



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE
TECNOLOGIA



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

BIOPROSPECÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DO MANGUE PARA BIOCONTROLE DE *Corynespora cassiicola*

Iron Amoreli de Figueiredo Ribeiro

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava

**São Carlos – SP
2025**

IRON AMORELI DE FIGUEIREDO RIBEIRO

**BIOPROSPECÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS
ISOLADAS DO MANGUE PARA BIOCONTROLE DE
*Corynespora cassiicola***

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Henrique Marques Barbosa de Souza
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Dr. Gilson Paulo Manfio
Ideelab Biotecnologia

Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza
Universidade Federal de São Carlos – UFSCar

Prof. Dr. Adilson José da Silva
Universidade Federal de São Carlos – UFSCar

São Carlos, 2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de aprovação

Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Doutorado do candidato Iron Amoreli de Figueiredo Ribeiro, realizada em 18/02/2025:

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava
Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

Prof. Dr. Henrique Marques Barbosa de Souza
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Dr. Gilson Paulo Manfio
Ideelab Biotecnologia

Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza
Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

Prof. Dr. Adilson José da Silva
Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me sustentar em todos os meus desafios e conquistas.

A Érika Ventura, minha companheira de vida, por toda resiliência, parceria, carinho e cuidado durante a desafiadora jornada da pós-graduação aliada ao trabalho.

Aos meus pais, Toninho e Geiza, pelo infinito amor e por todos os dias de luta e dedicação para que seus filhos pudessem ter as melhores condições na busca pelos seus propósitos.

A vovó Zaia, que nos deixou no momento da elaboração deste trabalho, por ser a minha inspiração de vida desde os meus primeiros passos.

Ao meu orientador, professor Dr. Paulo Teixeira Lacava pela paciência e pelos valiosos ensinamentos que me acompanham desde a minha graduação.

A Agrivalle Brasil por todo apoio financeiro a este trabalho e por permitir e fomentar que, diariamente, eu pudesse me capacitar e me tornar um profissional mais completo.

Ao time de Pesquisa e Desenvolvimento da Agrivalle Brasil, em especial a todos que suportaram e aconselharam as etapas experimentais deste trabalho.

Ao Dr Gilson Paulo Manfio pelas valiosas conversas e aconselhamentos.

A todos os membros do DMP, em especial aos colegas Daniel e Victor, por todo suporte nas etapas experimentais e elaboração deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

RESUMO

Ribeiro, IAF. *Bioprospecção de actinobactérias isoladas do mangue para biocontrole de Corynespora cassiicola* [tese]. São Carlos: “Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos”, 2025.

A produtividade da cultura da soja é enfrenta ameaças significativas, como a mancha-alvo causada pelo patógeno *Corynespora cassiicola*. O controle biológico, por meio da bioprospecção em biomas com alto potencial biotecnológico como o mangue, emerge como uma alternativa para o manejo da doença e, nesse sentido, actinobactérias desse bioma representam um grupo promissor para o desenvolvimento de novos biofungicidas. No presente trabalho, 92 actinobactérias foram isoladas de amostras de sedimento do mangue da região de Cananéia, São Paulo, Brasil. Os isolados foram selecionados morfológicamente e avaliou-se seu potencial de controle *in vitro* dos fitopatógenos *Corynespora cassiicola*, *Colletotrichum truncatum*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Três isolados (MG04, MG26 e MG69) apresentaram atividade antifúngica para todos os fitopatógenos testados e foram selecionados para caracterização quanto à produção de enzimas líticas (quitinase e β -1,3-glucanase), ácido indol-3-acético (AIA), sideróforos, solubilização de fosfato inorgânico e potencial para controle *in vivo* de *C. cassiicola* na cultura da soja comparado à actinobactéria *Streptomyces* sp. ACTR8, linhagem de referência do banco de culturas da Agrivalle Brasil. Todos os isolados apresentaram produção positiva para enzimas líticas, AIA, sideróforos e nenhum foi positivo para solubilização de fosfato. Os isolados MG04 e MG26 se destacaram para a produção de quitinases e nenhum isolado se destacou para a produção de β -1,3-glucanase. O isolado MG26 também se destacou para a produção de AIA. A bactéria *Streptomyces* sp. ACTR8 se destacou para a produção de sideróforos. No ensaio de controle da mancha-alvo *in vivo*, todos os tratamentos apresentaram eficiência de controle significativa, com exceção do isolado MG69. Os isolados MG04 e MG26 apresentaram eficiência de controle da mancha-alvo estatisticamente semelhante ao um biofungicida comercial Twixx-A (Agrivalle). Realizou-se o sequenciamento, montagem e anotação do genoma do isolado MG04. Análises por métricas genômicas permitiram demonstrar que o genoma do isolado MG04 formou um clado com suporte estatístico na análise filogenômica junto a *S. solisilvae* HNM0141. A estratégia de *genome mining* permitiu identificar *clusters* gênicos com compostos já reportados com atividade biológica para o controle de fitopatógenos. O desenvolvimento de bioinsumos baseados em *Streptomyces solisilvae* MG04 requer caracterização do ingrediente ativo, otimização de bioprocessos para produção de esporos ou metabólitos, desenvolvimento de formulação e validação agrônômica em diferentes condições agrícolas. Para a mancha-alvo, é essencial avaliar a integração com fungicidas químicos e possíveis aplicações em diversas culturas e sistemas agrícolas.

Palavras-chave: Mangue. *Corynespora cassiicola*. *Streptomyces solisilvae*. Quitinase. Controle biológico. Bioinsumos. Soja

SUMMARY

Ribeiro, IAF. *Bioprospection of actinobacteria isolated from mangroves for the biocontrol of Corynespora cassiicola* [thesis]. São Carlos: “Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos”, 2025.

The soybean productivity faces significant threats, such as target spot caused by the pathogen *Corynespora cassiicola*. Biological control, through bioprospecting in biomes with high biotechnological potential, such as mangroves, emerges as an alternative for disease management. In this context, actinobacteria from this biome represent a promising group for the development of new biofungicides. In this study, 92 actinobacteria were isolated from mangrove sediment samples from the Cananéia region, São Paulo, Brazil. The isolates were morphologically selected and evaluated for their *in vitro* control potential against the phytopathogens *Corynespora cassiicola*, *Colletotrichum truncatum*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, and *Sclerotinia sclerotiorum*. Three isolates (MG04, MG26, and MG69) exhibited antifungal activity against all tested phytopathogens and were selected for characterization regarding the production of lytic enzymes (chitinase and β -1,3-glucanase), indole-3-acetic acid (IAA), siderophores, inorganic phosphate solubilization, and their potential for *in vivo* control of *C. cassiicola* in soybean, compared to the actinobacterium *Streptomyces* sp. ACTR8, a reference strain from Agrivalle Brasil's culture collection. All isolates tested positive to produce lytic enzymes, IAA, and siderophores, but none were positive for phosphate solubilization. Isolates MG04 and MG26 stood out in chitinase production, while none showed outstanding β -1,3-glucanase production. Isolate MG26 also exhibited high IAA production, whereas *Streptomyces* sp. ACTR8 stood out for siderophore production. In the *in vivo* target spot control assay, all treatments demonstrated significant control efficiency, except for isolate MG69. Isolates MG04 and MG26 showed target spot control efficiency statistically similar to the commercial biofungicide Twixx-A (Agrivalle). The genome of isolate MG04 was sequenced, assembled, and annotated. Genomic metric analyses demonstrated that the MG04 genome formed a statistically supported clade in the phylogenomic analysis with *S. solisilvae* HNM0141. The genome mining strategy allowed the identification of gene clusters with compounds previously reported for biological activity against phytopathogens. The development of bioinputs based on *Streptomyces solisilvae* MG04 requires characterization of the active ingredient, optimization of bioprocesses for spore or metabolite production, formulation development, and agronomic validation under different agricultural conditions. For target spot management, it is essential to evaluate integration with chemical fungicides and potential applications across various crops and agricultural systems.

Keywords: Mangrove. *Corynespora cassiicola*. *Streptomyces solisilvae*. Chitinase. Biocontrol. Bioinputs. Soybean.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição dos manguezais no mundo.....	2
Figura 2. Distribuição geográfica dos manguezais no Brasil.....	3
Figura 3. Produtividade e exportações de soja pelo Brasil de 2017 a 2023. *Estimativa segundo CONAB (2024)	9
Figura 4. Ciclo de vida da mancha-alvo (<i>Corynespora cassiicola</i>). (A) Sobrevivência em resíduos culturais, (B) Disseminação pela chuva e vento, (C) Infecção em raízes, caules, sementes, vagens e folhas, (D) Colonização, (E) Reprodução	13
Figura 5. A. Sintomas de mancha alvo em folhas de (A) algodão e (B) soja. Colônias puras em BDA (Batata Dextrose Ágar) de <i>Corynespora cassiicola</i> isoladas de algodão (C) e soja (D). Detalhes morfológicos de conidióforos (E) e conídios (F) de <i>C. cassiicola</i>	15
Figura 6. Média da porcentagem de controle da mancha-alvo com fungicidas químicos em ensaios cooperativos de 2011 a 2022.....	18
Figura 7. Principais mecanismos de promoção de crescimento vegetal por microrganismos. (1) Fixação biológica de nitrogênio (FBN), (2) Solubilização de fosfato, (3) Produção de ACC deaminase, (4) Produção de sideróforos, (5) Produção de fitormônios.....	22
Figura 8. Principais mecanismos de controle biológico. (1) Competição, (2) Indução de resistência sistêmica, (4) Antibiose, (5) Hiperparasitismo.....	29
Figura 9. Distribuição de defensivos biológicos em microrganismos, macro-organismos, semioquímicos e bioquímicos.....	31
Figura 10. Distribuição de registros de defensivos microbiológicos por alvo para diferentes subclasses nos Brasil.....	32
Figura 11. Etapas de desenvolvimento, industrialização e registro de bioinsumos	36
Figura 12. Classificação ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) de formulações agroquímicas.....	39
Figura 13. Região de coleta de sedimentos de manguezais. (A) Ilha do Cardoso. (B) e (C) Ilha da Casca. (D) Sedimento coletado de carcaça de animais na Ilha da Casca.....	66
Figura 14. Esquema representativo de técnica de co-cultivo para avaliação de atividade antagonista.....	70
Figura 15. (A) Pulverização dos tratamentos nas plantas. (B) Aplicação do inóculo até o ponto de escoamento superficial.....	79
Figura 16. (A) Preparo da suspensão de conídios de <i>Corynespora cassiicola</i> para inoculação em soja. (B) Ensaio conduzido em câmara de crescimento com controle de temperatura, umidade e fotoperíodo.....	80
Figura 17. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha-alvo da soja.....	80
Figura 18. Número de isolados obtidos por amostra nos meios de cultura GA, rafinose, SM3 e ISP2.....	82
Figura 19. Diversidade de morfotipos obtidos em condição de isolamento de actinobactérias.....	83
Figura 20. Ensaio de atividade antagonista <i>in vitro</i> dos isolados MG26, MG04 e MG69 para <i>Corynespora cassiicola</i>	85
Figura 21. Número total e percentual de isolados antagonistas à fitopatógenos em diferentes amostras de isolamento.....	86

Figura 22. Atividade de endoquitinase e exoquitinase de <i>Streptomyces</i> sp. ACTR8 e dos isolados MG26, MG69 e MG04.....	86
Figura 23. Atividade de β -1,3-endoglucanase de <i>Streptomyces</i> sp. ACTR8 e dos isolados MG26, MG69 e MG04.....	87
Figura 24. Resultados da avaliação quantitativa da produção de sideróforos por <i>Streptomyces</i> sp. ACTR8 e isolados MG26, MG69 e MG04.....	88
Figura 25. Resultados da avaliação quantitativa da produção de ácido indol-3-acético (AIA) por <i>Streptomyces</i> sp. ACTR8 e isolados MG26, MG69 e MG04.....	89
Figura 26. Solubilização de fosfato inorgânico por <i>Streptomyces</i> sp. ACTR8 e isolados MG26, MG69 e MG04.....	89
Figura 27. Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para os tratamentos controle, Twixx e <i>Streptomyces</i> sp. ACTR8 e isolados MG69, MG26 e MG04.....	91
Figura 28. Eficiência de controle para os tratamentos controle, Twixx e <i>Streptomyces</i> sp. ACTR8 e isolados MG69, MG26 e MG04.....	92
Figura 29. Fragmento de árvore filogenética inferida por Máxima Verossimilhança. Os números de acesso das sequências (ncbi.nlm.nih.gov/genbank) são mostrados após a descrição dos nomes e linhagens das espécies bacterianas (LPSN). Os círculos pretos nos pontos de ramificação indicam valores de bootstrap > 70%.....	121
Figura 30. Fragmento de cladograma de árvore filogenética inferida por Máxima Verossimilhança. Os números de acesso das sequências (ncbi.nlm.nih.gov/genbank) são mostrados após a descrição dos nomes e linhagens das espécies bacterianas (LPSN). Os círculos pretos nos pontos de ramificação indicam valores de bootstrap > 70%.....	123
Figura 31. Cladograma de árvore filogenética inferida por Máxima Verossimilhança. Os números de acesso das sequências (ncbi.nlm.nih.gov/genbank) são mostrados após a descrição dos nomes e linhagens das espécies bacterianas (LPSN). Os círculos pretos nos pontos de ramificação indicam valores de bootstrap > 70%.....	123
Figura 32. Árvore inferida a partir de 16S rDNA do genoma do isolado MG04. Os comprimentos dos ramos são dimensionados em termos da fórmula de distância d5 do GBDP. Os círculos pretos nos pontos de ramificação indicam valores de pseudo-bootstrap > 70% a partir de 100 replicações. A árvore filogenética foi enraizada no ponto médio.....	124
Figura 33. Identidade calculada entre os genomas do isolado MG04 e diferentes espécies/cepas de <i>Streptomyces</i> . Números de acessos dos genomas estão apresentados na Tabela 13.....	125
Figura 34. Árvore inferida a partir de distâncias intergenômicas do genoma da amostra MG04. Os comprimentos dos ramos são dimensionados em termos da fórmula de distância d5 do GBDP. Os círculos pretos nos pontos de ramificação indicam valores de pseudo-bootstrap > 70%, a partir de 100 replicações. A árvore filogenética foi enraizada no ponto médio.....	126
Figura 35. Ciclo de vida geral de <i>Streptomyces</i> em culturas sólidas (a) e líquidas (b). ('SM' e 'RM' são as abreviações para substrate mycelium - micélio de substrato e reproductive mycelium - micélio reprodutivo, respectivamente. A linha cinza horizontal no painel superior indica a superfície sólida. Os esporos são representados por círculos pretos.....	135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Defensivos biológicos registrados para controle de <i>C. cassiicola</i>	19
Tabela 2. Espécies de microrganismos registradas como defensivos microbiológicos no Brasil.....	33
Tabela 3. Identificação, local e tipo de amostragem de coleta realizada no mangue.....	65
Tabela 4. Meios de cultivo utilizados para isolamento de actinobactérias do mangue.....	67
Tabela 5. Descrição e concentrações dos tratamentos utilizados para avaliação do controle <i>in vivo</i> de <i>Corynespora cassiicola</i>	77
Tabela 6. Atividade antagonista <i>in vitro</i> de isolados contra fitopatógenos.....	83
Tabela 7. Resultados para os testes de atividade de quitinase, atividade de β -1,3-glucanase, produção de sideróforos, produção de ácido indol-3-acético (AIA) e solubilização de fosfato inorgânico para <i>Streptomyces</i> sp. ACTR8 e isolados MG04, MG26 e MG69 (médias $\pm$ DP, n=3)	90
Tabela 8. Severidade de mancha alvo (%), Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) e eficiência de controle (%) em ensaio de eficácia agrônômica de produtos na cultura da soja. cv. BMX Potência RR.....	91
Tabela 9. Nota de fitotoxidez de produtos em ensaio de eficácia agrônômica de produtos na cultura da soja. cv. BMX Potência R.....	92
Tabela 10. Estatísticas da extração de DNA.....	119
Tabela 11. Estatísticas de sequenciamento e montagem do genoma.....	119
Tabela 12. Resultados da análise de ANI. Números de acesso dos genomas são apresentados entre parênteses.....	125
Tabela 13. Resultados da análise de dDDH.....	126
Tabela 14. Estatísticas da anotação do genoma.....	127
Tabela 15. Vias biológicas do isolado MG04 inspecionadas para biossíntese de metabólitos secundários obtidas a partir de análise no Pathway Tools.....	127
Tabela 16. Regiões de agrupamentos gênicos para biossíntese de compostos com potencial ação biocida.....	128
Tabela 17. Regiões de agrupamentos gênicos para biossíntese de potenciais quelantes.....	128

