <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamentosistematico-da-producao-agricola.html?=&t=resultados>. Acesso: 06 jan. 2024.

JACOB, C. J. *et al.*, A severe outbreak of black rot in cantaloupe melon caused by *Macrophomina phaseolina* in Chile. **Plant Disease**, v. 97, n. 1, p. 141–142, 2013.

JANE, A.; SHEILA, A.; JAMES, P. Evaluacion de la eficacia de aislamientos de *Trichoderma* sobre *Fusarium oxysporum* F. sp. *phaseoli*. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, [s. l.], v. 13, p. 99–107, 2011.

KNOX-DAVIES, P.S. Mitosis and aneuploidy in the vegetative hyphae of *Macrophomina phaseoli*. **American Journal of Botany**, v. 54, p. 1290- 1295, 1967

KIRK, P. et al. Dictionary of the Fungi. 10. ed. Wallingford: CABI International, 2008.  
Medrado, P. H. da S. **Fungos de solo no controle biológico de fitopatógenos**. 2019. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ecossistemas Agrícolas e Naturais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos.

KHAMARI, B. *et al.* Adaptability of *Macrophomina phaseolina*, the incident of stem and root rot disease of sesame to different regime of temperature, pH and light period. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, [s. l.], v. 7, n. 12, p. 761–766, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.712.094>

KLICH, M. A. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. New York. **Mycologia**, v. 94, n. 1, p. 21-27, Jan./Feb. 2002.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. North Ryde: **Common Wealth Scientific and Industrial Research Organization**, 116 p., 1988.

KRZYZANOWSKI, F.C.; FRANÇA-NETO, J.B.; HENNING, A.A. A Alta Qualidade da Semente de Soja: fator importante para a produção da cultura. Londrina, PR, Embrapa Soja - **Circular Técnica** 136, 2018. Acessado em 06 jan. 2024. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1091765>.

KUSHWAHA, S. K. *et al.* Effect of different media, pH and temperature on growth and sclerotia formation of *Sclerotium rolfsii* sacc. causing collar rot of lentil. **Chemical Science Review and Letters**, [s. l.], v. 8, n. 29, p. 1–5, 2019.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M. & TAKAHASHI DE MELO, N. **Tratado de Micologia médica**; Prefácio: Bertrand Dupont. 9. ed. São Paulo, Sarvier, 2002. 1104p. ilus. ISBN 85-7378-123-8.

LAKHDARI, W. et al. Inhibitory effect of *Trichoderma harzianum* on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and *Alternaria solani*. **Organic Agriculture**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 225–230, 2018. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13165-017-0186-6>.

MACHADO, M. Entenda a importância do tratamento de sementes na soja e milho. **Revista Cultivar**, Pelotas, jan. 2018. Disponível em: <https://www.grupocultivar.com.br/noticias/entenda-a-importancia-do-tratamento-deseementes-na-soja-e-milho>. Acesso em: 19 nov. 2023.

MASCARIN, Gabriel Moura *et al.* Produção industrial de *Trichoderma*. In: MEYER, Maurício Conrado; MAZARO, Sérgio Miguel; DA SILVA, Juliano Cesar (org.). **Trichoderma: Uso na agricultura**. 1. ed. Brasília: Embrapa, 2019. p. 255–274.

MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção “*in vitro*” para controle microbiológico. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, [s. l.], v. 1, p. 369–409, 1993.

MARTINS-CORDER, M. P.; MELO, I. S. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* Kleb. **Scientia Agricola**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 1–7, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-90161998000100002>.

MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: Imprensa Universitária, p. 400. 2005.

MONTE, Enrique; BETTIOL, Wagner; HERMOSA, Rosa. *Trichoderma* e seus mecanismos de ação para o controle de doenças de plantas. In: MEYER, Maurício Conrado; MAZARO, Sérgio Miguel; DA SILVA, Juliano Cesar (org.). **Trichoderma: Uso na agricultura**. 1. ed. Brasília: Embrapa, 2019. p. 181–199.

MORAES, Wanderson Buckner. Potenciais impactos das mudanças climáticas globais sobre a agricultura. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 5, n. 2, 2011.

MOZZAQUATRO, E. M. S. S., ALMIRAO, D. D. O., RIGHI, A. P., & LOPES, J. C. D. S. Viabilidade econômica da cultura da soja em uma propriedade rural. **Revista Congrega-Mostra de Trabalhos de Conclusão de Curso**-ISSN 2595- 3605, v.1, p. 806-824, 2017.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, Michael A. Microbiologia médica (6ª). **Elsevier**, p.856 2010.

NOMILA MERLIN, J. et al. Optimization of growth and bioactive metabolite production: *Fusarium solani*. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 98–103, 2013.

OLIVEIRA, Jeferson Carvalhaes de. **Tópicos em Micologia Médica**. Rio de Janeiro; 2014, 230 p.

OLIVEIRA, Rafael Lopes e. **Avaliação do Potencial Biotecnológico de Fungos**. Mestrado (dissertação). Universidade do Estado do Amazonas - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia. Manaus – AM, p. 82. 2010.

PIAS, T. H. **Diferentes tipos de tratamentos de sementes para a cultura da soja (*Glycine max L.*)**. 2014. 35 f. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – UNIJUÍ. Curso de Agronomia do Departamento de Estudos Agrários, Ijuí, 2014.

RUPE, J.C. Frequency and pathogenicity of *Fusarium solani* recovered from soybeans with sudden death syndrome. **Plant Disease**, [S.l.], v. 73, n. 7, p. 581-584, July 1989.

RUPE, J.C.; WEIDEMANN, G.J. Pathogenicity of a *Fusarium* sp. isolated from soybean plants with Sudden death syndrome. **Phytopathology**, [S.l.], v. 76, p. 1080, 1986.

TAKASHI, J.A.; LUCAS, E.M.F. Ocorrência e diversidade estrutural dos metabólitos fúngicos com atividade antibióticos. **Química Nova**, 31 (7) 18007-1813, 2008.

VIEIRA, B. S. *et al.* Potencial antagonístico de *Bacillus subtilis* (BSV-05) contra os patógenos radiculares do feijoeiro: *Fusarium* spp., *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani*. **Ciência Agrícola**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 59–66, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.28998/rca.v14i1.2333>

SAMSON, R. A.; VARGA, J. What is a species in *Aspergillus*? **Medical Mycology**, Oxford, v. 47, n. 13/20, p. 813-820, 1995. (Supplement 1).

SIDRIM, José Júlio Costa; ROCHA, Marcos Fábio Gadelha. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Guanabara Koogan, 1 ed. p. 396. 2004.