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1.1 O BIOMA MANGUE E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO	1
1.2 A CULTURA DA SOJA E SUA RELEVÂNCIA ECONÔMICA	7
1.3 A MANCHA ALVO	10
1.4 ACTINOBACTÉRIAS E SEU POTENCIAL DE APLICAÇÃO AGRÍCOLA	19
1.5 O CONTROLE BIOLÓGICO NO CONTEXTO DOS BIOINSUMOS	30
REFERÊNCIAS	42
CAPÍTULO 2 - ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E POTENCIAL BIOCONTROLE <i>IN VIVO</i> DE <i>Corynespora cassiicola</i> POR ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DO MANGUE.....	63
2.1 INTRODUÇÃO	63
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS	65
2.2.1 Amostragem de sedimentos do mangue	65
2.2.2 Isolamento de actinobactérias	66
2.2.3 Atividade fungicida <i>in vitro</i>	69
2.2.4 Atividade de quitinase	70
2.2.5 Atividade de β -1,3-Glucanase	72
2.2.6 Produção de sideróforos.....	74
2.2.7 Produção de substâncias indólicas	75
2.2.8 Solubilização de fosfato inorgânico	76
2.2.9 Controle de <i>Corynespora cassiicola in vivo</i>	77
2.3 RESULTADOS.....	81
2.3.1 Amostragem e isolamento de actinobactérias do mangue.....	81
2.3.2 Atividade fungicida <i>in vitro</i>	82
2.3.3 Atividade de quitinase	85
2.3.4 Atividade de β -1,3-glucanase.....	86
2.3.5 Produção de sideróforos.....	87
2.3.6 Produção de substâncias indólicas	87
2.3.7 Solubilização de fosfato inorgânico	88
2.3.8 Controle de <i>Corynespora cassiicola in vivo</i>	89
2.4 DISCUSSÃO	92
2.5 CONCLUSÕES	102
REFERÊNCIAS	104
CAPÍTULO 3 – IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE <i>Streptomyces solisilvae</i>	

MG04 E PROPOSIÇÃO DE ROTAS DE DESENVOLVIMENTO DE UM BIOINSUMO	112
3.1 INTRODUÇÃO	112
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	114
3.2.1 Extração, sequenciamento, montagem e anotação do DNA genômico	114
3.2.2 Análise do gene 16S rDNA	115
3.2.3 Identificação de espécie por métricas genômicas e filogenia genômica	116
3.2.4 Predição gênica e anotação genômica	116
3.2.5 Identificação de genes envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários – <i>genome mining</i>	117
3.3 RESULTADOS	118
3.3.1 Extração, sequenciamento, montagem e anotação do DNA genômico	118
3.3.2 Análise do gene 16s rDNA	119
3.3.3 Identificação de espécie por métricas genômicas e filogenia genômica	122
3.3.4 Predição gênica e anotação genômica	125
3.3.5 Identificação de genes envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários	125
3.4 DISCUSSÃO	127
3.4.1 Identificação molecular	127
3.4.2 Proposição de rotas tecnológicas para desenvolvimento de um bioinsumo a baseado em <i>Streptomyces solisilvae</i> MG04	129
3.5 CONCLUSÕES	139
REFERÊNCIAS	140

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 O BIOMA MANGUE E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

Manguezais consistem em grupos de plantas que se desenvolvem no ecossistema costeiro, entre a terra e o mar, conhecida também como região entre marés. Estão localizadas em ambientes de baixa latitude, principalmente nas áreas tropicais e subtropicais do planeta(DOS SANTOS; DE LIMA, 2021). Assim, conforme definido pelo ICMBio (2018), o ecossistema manguezal é um espaço onde ocorrem interações complexas entre organismos vegetais, animais e microbianos que ocupam a região do manguezal e são influenciados pelos fatores abióticos presentes em seu ambiente.

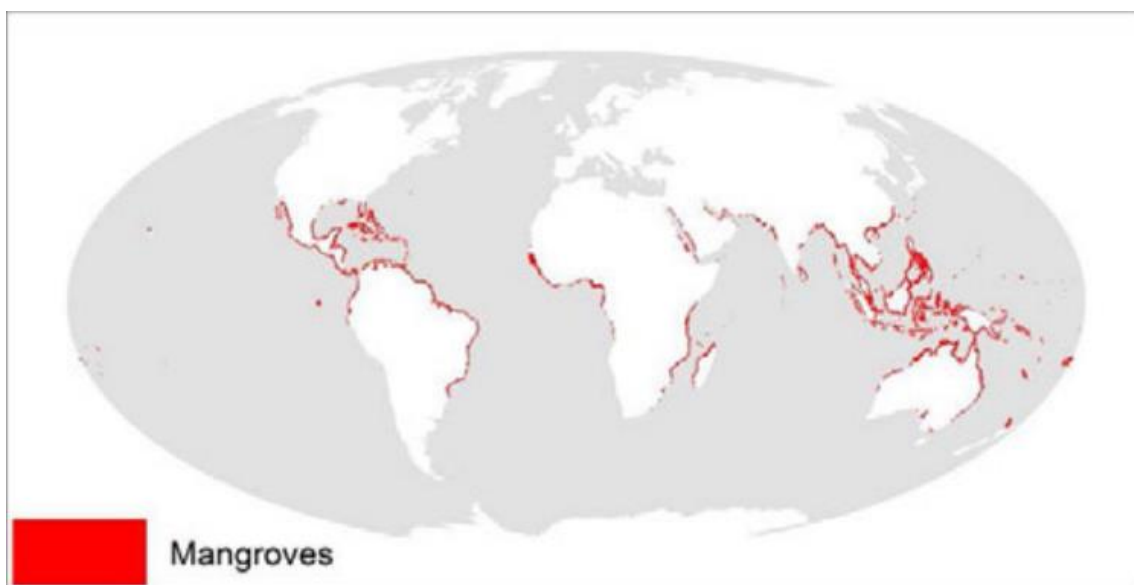
A relevância desse ecossistema reside na sua habilidade em atenuar os impactos das marés, evitar a erosão costeira e desempenhar um papel de barreira natural em face de eventos climáticos extremos, como furacões e tsunamis(ALONGI, 2008; ROBLES LÓPEZ *et al.*, 2019). Além disso, esses ecossistemas constituem um habitat para um vasto número de espécies, tais como aves, mamíferos, insetos, aracnídeos, nematoides, moluscos, crustáceos e até mesmo microrganismos, incluindo fungos, bactérias e vírus (ROBLES LÓPEZ *et al.*, 2019). Esses ambientes são considerados verdadeiros berçários de reprodução para a maioria das espécies citadas (BOUILLON *et al.*, 2008).

Adicionalmente, é imprescindível destacar que os ecossistemas de manguezais desempenham um papel fundamental na preservação do estoque de carbono orgânico, permitindo assim o seu armazenamento a longo prazo. Cabe ressaltar que o carbono capturado por ecossistemas costeiros é denominado de carbono azul, que engloba toda a matéria orgânica retida por organismos marinhos e que pode ser empregada para atenuar os impactos ocasionados pela mudança climática (LOVELOCK; DUARTE, 2019; TAILLARDAT; FRIESS; LUPASCU, 2018).

Estima-se que, mundialmente, a área total de manguezais é considerada em cerca de 137600 km², sendo que a Ásia apresenta a maior proporção de manguezais com 38,7% da área global, enquanto América Latina e Caribe possuem 20,3%, África possui 20,0%, Oceania possui 11,9%, América do Norte possui 8,4% e a Europa somente 0,7%(BUNTING *et al.*, 2018).

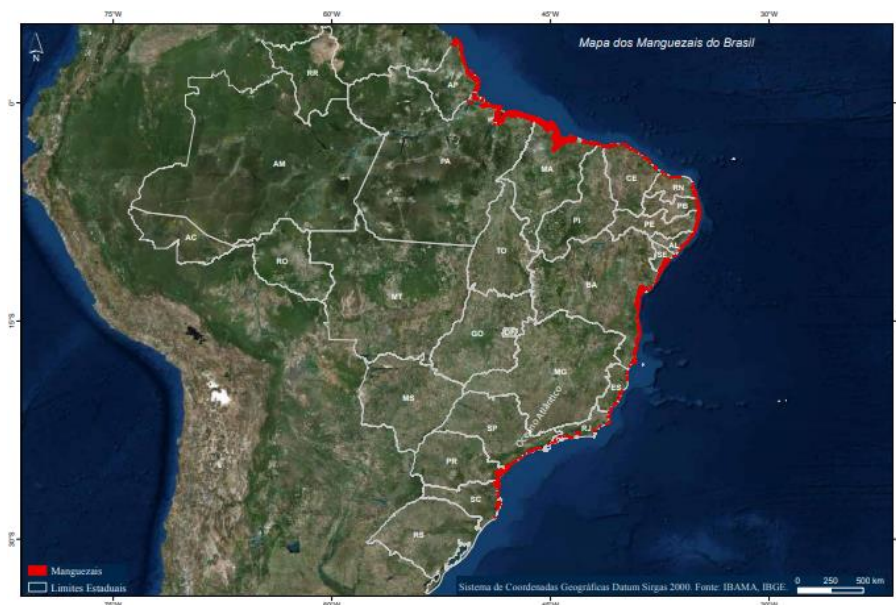
Segundo MAGRIS & BARRETO (2010), o Brasil possui um total de 1.071.083,74 hectares de manguezais em seu território (Figura 2). No país, as áreas de manguezal ocorrem ao longo de um extenso litoral, conforme evidenciado na Figura 1. A área de abrangência se estende desde a foz do rio Oiapoque, ao norte, até Laguna, no estado de Santa Catarina, ao sul (OTTONI *et al.*, 2021). A costa brasileira, em geral, apresenta condições favoráveis para o desenvolvimento desse ecossistema. Com exceção do litoral do Rio Grande do Sul, onde as condições climáticas demonstram um desafio para o estabelecimento e desenvolvimento dos manguezais (ICMBIO, 2018).

Figura 1. Distribuição dos manguezais no mundo.



Fonte: Retirado de SPALDING (2010)

Figura 2. Distribuição geográfica dos manguezais no Brasil



Fonte: Retirado de ICMBIO (2018)

Apesar de sua grande importância e das características de resistência que possui, o ecossistema dos manguezais é fortemente influenciado pelas atividades humanas, incluindo as mudanças climáticas. De acordo com WARD *et al* (2016), diversos processos decorrentes das mudanças climáticas podem afetar os manguezais, tais como a elevação do nível do mar, mudanças nas correntes oceânicas, aumento das tempestades, aumento da temperatura, mudanças na precipitação e aumento da concentração de CO₂ na atmosfera. Dessa forma, atualmente, os manguezais estão sendo mais intensamente afetados pelo desenvolvimento urbano, aquicultura, mineração e superexploração de recursos naturais, como madeira, peixes, crustáceos e moluscos (ALONGI, 2002).

Estima-se que no período de 1996 a 2020 uma área total de 5245 km² de manguezais nativos tenha sido perdida, equivalente à 3,4% do total (BUNTING *et al.*, 2018). Projeções indicam que, se a taxa atual de perda dos manguezais persistir nas próximas centenas de anos, é esperada a total extinção dessas florestas, bem como uma perda de 30-40% das áreas úmidas costeiras (GIRI *et al.*, 2011). Segundo dados do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBIO, 2018), estima-se que tenha ocorrido uma redução de 25% da extensão dos manguezais no território brasileiro desde o início do século XX. As regiões Nordeste e Sudeste são as que apresentam maiores impactos, com elevado grau de fragmentação desses ecossistemas.

Nesse sentido, a conservação do bioma mangue desempenha um papel crucial na preservação da biodiversidade marinha e costeira (TAILLARDAT; FRIESS; LUPASCU, 2018), além de ter um potencial biotecnológico significativo para microrganismos. No âmbito biotecnológico, os microrganismos encontrados nos manguezais possuem um vasto potencial para a descoberta de novos compostos, enzimas e medicamentos, sendo fontes valiosas de pesquisa para a indústria farmacêutica e biotecnológica (CASTRO *et al.*, 2014; DIAS *et al.*, 2009; THATOI *et al.*, 2013).

Os microrganismos, principalmente fungos e bactérias, são considerados uma classe de grande importância para o ecossistema dos manguezais. Esses organismos são encontrados principalmente nas raízes das plantas que habitam esses ambientes (ZHUANG *et al.*, 2020). Além disso, eles estabelecem uma relação simbiótica com os vegetais, na qual se beneficiam dos detritos gerados por eles, tais como folhas mortas, utilizando-as para o seu crescimento e desenvolvimento (JENNERJAHN; ITTEKKOT, 2002). Nos manguezais tropicais, os microrganismos são responsáveis por constituir 91% da biomassa microbiana total, enquanto as algas e protozoários contribuem com apenas 7% e 2%, respectivamente (DE SOUZA SEBASTIANES *et al.*, 2013; THATOI *et al.*, 2013). É importante salientar que os microrganismos apresentam um mecanismo de reciclagem e conservação de nutrientes, assim são capazes de gerar, a partir da matéria orgânica, fontes de nitrogênio, fósforo e outros nutrientes, que podem ser utilizadas pelas plantas (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001). Além disso, fungos rizosféricos podem ser essenciais para a sobrevivência de manguezais em ambientes alagados (ZHUANG *et al.*, 2020).

Além da notável importância para o equilíbrio do ambiente dos manguezais, atuando na criação e manutenção dessa biosfera, os microrganismos presentes nestas regiões podem ser fonte de produtos biotecnológicos de alto valor e importância, devido a algumas características intrínsecas (DE SOUZA SEBASTIANES *et al.*, 2013; LACAVA; BOGAS; MOREIRA, 2022; SEBASTIANES; DE AZEVEDO; LACAVA, 2017; THATOI *et al.*, 2013). Esse grupo de organismos é responsável por agrupar o maior número de microrganismos marinhos dotados com notável capacidade de resistência a ambientes extremos, o que por sua vez, pode torná-los aptos para produzir novas substâncias com potencial de atividade biológica (CASTRO *et al.*, 2014, 2018; MARTINHO *et al.*, 2019; SADEER; ZENGİN; MAHOMOODALLY, 2023). Ademais, a microflora dessas regiões pode ser utilizada para a produção de

medicamentos, enzimas, vacinas, agentes antimicrobianos, moduladores imunológicos, tratamentos anticancerígenos, inseticidas e vitaminas (SINGH; SINGH; PANDA, 2020). Os fungos associados a essas regiões, são responsáveis pela produção de diversas substâncias, tais como liamocina, ácidos graxos poliinsaturados, biocombustíveis, xilitol, enzimas e substâncias bioativas, que possuem potencial para ser utilizada em uma grande variedade de indústrias, tais como, alimentícia, agrícola e farmacêutica (JIA *et al.*, 2020).

Os microrganismos do mangue são úteis para a produção de enzimas em grande quantidade e a baixo custo. Tais moléculas são úteis em vários campos como processamento de alimentos, fabricação de têxteis, produtos agrícolas e farmacêuticos, terapia médica e biologia (SINGH; SINGH; PANDA, 2020). De acordo com BIBI *et al.* (2017), foram identificadas ao todo cerca de 46 bactérias rizofíticas coletadas a partir do solo, raízes e folhas das plantas de mangue da Arábia Saudita. Desse total, 14 cepas bacterianas demonstraram atividade celulítica, 2 foram positivas para protease, 13 para atividade de lipase e 6 para atividade de amilase, sendo estas enzimas de alta relevância industrial. Ainda, um vasto número de trabalhos na literatura reporta a atividade de microrganismos endofíticos do mangue com atividade antimicrobiana (MOREIRA *et al.*, 2020, 2023; SEBASTIANES *et al.*, 2012; SOUZA SEBASTIANES *et al.*, 2017), produção de ácidos orgânicos (DEZAM *et al.*, 2017) e enzimas de aplicação industrial (MAROLDI *et al.*, 2018).

Microrganismos dos mangues também já foram caracterizados pela produção de biossurfactantes, que têm a capacidade de facilitar a assimilação de substratos insolúveis, tais como os hidrocarbonetos e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) (MARTINHO *et al.*, 2019). Tais moléculas são úteis uma vez que potencializam o processo de biodegradação desses compostos, pela capacidade de dissolvê-los e emulsificá-los (SAIMMAI *et al.*, 2012). Porém, é importante ressaltar que os biossurfactantes apresentam diversas outras propriedades e características passíveis de aplicação em outros setores, a saber: indústrias alimentícia, cosmética, biopesticida e farmacêutica. A existência de certas características, tais como facilidade de produção, menor toxicidade, maior biodegradabilidade e compatibilidade ambiental, tem levado a uma maior atenção em relação a esses compostos quando comparados com os surfactantes químicos (THATOI *et al.*, 2013).

Os manguezais oferecem um vasto potencial para a descoberta de novos fármacos devido às propriedades antimicrobianas de organismos associados a esse

ecossistema (THATOI *et al.*, 2013). Os endófitos de plantas do mangue são notáveis por suas propriedades medicinais, abrangendo atividades antibacterianas, antifúngicas, anticancerígenas, antimaláricas, antivirais, antioxidantes e antidiabéticas, relacionadas à presença de diversos metabólitos ativos, como alcaloides, fenóis, esteroides, terpenoides e taninos (PATRA; MOHANTA, 2014). Até o momento, sete drogas terapêuticas provenientes de ambientes costeiros foram aprovadas, enquanto outras 23 estão em ensaios clínicos, incluindo tratamentos para câncer (SADEER; ZENGIN; MAHOMOODALLY, 2023).

Além das aplicações farmacêuticas, os micróbios do mangue desempenham um papel importante na síntese de pigmentos com propriedades benéficas. Esses pigmentos, derivados de fauna e flora, possuem características não tóxicas, biodegradáveis e não cancerígenas, com ação antibiótica, anticancerígena, cicatrizante e imunossupressora. Essas substâncias têm potencial para serem exploradas em diversos setores, como cosméticos, indústria alimentícia e agricultura (SADEER; ZENGIN; MAHOMOODALLY, 2023). Além disso, fungos e bactérias associados ao mangue têm contribuído para a produção de biodiesel, apresentando vantagens em relação a fontes tradicionais, como facilidade de cultivo, ciclos de vida curtos e capacidade de usar fontes de carbono renováveis (MUTHUSAMY *et al.*, 2019; THATOI *et al.*, 2013).

Uma outra possível aplicação da microbiota desses ambientes está na sua utilização em setores agrícolas, promovendo o crescimento de vegetais e na substituição de pesticidas químicos (THATOI *et al.*, 2013). A rizosfera do solo do mangue é composta por microrganismos úteis e altamente benéficos para as plantas, uma vez que são capazes de fixar nitrogênio, solubilizar fosfatos, produzir amônia e desencadear a produção de reguladores de crescimento vegetal (SINGH; SINGH; PANDA, 2020). Duas cepas, *Pseudomonas fluorescens* e *Enterobacter* sp., foram isoladas e selecionadas em virtude da sua relevância na produção de ácido indolacético (AIA), bem como nos processos de fixação de nitrogênio e solubilização de fósforo. As linhagens em questão foram inoculadas em árvores de reflorestamento (*Acacia polyphylla*), nos quais constatou-se a promoção de crescimento (CASTRO *et al.*, 2018). Além disso, um estudo adicional objetivou a consecução do isolamento de cepas bacterianas a partir de *Streptomyces imbricatae*, uma planta de origem Saudita, de modo que 22 linhagens apresentaram atividade contra fitopatógenos (BIBI *et al.*, 2018).

Referente a produção de biopesticidas, segundo estudo realizado por HAO *et al.* (2019), através de ensaios *in vitro*, foi possível identificar isolados produtores de compostos que atuam contra uma variedade de fitopatógenos. Dentre os 113 isolados, os gêneros *Streptomyces* e *Bacillus* se destacaram por estarem em maior quantidade. Contudo, identificou-se também a presença dos gêneros *Micromonospora*, *Microbacterium* e *Nocardiopsis*. Adicionalmente a isso, actinobactérias do gênero *Streptomyces* sp. foram caracterizadas por produzir uma vasta gama de antibióticos, que podem ser aplicados para inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas(SINGH; SINGH; PANDA, 2020). Ainda, uma diversidade de trabalhos tem reportado este bioma como uma importante fonte de microrganismos que podem ser aplicados como agentes de controle biológico ou promoção de crescimento vegetal, especialmente, actinobactérias (FILIZOLA *et al.*, 2019; PUSPARAJAH *et al.*, 2023; RISHAD *et al.*, 2017; SHRIVASTAVA *et al.*, 2015; VINOD KUMAR; SUBHA RAJAM; ESTHER RANI, 2017; ZHOU *et al.*, 2022).

1.2 A CULTURA DA SOJA E SUA RELEVÂNCIA ECONÔMICA

A soja (*Glycine max* L.) é o principal grão produzido no país, desempenhando um papel de destaque na economia do país, sendo um dos pilares do agronegócio brasileiro. A soja é uma planta da família Fabaceae originária do nordeste da China e teve seu centro de origem na Ásia. Devido à sua adaptação a climas temperados, a soja passou por melhoramento genético para ser cultivada em países tropicais, como o Brasil (CATTELAN; DALL'AGNOL, 2018). Ela é uma das principais oleaginosas do mundo e tem sido parte essencial da dieta de muitas populações (CHEN *et al.*, 2012).

Dentre os fatores que contribuem para o aumento no consumo mundial de soja está, principalmente, o crescente poder aquisitivo da população nos países em desenvolvimento, o que vem provocando uma mudança no hábito alimentar. Assim, observa-se cada vez mais a troca de cereais por carne bovina, suína e de frango. Esses fatores culminam em uma elevada necessidade de soja, um componente que constitui 70% da alimentação desses animais (VENCATO *et al.*, 2010). Não menos importante é a crescente utilização de biocombustíveis derivados desse grão, impulsionada pelo aumento do interesse global na produção e consumo de energia renovável e sustentável.

No ano de 2020, um total de 62 nações, somados aos 27 países membros da União Europeia, cultivaram soja, resultando em uma produção total de 339 milhões

de toneladas de soja em uma área de 123 milhões de hectares. Os principais produtores desse ano estavam situados nas Américas, mais especificamente no Brasil, Estados Unidos e Argentina. Em conjunto, esses países foram responsáveis por impressionantes 80,6% da produção global de soja, com o Brasil contribuindo com 37,8%, os Estados Unidos com 28,4% e a Argentina com 14,4%, equivalendo a um total de 274 milhões de toneladas (USDA, 2021).

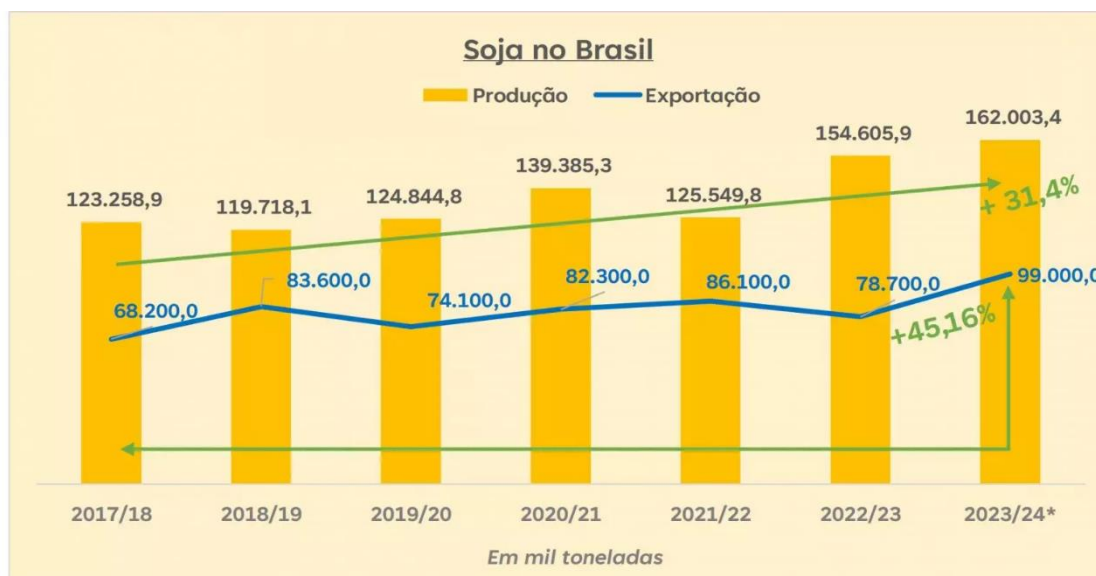
No mesmo ano, as exportações globais de soja totalizaram 165 milhões de toneladas, representando 49% da produção mundial. Os maiores produtores, Brasil, Estados Unidos e Argentina, foram também os principais exportadores, respondendo por 89,57% das exportações de soja global. Somando os volumes da Bolívia, Paraguai, Uruguai e Canadá, as Américas foram responsáveis por 97,12% das exportações mundiais de soja, resultando em uma concentração significativa do mercado. Por outro lado, China e União Europeia lideraram como os maiores consumidores de soja, com a China sendo o principal consumidor global. Em 2020, a China importou 98,5 milhões de toneladas de soja, quase seis vezes mais do que a União Europeia, que importou 15 milhões de toneladas (USDA, 2021).

No Brasil, o cultivo de soja teve seus primeiros registros no final do século XIX, na Bahia. No entanto, somente nas décadas de 1920 e 1940 é que o cultivo começou a ser mais efetivo no país, com a região sul se destacando como pioneira nesse plantio. A expansão significativa da cultura da soja no Brasil teve seu ponto de partida na década de 1970, coincidindo com a ampliação da indústria de óleo de soja e a abertura e consolidação de novas áreas para agricultura na região Sul do país. Durante os anos 80, a expansão já havia se estendido até a região Centro-Oeste, que então viu sua participação na produção nacional de soja crescer significativamente, indo de menos de 2% para 20% (DALL'AGNOL, 2016). O aumento da demanda internacional por esse grão também impulsionou o início das atividades comerciais em grande escala na sojicultura. O progresso da soja no Brasil foi fortemente influenciado pelo desenvolvimento rápido de tecnologias e pesquisas voltadas para atender à crescente demanda externa (CATTELAN; DALL'AGNOL, 2018).

Atualmente, o Brasil é o maior produtor e exportador de soja a nível mundial (USDA, 2024). Na safra 2022/2023, o Brasil operou com uma área plantada da cultura da soja na ordem de 44 milhões de hectares e alcançou uma produtividade de 154 milhões de toneladas. Estes dados representam um incremento de 6,2% na área semeada e de 23,2% em produtividade. Na mesma safra, o Brasil performou um

volume de exportação de soja de 96 milhões de toneladas de soja, um volume equivalente à 62% da produção total (CONAB, 2024; EMBRAPA SOJA, 2023).

Figura 3. Produtividade e exportações de soja pelo Brasil de 2017 a 2023. * Estimativa segundo CONAB (2024)



Fonte: Retirado de TERRA INVESTIMENTOS (2023).

Um fator importante para o aumento na demanda global de soja é o aumento do poder aquisitivo da população em países em desenvolvimento, que está mudando seus hábitos alimentares, substituindo cereais por carne bovina, suína e de frango. Isso resultou em uma maior demanda por soja, que compõe 70% da ração desses animais (ESCHER; WILKINSON, 2019). Além disso, o crescente interesse global em energia renovável e limpa levou ao aumento no uso de biocombustíveis feitos a partir da soja.

O sucesso brasileiro em produção e produtividade na cultura da soja é multifatorial e está relacionado a fatores além da área plantada, principalmente impulsionado por novas tecnologias pela aplicação de técnicas avançadas de manejo que aumentaram a produtividade. Avanços em tecnologias de manejo do solo, como a correção da acidez, adubação equilibrada e inoculação de sementes para fixação biológica de nitrogênio permitiram que a soja prosperasse em diferentes condições do território brasileiro. Além disso, a implementação do manejo integrado de pragas, com controle de insetos e o uso de fungicidas para doenças, foi crucial desde o início do cultivo por meio do tratamento de sementes (FREITAS, 2011).

Embora avanços importantes tenham sido alcançados, especialmente no

manejo de pragas e doenças na cultura da soja, muitos destes fatores ainda se caracterizam como fatores limitantes à produtividade. Especialmente as doenças foliares são fatores significativos por afetarem as folhas das plantas de soja e, se não forem controladas adequadamente, podem causar danos severos e reduzir a quantidade e qualidade da colheita. As principais doenças foliares da cultura da soja são Ferrugem Asiática (*Phakopsora pachyrhizi*), Septoriose (*Septoria glycines*), Podridão das Folhas (*Cercospora sojina*), Podridão Parda (*Phomopsis* spp.) e Mancha Alvo (*Corynespora cassiicola*)(HARTMAN *et al.*, 2015).

A mancha alvo possui destaque especial pela crescente incidência e impactos da doença. O aumento da incidência da mancha alvo na cultura da soja tem sido impulsionado pelo crescimento da semeadura de variedades suscetíveis, pela prática de culturas em sucessão que servem como hospedeiras do fungo, como o algodão e a crotalária, e pela reduzida sensibilidade ou resistência do fungo aos fungicidas (FRAC, 2024).

1.3 A MANCHA ALVO

O fungo *Corynespora cassiicola* pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, classe Dothideomycetes, subclasse Pleosporomycetidae, ordem Pleosporales, família Corynesporascaceae (AGRIOS, 2005). Inicialmente *C. cassiicola* foi classificado como *C. melonis* Cooke, *C. vignicola* Kawamura e *Hemintosporium vignae* etc. (COOKE, 1896; LINDAU, 1910). Etiologicamente, *Corynespora* foi descrita como coryne = massa clava e spora = esporo, ou seja, esporo clavado. WEI (1950) relata que a espécie *C. cassiicola* faz referência ao fungo isolado de planta do gênero *Cassia* sp. em 1869 por Charles Wright. O significado da terminação *iicola* faz referência a “viver ou se desenvolver” (ULLOA; HANLIN, 2000), de modo que a palavra *cassiicola* significa “viver em cássia”.

As colônias de *C. cassiicola* inicialmente apresentam um micélio cinza esbranquiçado que se torna cinza escuro com envelhecimento em meio de cultivo BDA (batata dextrose ágar) (LOPEZ *et al.*, 2018). A morfologia dos esporos pode variar com o substrato onde os esporos são coletados(MACKENZIE *et al.*, 2018). Os conidióforos podem emergir das lesões causadas nas plantas, são eretos ou levemente curvados, ramificados, de cor marrom, individualizados ou em grupos com células basais inchadas, apresentando 1–20 pseudoseptos, 4–11 µm de diâmetro e 44–135 µm de comprimento (ELLIS; SUBRAMANIAN, 1968; GODOY, 2015;

KOENNING *et al.*, 2006).

Os conídios são pigmentados, multi-septados (3-20 pseudoseptos) e podem variar na coloração, desde hialina a marrom-clara. Podem ocorrer individualizados ou em cadeias (2-6 conídios), sendo retos ou ligeiramente curvados no ápice, cilíndricos e com hilo central na extremidade basal (GODOY, 2015; KOENNING *et al.*, 2006). As estruturas apresentam 7–22 µm de diâmetro e 39–520 µm de comprimento com 2 a 28 pseudoseptos (KOENNING *et al.*, 2006).

Corynespora cassiicola é capaz de formar clamidósporos como estruturas de resistência que permitem o patógeno sobreviver em solos ou detritos de plantas em condições desfavoráveis ou na ausência de plantas hospedeiras (OLIVE; BAIN; LEFEBVRE, 1945; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Os clamidósporos são hialinos, com formato oval e dimensão entre 16 e 30 µm de comprimento por 14 a 20 µm de diâmetro, sendo formados em culturas mais velhas. A sobrevivência em restos de plantas é a fonte primária de inóculo do fitopatógeno para infecção no hospedeiro (ALMEIDA *et al.*, 2001).

Corynespora cassiicola é um fungo necrotrófico (LOPEZ *et al.*, 2018) capaz de destruir seu hospedeiro para utilizar seus nutrientes e pode sobreviver em detritos e sementes infectadas (ALMEIDA *et al.*, 2001). Neste sentido, por ser um parasita necrotrófico, *C. cassiicola* coloniza a planta hospedeira retirando seus nutrientes, ou seja, o fungo mata as células da planta hospedeira antes de invadi-la. Essa característica se dá pela capacidade do patógeno de produzir a toxina cassicolina que é liberada nas células, necrosando tecidos adjacentes ao local da infecção (DE LAMOTTE *et al.*, 2007). Dessa forma, o desenvolvimento e a invasão dos tecidos são sempre realizados de forma saprofítica, com retirada de nutrientes de células mortas.

Os isolados de *Corynespora* podem apresentar uma grande diversidade em relação à forma com que parasitam suas hospedeiras sendo, portanto, classificados como patogênicos quando isolados de material proveniente de tecido sintomático e saprofítico e endofítico quando de material em decomposição ou de tecido vivo assintomático, respectivamente (MESQUINI, 2013).

A disseminação de *C. cassiicola* ocorre de forma passiva pelo vento, água ou sementes. Favorecido pelo tempo seco, o vento realiza a remoção e transporte dos conídios para outras plantas ou lavouras, depositando os conídios na superfície de hospedeiras. Já a disseminação pela água ocorre através da chuva e respingos de água de sistemas de irrigação (ALMEIDA *et al.*, 2001; NETO, 2010). A transmissão

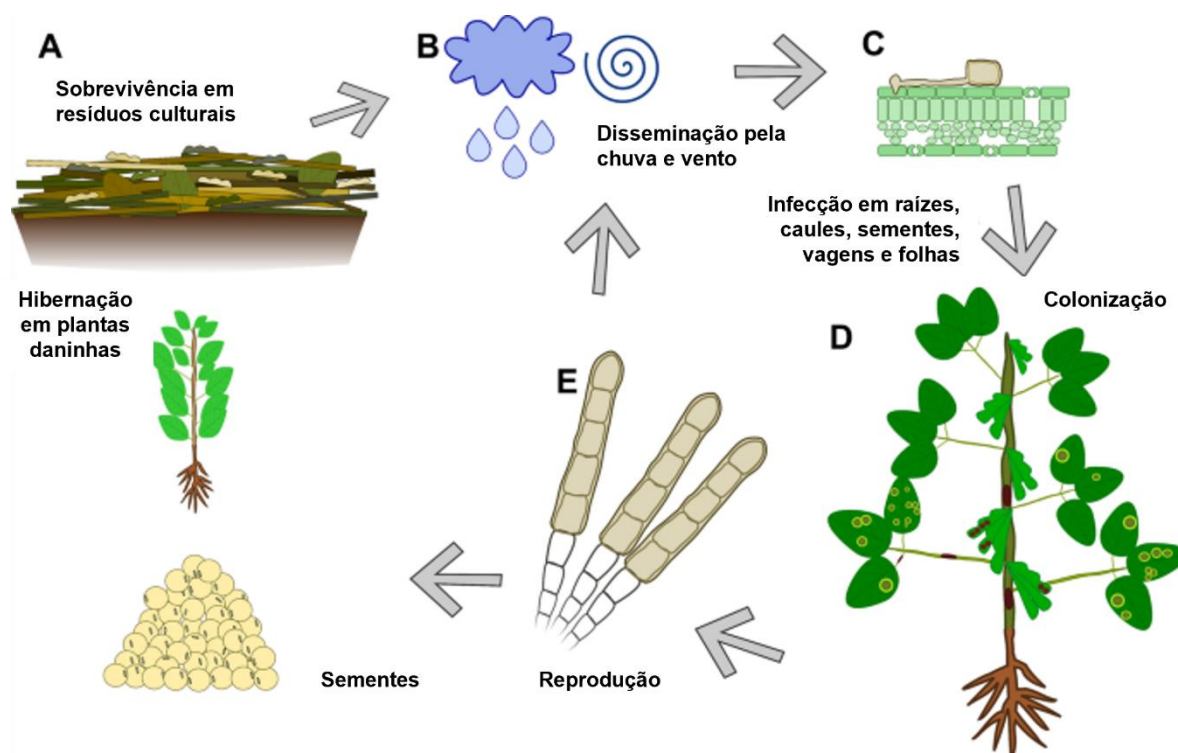
via sementes é responsável, principalmente, pela disseminação a longa distância de uma área para outra (MESQUINI, 2013).

Uma vez depositado na superfície da planta e na presença de água livre, os conídios fixam-se através de apressórios e emitem o tubo germinativo para iniciar a penetração que ocorre diretamente através da superfície da epiderme (MESQUINI, 2013). Dessa forma, a mancha-alvo caracteriza-se como uma doença policíclica com um curto ciclo de reprodução do patógeno, completando muitas gerações em uma safra (AGRIOS, 2005; MACKENZIE *et al.*, 2018).

A sobrevivência e permanência de estruturas do fungo são primordiais para seu ciclo epidemiológico. *Corynespora cassiicola* pode sobreviver em sementes de soja infectadas e permanecer no solo por até dois anos, atuando como fonte de inóculo para novas transmissões (Figura 4) (ALMEIDA *et al.*, 2001). A longevidade do inóculo de *C. cassiicola* pode variar dependendo do ambiente e da sobrevivência competitiva do fungo na ausência do hospedeiro (AMORIM; PASCHOLATI, 2011).

Em sementes de soja, o micélio do fungo pode se manter viável no embrião por um período de 6 a 7 meses, permanecendo inativo até o início do processo germinativo (AMORIM, 1995; AVOZANI; REIS; TONIN, 2014). A sobrevivência de *C. cassiicola* também pode ocorrer a partir de plantas voluntárias, sementes, restos culturais e em hospedeiros alternativos (KUROZAWA; PAVAN; REZENDE, 2005). O patógeno pode sobreviver em sementes (SINCLAIR; BACKMAN, 1989), em plantas daninhas como a trapoeraba (*Commelia benghalensis*) e assa peixe (*Vernonia polyanthes*) (CUTRIM; SILVA, 2003) e plantas alternativas de relevância econômica como: o feijoeiro e o tomateiro (MENDES, 1998), a acerola (SILVA; RODRIGUES; SOARES JÚNIOR, 1997), o algodão (FULMER *et al.*, 2012), a seringueira e mamoeiro (QI *et al.*, 2011), a alface (SANTOS *et al.*, 2007), o pimentão (SHIMOMOTO *et al.*, 2008), a abóbora, o maxixe e o quiabeiro (CUTRIM; SILVA, 2003).

Figura 4. Ciclo de vida da mancha-alvo (*Corynespora cassicola*). **(A)** Sobrevivência em resíduos culturais; **(B)** Disseminação pela chuva e vento; **(C)** Infecção em raízes, caules, sementes, vagens e folhas; **(D)** Colonização; **(E)** Reprodução.



Fonte: Retirado de EDWARDS MOLINA *et al.* (2022)

Corynespora cassicola pode ser encontrado em mais de 530 plantas hospedeiras de 380 gêneros (DIXON *et al.*, 2009) em mais de 80 países, sendo predominante em regiões tropicais, mas com relatos do fungo em regiões temperadas (AGUIAR, 2015; SILVA *et al.*, 1995). Existem relatos do fungo em culturas economicamente relevantes, incluindo soja (*Glycine max* L.), algodão (*Gossypium hirsutum* L.), feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), quiabo (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench), mamão (*Carica papaya* L.), melancia (*Citrullus vulgaris* Schrad), pimenta (*Capsicum frutescens* L.), seringueira (*Hevea brasiliensis* L.), gergelim (*Sesamun indicum* L.), mandioca (*Manihot* sp.), mamona (*Ricinis communis* L.) (QI *et al.*, 2011), além de eucalipto (*Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden) (REIS *et al.*, 2014) e café conilon (*Coffea canephora* cv. Conilon L.) (SOUZA *et al.*, 2009).

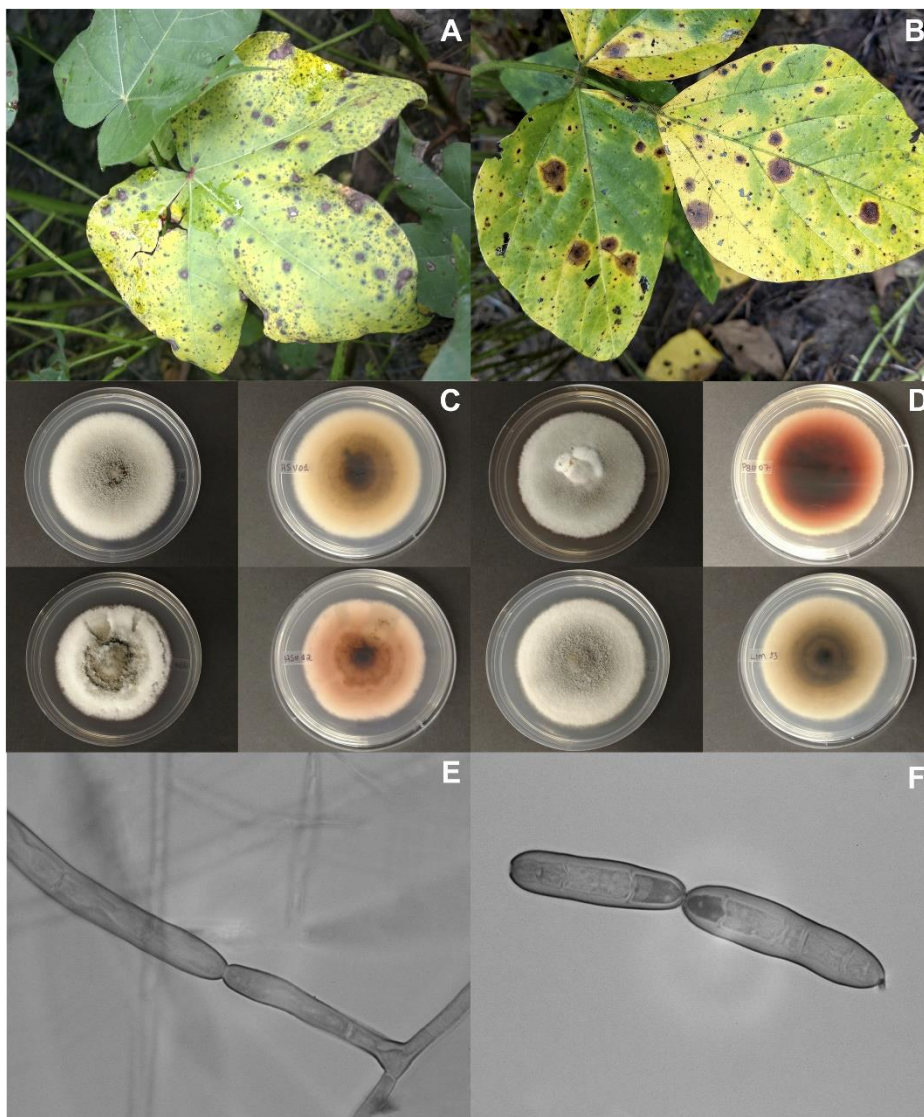
Diversos ensaios de inoculação cruzada com *C. cassicola* em diferentes espécies hospedeiras têm sido realizados por muitos autores, examinando a especificidade de hospedeiros em culturas de relevância econômica, incluindo a cultura da soja. Um resumo quantitativo de estudos de inoculações cruzadas de *C.*

cassiicola demonstrou que a maior compatibilidade com soja em maiores níveis (100% das infecções cruzadas) foi observada com algodão, beringela e gergelim e em menores níveis (de 40% a 60%) com feijão-de-corda, pepino, tomate e mamão (MOLINA, 2018). CARRIS e colaboradores (1986) realizaram o isolamento de *C. cassiicola* de cistos de *Heterodera glycines* e a inoculação do fungo por dispersão foliar na cultura da soja, observando a sintomatologia da doença e evidenciando que a inoculação cruzada pode ocorrer não somente em plantas hospedeiras alternativas.

O amplo espectro e preferência de hospedeiros de *C. cassiicola* é explicado com base na alta diversidade do patógeno e a variabilidade genética do fungo está correlacionada ao efetores patogênicos, patogenicidade à especificidade de hospedeiros e ao surgimento de hospedeiros resistentes (DÉON *et al.*, 2014). A cassiicolina, proteína glicosilada de 27 aminoácidos e importante efetor de fitotoxicidade de *C. cassiicola*, foi reportada como essencial para a patogenicidade do fungo em seringueira (DÉON *et al.*, 2012). Foram reportadas sete isoformas de cassiicolina (Cas1-Cas7) de diferentes isolados, diferentes hospedeiros e origem geográfica distintas (BARTHE *et al.*, 2007; DÉON *et al.*, 2014; LOPEZ *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2018a). DÉON e colaboradores (2014) identificaram que isolados portadores do gene Cas1 eram mais agressivos à seringueira, entretanto, existe a possibilidade de existir outros efetores fitopatogênicos além da cassiicolina.

A característica mais distintiva de *C. cassiicola* é a presença de lesões em forma de alvo, nas quais manchas maiores frequentemente exibem zonas bem definidas, com uma mancha mais escura no centro (GODOY, 2015), apresentando sintomas semelhantes em plantas de algodão e soja (Figura 5). Na soja, o patógeno pode infectar diversas partes da planta, incluindo hipocótilos, raízes, folhas, caules, vagens e sementes. Nas vagens, as lesões costumam ser circulares, deprimidas e com centro escuro e margens marrons. Em relação às raízes da soja, observam-se lesões de coloração marrom-avermelhada escura, que se tornam marrom-violeta escura quando o fungo esporula (GODOY, 2015).

Figura 5. Sintomas de mancha alvo em folhas de **(A)** algodão e **(B)** soja. Colônias puras em BDA (Batata Dextrose Ágar) de *C. cassiicola* isoladas de algodão **(C)** e soja **(D)**. Detalhes morfológicos de conidióforos **(E)** e conídios **(F)** de *C. cassiicola*.



Fonte: Retirado de RONDON; LAWRENCE (2019)

Já no algodão, o patógeno afeta todas as partes acima do solo. As lesões geralmente variam de pequenas manchas circulares a irregulares, desde pontos até manchas maduras com mais de 10 mm de diâmetro, e apresentam uma coloração marrom-avermelhada. Com frequência, os sintomas nas folhas vêm acompanhados por um halo de cor verde-escuro ou verde-amarelado, formando o característico "ponto-alvo" no centro. As veias das folhas, pecíolos e caules exibem lesões de cor marrom escura em diferentes formas e tamanhos (GALBIERI *et al.*, 2014; GODOY, 2015; KOENNING *et al.*, 2006). Em ambas as culturas, a desfolha prematura pode ocorrer em casos graves de infecção, especialmente em condições ideais. Essas

condições ideais para a infecção pelo patógeno e o desenvolvimento da doença são mais comuns na parte inferior da copa da planta, onde a umidade é maior e a proximidade com o inóculo primário do solo é maior (GALBIERI *et al.*, 2014).

A doença chamada "mancha alvo" foi inicialmente identificada afetando a soja (*Glycine max* (L.) Merr.) e o feijão-caupi (*Vigna sinensis* (L.) Endl.) pela primeira vez nos Estados Unidos em 1945, sendo inicialmente atribuída ao agente causal *Helminthosporium vignae* Olive (OLIVE *et al.*, 1945). No entanto, em 1950, o patógeno responsável por essa doença foi reclassificado como *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) C.T. Wei (WEI, 1950). Em 1976, casos de mancha alvo em soja foram relatados no Brasil no Estado de São Paulo (ALMEIDA *et al.*, 1976). Na cultura do algodão (*Gossypium hirsutum* L.), a presença da doença foi inicialmente reportada em Alabama em 1959 (JONES, 1961). Em 2005, uma doença semelhante foi relatada em algodão no Brasil, mas foi referida como mancha de folha de *Corynespora* (MEHTA *et al.*, 2005). Embora a mancha alvo tenha sido documentada como uma doença da soja no Brasil desde a década de 1970, inicialmente foi percebida como tendo pouca importância após seu primeiro registro em 1976. No entanto, sua importância aumentou entre 2010 e 2020 devido à adoção de cultivares vulneráveis e à redução da responsividade do patógeno a alguns dos ingredientes ativos primários em fungicidas atualmente disponíveis (RONDON; LAWRENCE, 2021).

Nos últimos anos, temos observado perdas significativas na cultura da soja devido à mancha alvo. Esse problema tem se intensificado e preocupado agricultores e especialistas principalmente devido ao aumento de sua prevalência, especialmente na cultura da soja (GODOY, 2015) e do algodão (SUMABAT *et al.*, 2018). Esse aumento pode ser atribuído a fatores como o cultivo em monocultura, o aumento da semeadura de cultivares susceptíveis, utilização de culturas em sucessão que são hospedeiras do fungo, como o algodão, a adoção de métodos de cultivo conservacionistas, a vulnerabilidade das cultivares atuais, a ausência de rotação de culturas e condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento da doença (AVOZANI *et al.*, 2014; KOENNING *et al.*, 2006; FRAC, 2023).

Além disso, a alta diversidade genética de *C. cassiicola* confere ao patógeno uma capacidade aprimorada de se adaptar a diferentes ambientes e infectar uma ampla gama de plantas, aumentando mais ainda a dificuldade para o seu controle efetivo (DÉON *et al.*, 2014; DUAN *et al.*, 2019; TERAMOTO *et al.*, 2017), sendo um patógeno classificado com alto risco ao desenvolvimento de resistência à fungicidas

(FRAC, 2024).

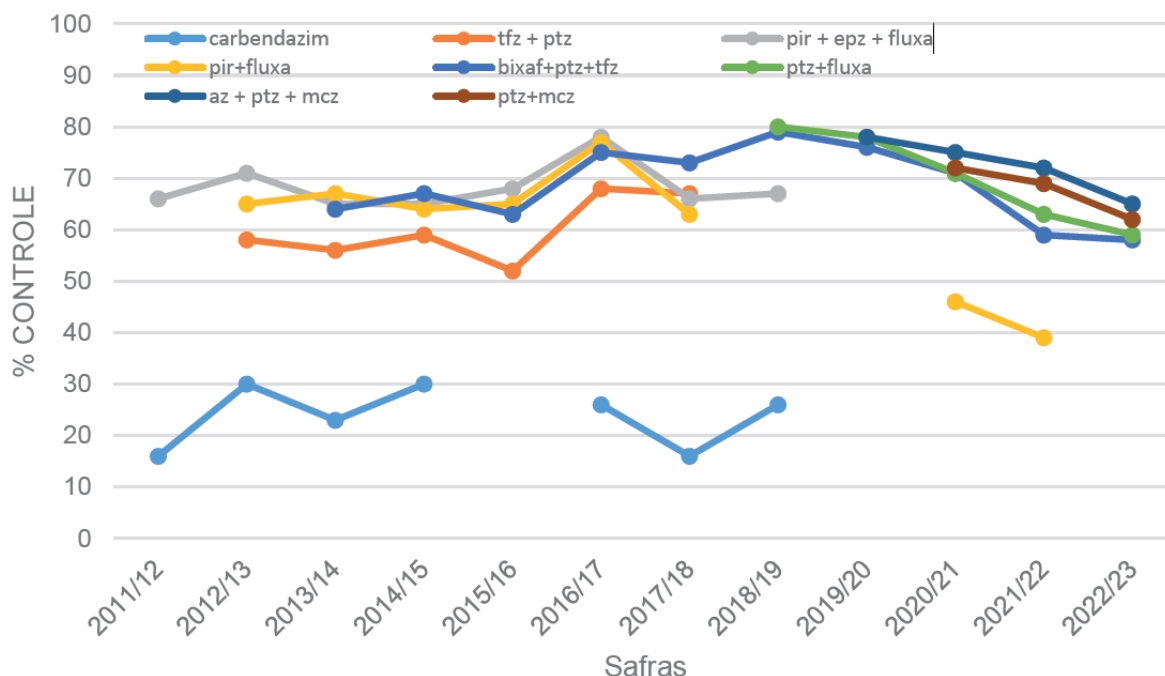
Atualmente, a mancha alvo é considerada uma doença substancial, notadamente responsável por perdas de rendimento, especialmente quando cultivares suscetíveis são usadas. Em 2006, uma epidemia significativa de mancha alvo foi documentada, com estimativas de redução de rendimento variando de 10% a 20% (SILVA; CAMPOS; SILVA, 2008). Uma meta-análise baseada em dados de ensaios de campo com fungicidas realizados em todo o Brasil estimou perdas potenciais de rendimento em cerca de 24%. No entanto, essas perdas foram significativamente influenciadas pela cultivar selecionada. Por exemplo, cultivares como BMX Potência RR mostraram alta tolerância à doença, com perdas potenciais máximas de rendimento de 8%. Por outro lado, as perdas potenciais de rendimento para cultivares suscetíveis, como M9144RR, foram estimadas em 42% (EDWARDS MOLINA *et al.*, 2019a).

O controle químico é, atualmente, uma das ferramentas integradas para o controle da mancha-alvo. Os fungicidas químicos atualmente utilizados pertencem aos grupos dos inibidores da desmetilação (IDM) como o protriocanazol e tebuconazol, inibidores da quinona externa (IQe) como a trifloxistrobina, picoxistrobina e azoxistrobina, inibidores da succinato desidrogenase (ISDH) como o fluxapiroxade e bixafen, além de isoftalonitrila (clorotalonil) e ditiocarbamato (mancozebe). Desde a safra 2011/2012, a Embrapa tem conduzido experimentos em rede e consolidado dados para comparar a eficácia de fungicidas químicos já registrados e em processo de registro no controle da mancha-alvo na cultura da soja (GODOY *et al.*, 2023).

Os resultados dos ensaios em rede para controle da mancha-alvo realizados desde 2011/2012 mostram redução de eficiência de alguns produtos em razão da menor sensibilidade do fungo *C. cassiicola* aos fungicidas (Figura 6) (GODOY *et al.*, 2023). Para carbendazim, menor eficiência foi observada de 2011 até 2019, quando o fungicida foi retirado dos ensaios. Essa menor eficiência foi associada à presença das mutações E198A e F200Y na β -tubulina do fungo (MELLO *et al.*, 2022). A diminuição da sensibilidade de *C. cassiicola* a diferentes grupos de fungicidas destaca a importância do monitoramento para avaliar a sensibilidade do fungo em diversas regiões. A implementação de estratégias anti-resistência, como a limitação das aplicações de ISDH a um máximo de duas aplicações por ciclo da cultura da soja, a combinação com fungicidas multissítios e a alternância de modos de ação, pode retardar a seleção de populações resistentes, estendendo assim a eficácia dos

fungicidas.

Figura 6. Média da porcentagem de controle da mancha-alvo com fungicidas químicos em ensaios cooperativos de 2011 a 2022



Fonte: Retirado de GODOY *et al* (2023)

As estratégias de manejo de fungicidas devem ser incorporadas no manejo da doença, juntamente com a utilização de cultivares resistentes/tolerantes, o tratamento de sementes e a rotação/sucessão de culturas com milho e/ou outras espécies de gramíneas. Além dessas alternativas de manejo, uma tecnologia mais ambientalmente factível é a utilização de agentes de controle biológico, principalmente na figura dos fungicidas microbiológicos. Atualmente no Brasil existem 5 tecnologias biológicas registradas para controle fitossanitário da mancha alvo, conforme tabela 1(AGROFIT, 2024).

Tabela 1. Defensivos biológicos registrados para controle de *C. cassicola*

Produtos comerciais	Ingredientes ativos
AgTecmmon; Restrict; Zigurat; Vitanica Duo Protect; BioDoble; TWIXX-A; Bio Braza; Amosbio Goplan;	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , cepa CPQBA 040-11DRM 01 (Produto Microbiológico) (947 g/L) + <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , cepa CPQBA 040-11DRM 04 (Produto Microbiológico) (947 g/L)
BTP 005-10; Bombardeiro; Lastro;	<i>Bacillus pumilus</i> , isolado CNPSo 3203 (Produto Microbiológico) (33,3 g/L) + <i>Bacillus subtilis</i> , isolado CNPSo2720 (Produto Microbiológico) (33,3 g/L) + <i>Bacillus velezensis</i> , isolado CNPSo 3602 (Produto Microbiológico) (33,3 g/L)
Caravan; BTP 005-19	<i>Bacillus pumilus</i> , isolado CNPSo 3203 (150 g/L)
Provilar	<i>Bacillus subtilis</i> (Produto Microbiológico) (30 g/L) + <i>Bacillus velezensis</i> (Produto Microbiológico) (90 g/L)
Bio-imune; Multi-Attack; Multi-Guard; FungiOuro; Biologic Aerum;	<i>Bacillus subtilis</i> (Produto Microbiológico) (42 g/L)

Fonte: Elaborado pelo autor, dados de AGROFIT (2024)

A utilização de agentes de controle biológico, popularmente denominados e agrupados na categoria de “bioinsumos”, além de uma alternativa de menor impacto ambiental, também vem apresentando eficiência e um papel imprescindível no manejo integrado de pragas e doenças, especialmente quando se trata de agentes microbiológicos de controle. A utilização de bioinsumos representa uma vantagem significativa na agricultura moderna pois pode reduzir a dependência de produtos químicos sintéticos e minimizar os impactos ambientais adversos. Tecnologias dessa categoria melhoram a qualidade do solo, aumentam a resistência das plantas a doenças e estresses ambientais e, em muitos casos, resultam em maiores rendimentos e produtividade agrícola, contribuindo assim para uma agricultura mais sustentável e economicamente viável (KUMAR *et al.*, 2021; MEYER *et al.*, 2022; SAMADA; TAMBUNAN, 2020).

1.4 ACTINOBACTÉRIAS E SEU POTENCIAL DE APLICAÇÃO AGRÍCOLA

As actinobactérias ou actinomicetos constituem um grupo altamente diversificado de microrganismos amplamente reconhecidos por sua importância nos campos da biologia e da biotecnologia. Pertencentes ao filo Actinobacteria, elas se destacam por sua habilidade notável em sintetizar uma ampla variedade de compostos bioativos, abrangendo desde antibióticos até enzimas industriais, pigmentos e metabólitos secundários de significativo interesse na indústria

farmacêutica (BARKA *et al.*, 2016). Além disso, as actinobactérias desempenham um papel fundamental na degradação de matéria orgânica no solo, contribuindo significativamente para a reciclagem de nutrientes e a manutenção da saúde dos ecossistemas (MITRA *et al.*, 2022) .

O filo das actinobactérias é constituído por bactérias filamentosas Gram-positivas quimiorganotróficas que crescem tipicamente em pH neutro, mas podem também se proliferar em condições alcalófilas ou acidófilas e possui genoma enriquecido em conteúdo G+C. Algumas das actinobactérias são autotróficas, mas a maioria são heterotróficas, sendo extensamente estudadas devido à sua capacidade de produzir uma ampla variedade de metabólitos secundários, incluindo antibióticos, enzimas e pigmentos de interesse biotecnológico(BARKA *et al.*, 2016; SEGARAN *et al.*, 2017). São microrganismos capazes de habitar tanto ambientes terrestres quanto em ambientes aquáticos marinhos e de água doce (VAN BERGEIJK *et al.*, 2020).

Esse grupo de bactérias pode apresentar morfologia variando de cocos e bastonetes a estruturas multicelulares complexas, semelhantes ao micélio de fungos filamentosos que podem ser aéreas ou aderidas ao substrato(CIMMINO *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2022; WU *et al.*, 2020). Essa característica, juntamente com o fato de que alguns indivíduos produzem esporos como forma de reprodução assexuada, já levou esses microrganismos a serem considerados microrganismos de transição entre bactérias e fungos. No entanto, os perfis genéticos e celulares dos Actinomicetos (Actinobactérias) são característicos de atributos bacterianos, como um cromossomo envolto em um nucleóide procariótico e uma parede celular composta por peptidoglicanos (BARKA *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2022; VAN BERGEIJK *et al.*, 2020).

Graças as suas características metabólicas únicas, como a formação de esporos resistentes, esses microrganismos têm a capacidade de se adaptar a uma ampla gama de condições ambientais, tornando-os sujeitos de estudo de grande relevância nas áreas da ecologia, microbiologia, biotecnologia e, especialmente, na agricultura(BOUBEKRI *et al.*, 2022; GOHAIN *et al.*, 2020; JOSE; MAHARSHI; JHA, 2021; VAN BERGEIJK *et al.*, 2020). Estima-se que 64% de todos os antibióticos produzidos naturalmente são derivados de espécies de actinomicetos (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019).

O número de artigos publicados relacionados às actinobactérias aumentou consideravelmente desde o início da última década, especialmente aqueles focados em espécies capazes de promover o crescimento das plantas e o biocontrole (SILVA

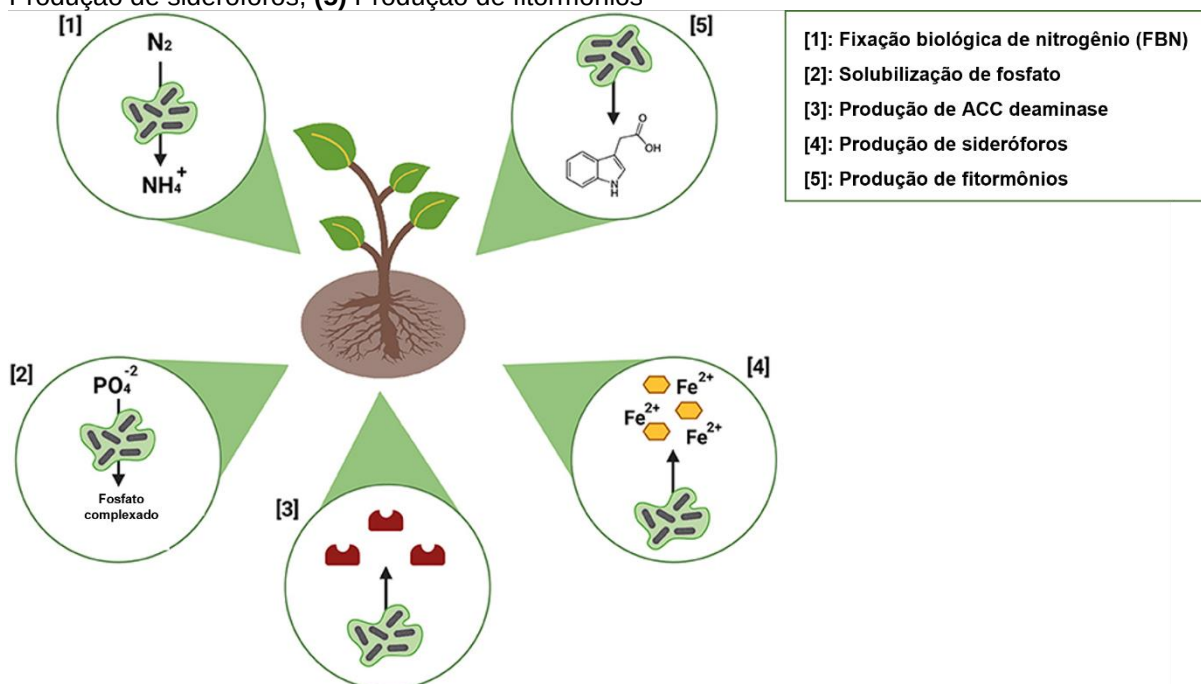
et al., 2022). Algumas espécies de actinobactérias podem produzir enzimas ou marcadores de interesse como quitinases, celulasas e amilases (SALWAN; SHARMA, 2018), e enzimas envolvidas na promoção do crescimento das plantas, como fosfatases e nitrogenases (SINGH *et al.*, 2018). Além disso, os actinomicetos também produzem compostos orgânicos voláteis (VOCs), desempenhando um papel significativo em sua bioatividade, atuando como agentes antimicrobianos e até induzindo alterações na expressão gênica de microrganismos próximos (PACIOS-MICHELENA *et al.*, 2021).

Os actinomicetos são amplamente encontrados no solo, constituindo mais de 30% da população microbiana, com densidades que variam de 10^6 a 10^9 bactérias por grama de solo (BARKA *et al.*, 2016; YADAV *et al.*, 2018; YENG; PAHIRULZAMAN, 2021). Para prosperar nesse ambiente, eles desenvolveram mecanismos complexos envolvendo a produção de enzimas capazes de degradar matéria orgânica, decompondo componentes do solo, como celulose, lignina e quitina. Essas enzimas, por sua vez, liberam nutrientes que se tornam acessíveis às plantas e outros organismos do solo, contribuindo assim para o ciclo de nutrientes no ecossistema (BHATTI; HAQ; BHAT, 2017; SALWAN; SHARMA, 2018). Além disso, demonstram uma notável capacidade de colonizar a rizosfera, a região ao redor das raízes das plantas, que é enriquecida com nutrientes liberados pelas raízes, incluindo aminoácidos, ácidos graxos, ácidos orgânicos, fenóis, esteróis, açúcares e vitaminas (YADAV *et al.*, 2018). Esse ambiente rico em nutrientes favorece uma concentração mais elevada de actinomicetos em comparação com o solo circundante (HASSAN; MCINROY; KLOEPPER, 2019).

Em um contexto geral, bactérias promotoras de crescimento em plantas são bactérias (ou rizobactérias, quando capazes de colonizar a rizosfera) que podem melhorar o crescimento das plantas por meio de uma vasta variedade de mecanismos e sob um amplo espectro de condições adversas, como estresse biótico e abiótico. Alguns destes mecanismos podem ser a produção de fitormônios, produção de 1-Aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase, indução de resistência sistêmica (IRS), solubilização de fosfato, produção de sideróforos, fixação biológica de nitrogênio (FBN), interferência no sinal de *quorum sensing* (QS) e inibição da formação de biofilme, exibindo atividade antifúngica, produção de compostos orgânicos voláteis (VOCs), promoção de simbioses benéficas entre plantas e micróbios ou interferência na produção de toxinas por patógenos (BASU *et al.*, 2021;

BHATTACHARYYA; JHA, 2012; HA-TRAN *et al.*, 2021; OLANREWAJU; GLICK; BABALOLA, 2017). Nesse sentido, as actinobactérias apresentam características supracitadas que as tornam promissoras bioinoculantes para aplicação agrícola, fato que vem se confirmando com o número de relatos científicos de suas aplicações (BOUKHATEM; MERABET; TSAKI, 2022; HAYAT *et al.*, 2021; JAVED *et al.*, 2021a; NARSING RAO *et al.*, 2022; SILVA *et al.*, 2022).

Figura 7. Principais mecanismos de promoção de crescimento vegetal por microrganismos. (1) Fixação biológica de nitrogênio (FBN), (2) Solubilização de fosfato, (3) Produção de ACC deaminase, (4) Produção de sideróforos, (5) Produção de fitormônios



Fonte: Adaptado de SILVA *et al.* (2022)

A capacidade de produção de fitormônios que estimulam o crescimento vegetal ou precursores desses é recorrentemente relatado em espécies de actinomicetos promotores de crescimento vegetal. Usualmente, alguns desses compostos sintetizados por actinomicetos podem ser substâncias indólicas pertencentes à classe das auxinas, com o ácido indol-3-acético (AIA) sendo o mais comumente reportado (SOUZA; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2015), particularmente em espécies rizosféricas e endofíticas do gênero *Streptomyces* (KHAMNA; YOKOTA; LUMYONG, 2009; LIN; XU, 2013; VERMA; SINGH; PRAKASH, 2011). Além do gênero *Streptomyces*, outros gêneros de actinomicetos são capazes de produzir AIA com espécies pertencentes aos gêneros *Microbispora*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Nocardiopsis*, *Spirillospora*, *Streptomyces* (SHUTSRIRUNG *et al.*, 2013). Actinobactérias que produzem AIA geralmente estimulam um aumento mais notável

no crescimento das raízes das plantas que estão associadas a elas, o que resulta em um maior acesso aos nutrientes do solo e melhora o comportamento de desenvolvimento das plantas (ALORI; BABALOLA, 2018).

Giberelina e citocininas também são classes de fitormônios que podem promover o crescimento vegetal (SWARNALAKSHMI *et al.*, 2020). A produção de ácido giberélico por três diferentes gêneros de actinomicetos (*Frankia*, *Streptomyces*, *Actinoplanes*) foi reportado por SOLANS *et al* (2011) e já também reportado em outras bactérias do gênero *Streptomyces* (ALDESUQUY; MANSOUR; ABO-HAMED, 1998; EL - TARABILY *et al.*, 2009). As citocininas desempenham um papel fundamental no desenvolvimento das plantas, influenciando a germinação das sementes, a senescência das plantas, a fotossíntese e a respiração (SIDDIQUI, 2006). Embora sejam escassos os estudos que relacionam actinomicetos à capacidade de produzir citocininas, já foi comprovado que os gêneros *Actinoplanes*, *Frankia*, *Micromonospora* e *Streptomyces* têm a capacidade de sintetizar zeatina, uma das citocininas mais conhecidas (SOLANS *et al.*, 2011). Além de giberelina e citocininas, essas bactérias são capazes de produzir ACC deaminase (DEL CARMEN OROZCO-MOSQUEDA; GLICK; SANTOYO, 2020; NAING; MAUNG; KIM, 2021), uma importante enzima envolvida na síntese de etileno, um fitormônio envolvido na regulação do desenvolvimento das plantas, desempenhando um papel crucial na manutenção de um crescimento saudável em níveis de concentração baixos (aproximadamente 0,05 µL/L) (GLICK, 2005).

As actinobactérias podem também atuar na promoção de crescimento de plantas por meio de mecanismos de disponibilização de nutrientes (BHATTI; HAQ; BHAT, 2017). Um desses processos pode ser a fixação biológica de nitrogênio (FBN), um processo biológico para conversão de nitrogênio atmosférico em NH_4^+ , tornando o nutriente disponível para biossíntese em células vegetais (BELLENGER *et al.*, 2020; SOUMARE *et al.*, 2020). Os actinomicetos diazotróficos podem ser encontrados em associação simbiótica com plantas actinorrízicas ou como bactérias fixadoras de N_2 de vida livre (BENSON; SILVESTER, 1993). Entretanto, um pequeno número de espécies foi reportado como fixadoras, de modo que, por muito tempo, o gênero *Frankia* foi considerado o único grupo representante entre os actinomicetos. No entanto, algumas pesquisas nas últimas décadas relataram espécies diazotróficas pertencentes aos gêneros *Agromyces*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Micromonospora* e *Streptomyces* (GTARI *et al.*, 2012).

O fósforo é um elemento essencial para o crescimento saudável das plantas, influenciando várias funções celulares e na herança genética, entretanto, as formas de fósforo no solo não são facilmente absorvidas pelas plantas. Algumas bactérias associadas às plantas podem tornar essas formas de fósforo acessíveis por meio da produção de ácidos de baixo peso molecular (NOVO *et al.*, 2018). A solubilização de fosfato é uma característica encontrada em alguns gêneros de actinomicetos, como *Agromyces*, *Angustibacter*, *Isoptericola*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Streptomyces* e *Thermobifida* (DASTAGER; DAMARE, 2013; SAIF *et al.*, 2014). Estudos *in planta* reportaram o efeito da co-inoculação de *Micromonospora aurantiaca* e *S. griseus* em sementes de trigo cultivada em solo deficiente em fontes solúveis de fósforo e demonstraram um incremento do crescimento vegetal associado a um teor mais elevado de nitrogênio e fósforo nos tecidos da planta (HAMDALI *et al.*, 2008). Adicionalmente, El-Tarabily *et al* (2008) demonstraram que a inoculação em sementes de feijão de uma linhagem de *M. endolithica* aumentou significativamente o crescimento das partes aéreas e das raízes quando comparado aos controles, quando a cultura foi cultivada em solo com fosfato supersimples.

Sideróforos são moléculas de baixo peso molecular produzidas por microrganismos que podem quelar íons Fe^{3+} presentes no ambiente (FERREIRA; SILVA; CUNHA, 2019; LOBO *et al.*, 2019). Microrganismos que produzem sideróforos têm vantagens competitivas em ambientes onde há baixa ocorrência de ferro. Nessas condições, a capacidade de capturar íons Fe^{3+} prioriza a sobrevivência dessas espécies em relação a outros componentes da microbiota local, incluindo microrganismos fitopatogênicos, que podem sofrer perdas e causar menos danos (GU *et al.*, 2020). Várias espécies de actinomicetos já foram reportadas como capazes de sintetizar compostos sideróforos como, por exemplo, catecol (LEE *et al.*, 2012), desferrioxamina (WANG *et al.*, 2014a) e nocardiquelinas (SCHNEIDER *et al.*, 2007).

Um estudo *in planta* conduzido por RUNGIN *et al.* (2012) demonstrou que tratamentos inoculando sementes de arroz e feijão com linhagens de *Streptomyces* sp. GMKU 3100 endofíticas selvagens apresentaram um maior desenvolvimento vegetal quando comparadas à tratamentos inoculados com mutantes com o gene tipo-desD inativado. Este gene é responsável por codificar uma enzima de controle envolvida na etapa final da biossíntese de sideróforos. Resultados similares foram encontrados por VERMA *et al.* (2011) ao demonstrar a capacidade da cepa endofítica *Streptomyces* sp. AzR-051 de produzir sideróforos aumentar significativamente o

crescimento de plantas e antagonizar o fitopatógeno *Alternaria alternata* quando inoculada em sementes de tomate.

Apesar dos constantes e crescentes avanços tecnológicos, a agricultura contemporânea enfrenta desafios contínuos causados por pragas e doenças incluindo fitonematóides, insetos, fungos, bactérias e vírus que atacam culturas, comprometendo a sanidade e produtividade agrícola (ALPHEY; BONSALL, 2018; MASHELA *et al.*, 2017; RISTAINO *et al.*, 2021; SAWICKA; EGBUNA, 2020). Diante desse cenário, a aplicação de defensivos agroquímicos é amplamente utilizada para controle da sanidade fitossanitária das culturas agrícolas, consequentemente agregando impactos ambientais no solo, na biodiversidade e comprometendo a saúde alimentar (MEENA *et al.*, 2020). O uso de agentes biológicos ou substâncias naturalmente derivadas apresenta-se como uma alternativa para o controle de pragas e doenças, substituindo ou complementando os agroquímicos tradicionais e, dessa forma, minimizando o impacto ambiental e promovendo o desenvolvimento de estratégias de manejo que sejam eficazes e ecologicamente sustentáveis (SAMADA; TAMBUNAN, 2020). Nesse sentido, agentes de controle biológico baseados em microrganismos já são uma realidade tecnológica em expansão com alto potencial de uso de actinomicetos sendo reportado (EBRAHIMI-ZARANDI; SABERI RISEH; TARKKA, 2022; SILVA *et al.*, 2022).

Diversos mecanismos de controle biológico são reportados na literatura, podendo ser diretos por meio de antibiose, hiperparasitismo ou competição por nutrientes ou indiretos, pela indução de uma resposta de resistência na planta, por exemplo (STENBERG *et al.*, 2021a). A forma mais comum de biocontrole por mecanismos diretos reportada em actinomicetos é a antibiose, onde o crescimento de um patógeno é impedido por metabólitos tóxicos produzidos pela entidade antagônica (ARSENEAULT; FILION, 2017; MARAMOROSCH; LOEBENSTEIN, 2009). Tais metabólitos geralmente são antibióticos produzidos pelas bactérias como mecanismos de defesa através de estruturas químicas capazes de inibir processos vitais em células microbianas (ULLOA-OGAZ; MUÑOZ-CASTELLANOS; NEVÁREZ-MOORILLÓN, 2015). Essa é uma característica marcante no gênero *Streptomyces*, um gênero de actinomicetos reconhecido por produzir aproximadamente 75% de todas as moléculas antibióticas utilizadas comercialmente (CLARDY; FISCHBACH; WALSH, 2006; DONALD *et al.*, 2022).

Os patógenos fúngicos de plantas representam uma ameaça significativa para

a agricultura global, impactando o rendimento das colheitas e a segurança alimentar, infectando plantas e solo com alta capacidade de adaptação sob pressão de seleção e adquirindo resistência a pesticidas químicos (ALMEIDA; RODRIGUES; COELHO, 2019; FISHER *et al.*, 2020; JUROSZEK; VON TIEDEMANN, 2013; PRICE *et al.*, 2015). Espécies de actinobactérias, especialmente do gênero *Streptomyces*, têm sido reportadas como poderosas agentes de controle biológico de fungos fitopatogênicos, agentes causais de diversas doenças de relevância agrônoma (LEBLANC, 2022). Diversos estudos têm reportado a aplicação de bactérias do gênero *Streptomyces* para o controle de *Botrytis cinerea* (LIAN *et al.*, 2017), *Colletotrichum gloesporioides* (PALANIYANDI *et al.*, 2011), *Fusarium oxysporum* (TAECHOWISAN; PEBERDY; LUMYONG, 2003), *Fusarium moniliforme* (KAUR; RANI; MANHAS, 2019), *Fusarium solani*, *Fusarium verticillioides*, *Alternaria alternata* (AL-ASKAR; KHAIR, 2011), *Ceratocystis fimbriata* (GONG *et al.*, 2022), *Magnaporthe oryzae* (LIU *et al.*, 2022), *Rhizoctonia solanacearum* (KAARI *et al.*, 2022), entre outros. É importante salientar que perdas associadas a bactérias fitopatogênicas geralmente estão ligadas a culturas de menor impacto econômico (MARTINS *et al.*, 2018) e essa circunstância pode explicar a falta de produtos à base de actinomicetos para o controle de bactérias fitopatogênicas, usualmente associados à aplicação no controle de doenças pós-colheita de frutas e vegetais (ABDALLAH *et al.*, 2013).

As doenças fúngicas na cultura da soja são uma preocupação significativa na agricultura, pois podem causar perdas significativas na produção (BANDARA *et al.*, 2020). Desta forma, através da busca constante por agentes de controle biológico que possam complementar o manejo destas doenças, o gênero *Streptomyces* vem sendo reportado como alternativa de controle para os principais fitopatógenos da cultura da soja. O uso de bactérias do gênero *Streptomyces* foi reportado para o controle da antracnose da soja (*Colletotrichum truncatum*) (HONG-THAO *et al.*, 2016), podridão radicular (*Phytophthora sojae*) (ARFAOUI *et al.*, 2020), ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) (PAULA, 2019), podridão radicular (*Rhizoctonia solani*) (AL-ASKAR; KHAIR, 2011), podridão de carvão (*Macrophomina phaseolina*) (SHRIVASTAVA; KUMAR; YANDIGERI, 2017), mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) (GEBILY *et al.*, 2021) e também para a mancha alva (*Corynespora cassiicola*) (DEVI; RAO, 2017).

O desempenho *in vitro* dos actinomicetos contra fitopatógenos fúngicos e pragas agrícolas muitas vezes demonstra efeitos inibidores positivos, indicando seu

potencial uso em biopesticidas para a defesa de plantas. Entretanto, a correlação entre o comportamento *in vitro* e o efeito antagônico *in vivo* não é direta, de modo que cepas bacterianas com baixa atividade *in vitro* podem ainda apresentar resultados eficazes de inibição quando aplicadas *in planta* (BESSET-MANZONI *et al.*, 2019). Essas discrepâncias podem ser atribuídas a pressões adicionais, como competição, interações com a microbiota do solo/foliar, mudanças climáticas e desafios na colonização adequada da rizosfera ou dos tecidos vegetais (BESSET-MANZONI *et al.*, 2019; COMBY *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2022). Contudo, embora haja esse desafio de triagem, já é notável o número de produtos para controle biológico baseado em actinobactérias e/ou seus metabólitos (SILVA *et al.*, 2022).

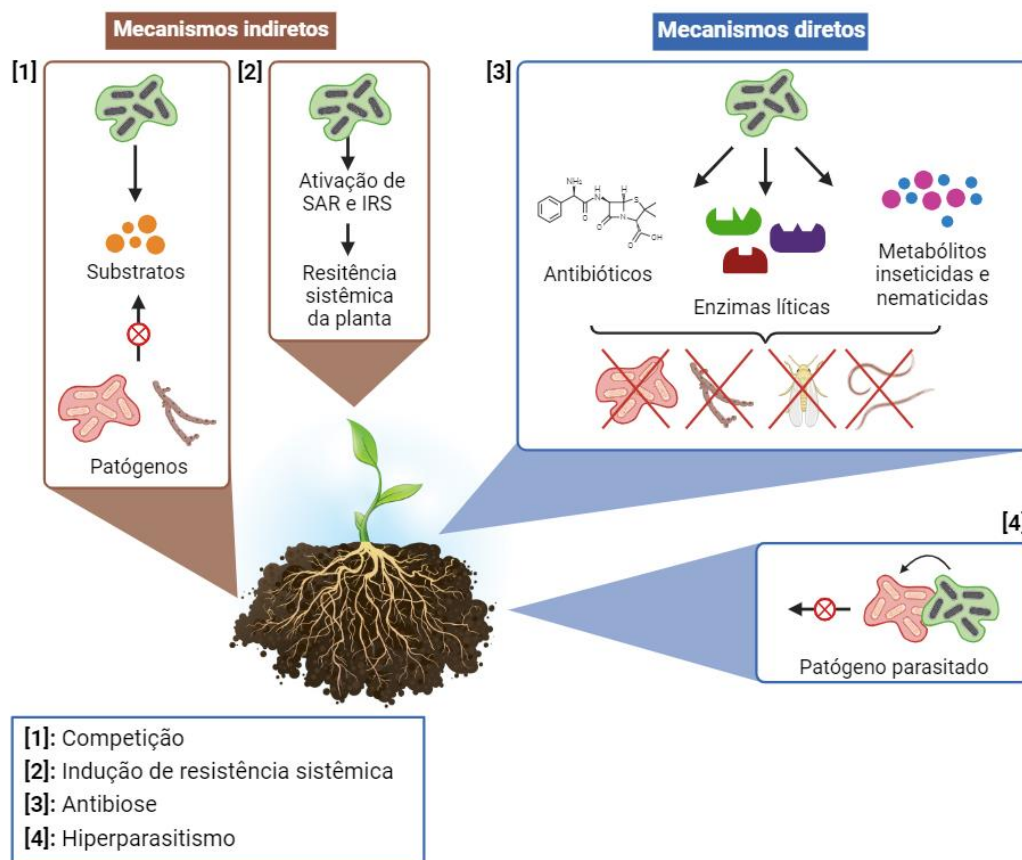
Insetos-pragas agrícolas também são protagonistas em um cenário de risco de danos e perdas econômicas relevantes da agricultura e, ainda que grandes avanços tenham sido obtidos por meio da rotação de culturas, desenvolvimento de cultivos resistentes e manejo integrado de pragas, os insetos são geralmente controlados por inseticidas químicos (DEGUINE *et al.*, 2021; SHARMA; KOONER; ARORA, 2017). Nesse sentido, as actinobactérias, devido ao seu amplo arsenal metabólico, também figuram como um grupo de alto potencial biotecnológico para o desenvolvimento de bioinseticidas que possam mitigar o dano ecológico e a resistência a inseticidas químicos. Diversos metabólitos já são comercialmente utilizados como, por exemplo, a avermectina obtida de subprodutos fermentativos de *Streptomyces avermitilis*, amplamente utilizada para o controle de espécies das ordens Blattodea, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Isoptera, Lepidoptera, entre outras (LI *et al.*, 2021). Outro exemplo importante são as espinosinas, produzidas por *Saccharopolyspora spinosa*, especialmente espinosinas A e D, utilizadas para o controle de pragas como *Heliothis virescens* e *Spodoptera eridania* (KIM *et al.*, 2010; SALGADO, 1998).

Os nematoides fitoparasitas (NFPs) são naturalmente ocorrentes e podem causar danos significativos, resultando em perdas de rendimento em várias culturas agrícolas, podendo alcançar perdas anuais globais variando entre 12% e 25% da produção total, totalizando mais de USD 80 bilhões (KUMAR; KHAN; WALIA, 2020; REDDY, 2021; SINGH, 2022). Além disso, esses parasitas também foram encontrados em associação com patógenos bacterianos e fúngicos, utilizando as vias de penetração dos nematoides nas plantas para reforçar os sintomas de doenças (MAQSOOD; KHALIQ, 2022). O manejo de nematoides fitoparasitas não é simples,

entretanto, diversos estudos apontam o potencial do uso de actinobactérias para o controle de nematóide dos cistos (*Heterodera* spp.) (BURNS, 2017; PENG *et al.*, 2017) e nematoide das lesões (*Pratylenchus* spp.) (SAMAC; KINKEL, 2001). Ainda, existem muitos trabalhos, além de produtos comerciais, reportando a eficiência de actinobactérias para o controle do nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.) (BURNS, 2017; D'ERRICO *et al.*, 2017; RASHAD *et al.*, 2015; RUANPANUN *et al.*, 2011; SHARMA *et al.*, 2019; ZENG *et al.*, 2013) .

Os agentes de controle biológico (ACB) atuam com uma combinação de mecanismos diretos e indiretos para biocontrole, conforme ilustrado na figura 8. A estratégia indireta envolve fortalecer a fortalecer a resistência da planta por meio da resistência sistêmica adquirida (SAR) e resistência sistêmica induzida (ISR), além de competir por nutrientes e espaço para prevenir a colonização de patógenos (BENEDUZI; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2012; JAMALIZADEH *et al.*, 2011; KÖHL; KOLNAAR; RAVENSBERG, 2019; KURTH *et al.*, 2014; ZHAO; DU; TIAN, 2012). Entre as actinobactérias, o biocontrole direto é frequentemente alcançado por meio da antibiose que é o mecanismo mais comum de controle deste grupo de microrganismos, onde a produção de metabólitos tóxicos, frequentemente antibióticos, inibe o crescimento de patógenos e pragas (ARSENEAULT; FILION, 2017; MARAMOROSCH; LOEBENSTEIN, 2009; ULLOA-OGAZ; MUÑOZ-CASTELLANOS; NEVÁREZ-MOORILLÓN, 2015). Embora o hiperparasitismo seja mais comum em fungos, mecanismos de produção de enzimas líticas como quitinases, glucanases, celulases e proteases que podem desintegrar estruturas essenciais nas paredes celulares de fungos e pragas também são reportadas em actinomicetos (A. VELIZ; MARTÍNEZ-HIDALGO; M. HIRSCH, 2017; FRÓES *et al.*, 2012; MAHADEVAN; CRAWFORD, 1997; PALANIYANDI; YANG; SUH, 2013; SADEGHI *et al.*, 2017). Ainda, há relatos de bactérias do gênero *Streptomyces* que podem, simultaneamente, demonstrar biocontrole e traços de promoção de crescimento vegetal, oferecendo dupla aptidão para proteção e nutrição de plantas (AWLA *et al.*, 2017; NAZARI *et al.*, 2023; SOUSA; SOARES; GARRIDO, 2008).

Figura 8. Principais mecanismos de controle biológico. **(1)** Competição, **(2)** Indução de resistência sistêmica, **(3)** Antibiose e **(4)** Hiperparasitismo



Fonte: Adaptado de SILVA *et al.* (2022)

Embora seja notável o potencial de aplicação e produtos comerciais já disponíveis baseados em actinobactérias para promoção de crescimento vegetal e controle biológico de pragas e doenças, ainda existe um grande desafio de desenvolvimento tecnológico de produtos para que este grupo seja protagonista no contexto dos bioinsumos de mercado (SILVA *et al.*, 2022). Biofertilizantes e alguns biopesticidas bem-sucedidos dependem essencialmente da competência na colonização da rizosfera, uma habilidade característica de actinomicetos (DOUMBOU *et al.*, 2005; MERZAEVA; SHIROKIKH, 2006). Para tal, uma alta concentração de células ou metabólitos usualmente se faz necessário, exigindo etapas laboriosas de desenvolvimento de bioprocessos para produção e formulações estáveis que prolonguem e não comprometam a bioatividade do ativo em condições pré e pós aplicação (SILVA *et al.*, 2022).

Nesse sentido, métodos produtivos e o desenvolvimento de formulações ainda são gargalos, resultando em uma menor prevalência de produtos baseados em

células de actinomicetos em comparação com aqueles baseados em seus metabólitos, reforçando a importância de iniciativas de desenvolvimento científico e tecnológico que suportem o desenvolvimento de bioinsumos baseados em actinomicetos. Entretanto, trabalhos recentes têm avançado nesses quesitos com novas tecnologias e avanços científicos (ALLALI *et al.*, 2022; FATMAWATI *et al.*, 2023; KIM; KWAK, 2023a; MANCERA-LÓPEZ *et al.*, 2022a; SABERI - RISEH; MORADI - POUR, 2021a; ZAMOUM *et al.*, 2022), bem como o lançamento de produtos comerciais como Actinovate®, Rhizovit®, Mycostop®, entre outros.

1.5 O CONTROLE BIOLÓGICO NO CONTEXTO DOS BIOINSUMOS

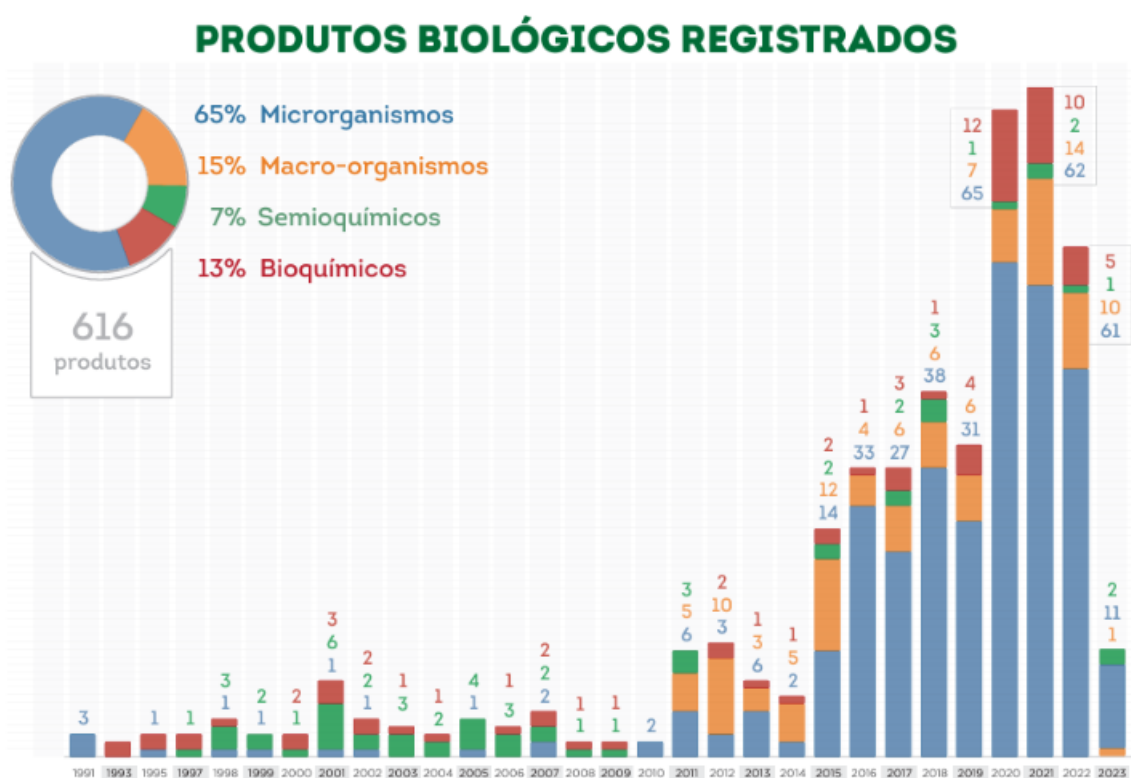
A adoção de biopesticidas e biofertilizantes é essencial para a promoção de práticas agrícolas mais sustentáveis, racionalização do uso de agroquímicos, fertilizantes e proposição de modelos de manejo mais resilientes aos desafios bióticos e abióticos da agricultura moderna (AYILARA *et al.*, 2023). No que tange aos aspectos científicos e tecnológicos, tais ferramentas vem apresentando recentemente uma acentuada evolução e adoção, reformulando conceitos, transformando sistemas de manejo e repaginando o mercado de insumos agrícolas, especialmente no Brasil (CROPLIFE BRASIL, 2020a, 2023b). Adicionalmente, movimentos importantes de institucionalização dessas práticas têm canalizado, fomentado e regulamentado iniciativas como, por exemplo, o decreto Nº 10.375, de 26 de maio de 2020 que institucionalizou o Programa Nacional de Bioinsumos (MAPA, 2022).

Segundo o decreto, são considerados bioinsumos qualquer produto, processo ou tecnologia de origem vegetal, animal ou microbiana destinados ao uso na produção, no armazenamento e no beneficiamento de produtos agropecuários, abrangendo os sistemas de produção agrícola, pecuária, aquícola e florestal. Dessa forma, o conceito científico de biopesticidas e biofertilizantes é expandido para produtos que proporcionem melhor crescimento, desenvolvimento e mecanismos de respostas no metabolismo de animais, plantas e microrganismos. Nesse sentido, os bioinsumos compreendem inoculantes, promotores de crescimento de plantas, biofertilizantes, produtos para nutrição vegetal e animal, defensivos biológicos, produtos fitoterápicos, entre outros (MAPA, 2022).

Bem como ocorre com os agroquímicos, a maior demanda de bioinsumos está nos defensivos biológicos, devido à capacidade de dano causada por pragas e

doenças agrícolas. No Brasil, legalmente, os defensivos biológicos são divididos em quatro categorias (semioquímicos, bioquímicos, macrobiológicos e microbiológicos) e, até o início de 2023, dos 616 produtos registrados, 65% eram microbiológicos, 15% eram macrobiológicos, 13% eram bioquímicos e 7% eram semioquímicos (Figura 9). Ainda, até 2020, a maior parte dos defensivos biológicos era composto por fungos (39%), seguido de bactérias (18,7%), insetos (15,5%), vírus (7,7%), ácaros (3,5%) e nematoides (0,6%) além de bioquímicos (7%) e semioquímicos (8%) (CROPLIFE BRASIL, 2023a).

Figura 9. Distribuição de defensivos biológicos em microrganismos, macrorganismos, semioquímicos e bioquímicos



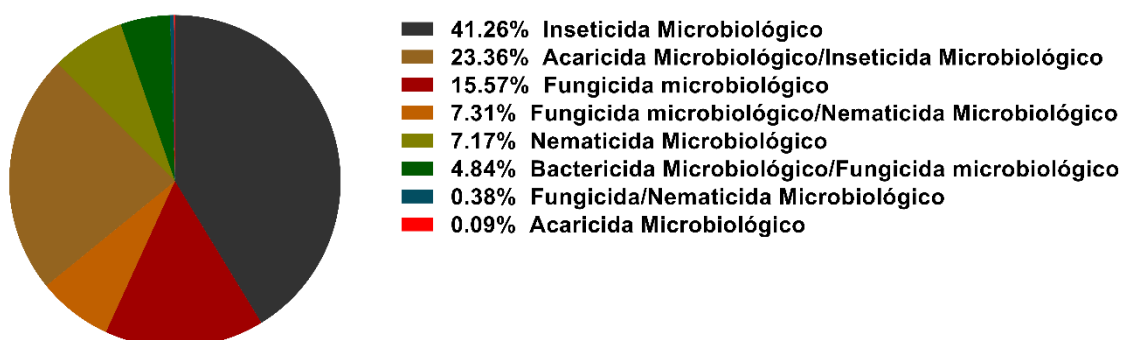
Fonte: Retirado de CROPLIFE BRASIL (2023a)

Especialmente no que tange à classe dos defensivos microbiológicos, algumas subclasses são elencadas de acordo com os agentes causais ou alvos biológicos para qual o produto foi registrado como, por exemplo, acaricidas microbiológicos, bactericidas microbiológicos, fungicidas microbiológicos, inseticidas microbiológicos, nematicidas microbiológicos e produtos de dupla aptidão como acaricidas/inseticidas microbiológicos, fungicidas/nematicidas microbiológicos e bactericidas/fungicidas microbiológicos. Nos últimos 3 anos houve um crescimento

acentuado em todas as subcategorias de modo que o número de registros no Brasil de produtos de baixo risco (biológicos, reguladores de crescimento e produtos para agricultura orgânica) foi de 95 em 2020, 92 em 2021 e 136 em 2022 (MAPA, 2023). Segundo o Sistema Agrofit (AGROFIT, 2024), a subclasse dos inseticidas microbiológicos ainda é dominante em número de registros para alvo (Figura 10), especialmente devido ao pioneirismo no controle biológico dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* e por esses ativos serem predominantes nos registros por especificações de referência, uma via de registro de produtos facilitada e especial para a agricultura orgânica.

Figura 10. Distribuição de registros de defensivos microbiológicos por alvo para diferentes subclasses no Brasil

Número de registros para alvo por subclasse no Brasil - 2023



Fonte: Elaborado pelo autor. Dados de AGROFIT (2024)

No que tange às espécies majoritariamente utilizadas como ingredientes ativos nos defensivos microbiológicos, segundo dados do Sistema Agrofit (AGROFIT, 2024), existem 34 diferentes espécies de microrganismos registrados, sendo 15 espécies de bactérias, 19 espécies de fungo, além de 6 classificações de vírus. Em termos de número de registros para alvo (Tabela 2), o gênero *Bacillus* é prevalente entre as bactérias, correspondendo a 93,6% do total e seguido dos gêneros *Pseudomonas* (6,13%), *Pasteuria* (0,18%) e *Priestia* (0,09%). Entre os fungos, os gêneros *Beauveria*, *Metarhizium* e *Trichoderma* são prevalentes e correspondem à 95,86% do total, seguidos dos gêneros *Isaria* (1,94%), *Paecilomyces* (1,5%), *Pochonia* (0,35%), *Hirsutella* (0,18%), *Cordyceps* (0,9%) e *Clonostachys* (0,9%). Em relação aos vírus, *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus (SfMNPV) é prevalente (33%), seguido de *Helicoverpa amígera* nucleopolyhedrovirus (HearNPV) e

Chrysodeixis includens nucleopolyhedrovirus (ChinNPV) (29%), *Aticarsia gemmatilis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) (4%), *Phthorimaea operculella* granulovirus (PhopGV-V65) (4%) e *Condylorrhiza vestigialis* multiple nucleopolyhedrovirus (CoveMNPV) (1%).

Tabela 2. Espécies de microrganismos registradas como defensivos microbiológicos no Brasil

Espécie	Registros para alvos	Subclasses
<i>Aticarsia gemmatilis</i> nucleopolyhedrovirus (AgMNPV)	2	Inseticida microbiológico
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	206	Bactericida Microbiológico/Fungicida microbiológico; Fungicida microbiológico; Fungicida microbiológico/Nematicida Microbiológico; Inseticida Microbiológico; Nematicida Microbiológico
<i>Bacillus circulans</i>	8	Fungicida microbiológico/Nematicida Microbiológico
<i>Bacillus firmus</i>	15	Nematicida Microbiológico
<i>Bacillus licheniformis</i>	34	Fungicida microbiológico; Fungicida microbiológico/Nematicida Microbiológico; Nematicida Microbiológico
<i>Bacillus methylotrophicus</i>	4	Nematicida Microbiológico
<i>Bacillus paralicheniformis</i>	6	Nematicida Microbiológico
<i>Bacillus pumilus</i>	49	Fungicida microbiológico
<i>Bacillus subtilis</i>	217	Bactericida Microbiológico/Fungicida microbiológico; Fungicida microbiológico/Nematicida Microbiológico; Nematicida Microbiológico
<i>Bacillus thuringiensis</i>	378	Fungicida microbiológico/Nematicida Microbiológico; Inseticida Microbiológico; Nematicida Microbiológico
<i>Bacillus velezensis</i>	137	Fungicida microbiológico; Fungicida microbiológico/Nematicida Microbiológico; Nematicida Microbiológico
<i>Baculovirus Helicoverpa armigera</i> (VPN-HzSNPV)	14	Inseticida microbiológico
<i>Beauveria bassiana</i>	644	Acaricida Microbiológico/Inseticida Microbiológico; Fungicida microbiológico; Inseticida Microbiológico
<i>Chrysodeixis includens</i> nucleopolyhedrovirus (ChinNPV)	14	Inseticida microbiológico
<i>Clonostachys rosea</i>	1	Fungicida microbiológico
<i>Condylorrhiza vestigialis</i> multiple nucleopolyhedrovirus (CoveMNPV)	1	Inseticida microbiológico
<i>Cordyceps javanica</i>	1	Inseticida microbiológico
<i>Hirsutella thompsonii</i>	2	Acaricida microbiológico
<i>Isaria fumosorosea</i>	20	Inseticida microbiológico
<i>Isaria javanica</i>	2	Inseticida microbiológico
<i>Metarhizium anisopliae</i>	276	Acaricida Microbiológico/Inseticida Microbiológico; Fungicida microbiológico; Inseticida Microbiológico
<i>Metarhizium rileyi</i>	9	Inseticida microbiológico
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	5	Inseticida microbiológico

<i>Paecilomyces lilacinus/Purpureocillium lilacinum</i>	12	Nematicida Microbiológico
<i>Pasteuria nishizawae</i>	2	Nematicida Microbiológico
<i>Phthorimaea operculella granulovirus (PhopGV-V65)</i>	2	Inseticida microbiológico
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	4	Nematicida Microbiológico
<i>Priestia megaterium</i>	1	Nematicida Microbiológico
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	33	Inseticida microbiológico
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	33	Inseticida microbiológico
<i>Pseudomonas oryzae</i>	3	Nematicida Microbiológico
<i>Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus (SfMNPV)</i>	16	Inseticida microbiológico
<i>Trichoderma afroharzianum</i>	8	Fungicida microbiológico
<i>Trichoderma asperellum</i>	25	Fungicida microbiológico
<i>Trichoderma atroviride</i>	1	Fungicida microbiológico
<i>Trichoderma endophyticum</i>	3	Nematicida Microbiológico
<i>Trichoderma harzianum</i>	118	Fungicida microbiológico; Fungicida microbiológico/Nematicida Microbiológico; Fungicida/Nematicida Microbiológico
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	1	Fungicida microbiológico
<i>Trichoderma reesei</i>	1	Fungicida microbiológico
<i>Trichoderma stromaticum</i>	1	Inseticida Microbiológico

Fonte: Autoria própria. Dados retirados de AGROFIT (2024)

O registro de defensivos biológicos no Brasil é realizado por agente causal ou alvo, de modo que o produto pode ser aplicado em todas as culturas onde haja ocorrência do alvo correspondente. Em termos de alvos, *Bemisia tabaci* raça B (mosca branca) é o alvo predominante em número de registros para inseticidas microbiológicos (AGROFIT, 2024), especialmente por sua relevância na cultura da soja, por ser transmissor do vírus da “necrose da haste” e pelo amplo uso de *Beauveria bassiana* no controle do alvo (SANI *et al.*, 2020). O alvo predominante em número de registros para fungicidas microbiológicos é *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causal da doença “mofo-branco” (AGROFIT, 2024), que também apresenta uma grande relevância na cultura da soja e tem o uso de espécies de *Trichoderma* spp. como importante ferramenta de controle (SMOLIŃSKA; KOWALSKA, 2018). Para nematicidas microbiológicos, os alvos *Pratylenchus brachyurus* (“nematóide das lesões radiculares”) e *Meloidogyne incognita* (“nematóide das galhas”) são igualmente predominantes (AGROFIT, 2024), apresentam alta relevância na cultura da soja e são majoritariamente controlados por espécies de *Bacillus* spp. e *Paecilomyces* spp. (OLIVEIRA *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2023).

Acaricidas microbiológicos e bactericidas microbiológicos apresentam uma relevância inferior e usualmente são agrupados dentro de subcategorias de dupla

aptidão como acaricidas/inseticidas microbiológicos e bactericidas/fungicidas microbiológicos, respectivamente. Entretanto, o ácaro *Tetranychus urticae* (“ácaro rajado”) é predominante em número de registros para acaricidas microbiológicos (AGROFIT, 2024), especialmente pela efetividade de *Beauveria bassiana* para seu controle (KHERADMAND *et al.*, 2022). Em relação a bactérias entomopatogênicas, a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, agente causal do cancro cítrico, é o alvo predominante em número de registros para bactericidas microbiológicos, com produtos registrados baseados em *Bacillus subtilis* para seu controle (AGROFIT, 2024).

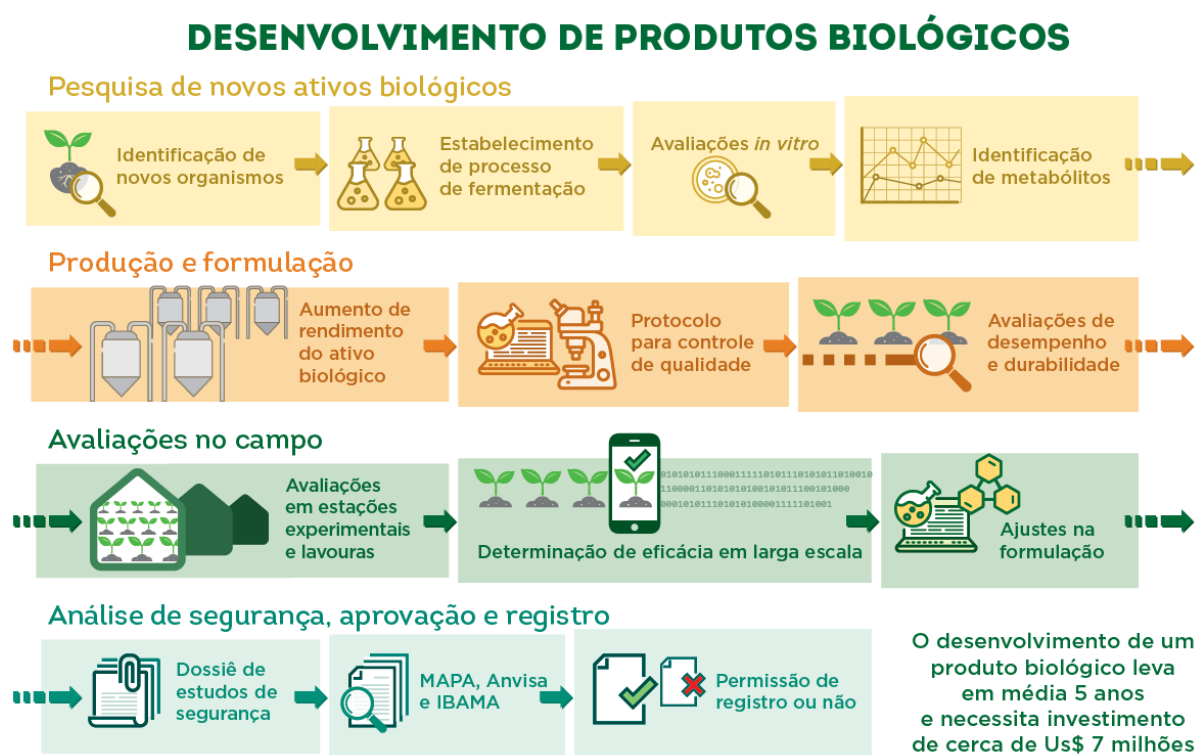
O número expressivo de ativos microbiológicos de controle corrobora com o pujante crescimento desse mercado no Brasil, especialmente nos últimos 3 anos. Um estudo realizado pela CropLife Brasil com a S&P Global constatou que, entre 2018 e 2022, a taxa de crescimento anual composta (CAGR – *compound annual growth rate*) de biodefensivos foi de 61,2% no país (CROPLIFE BRASIL, 2023c; CROPLIFE BRASIL; S&P, 2023). Na safra 2021/2022, o valor do mercado brasileiro de biodefensivos foi estimado em cerca de R\$ 3,3 bilhões, representando um crescimento de 219% em relação ao valor de mercado da safra anterior, estimada em R\$ 1,03 bilhão. Além disso, durante a safra de 2021/2022, a taxa média de utilização de métodos de controle biológico aumentou para 28% da área total cultivada no país, conforme estimativas da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), que avalia essa área em 85,7 milhões de hectares. Comparativamente, em 2019/2020, a taxa média de adoção era de cerca 17%, reforçando o crescimento acelerado do mercado (CROPLIFE BRASIL; S&P, 2023).

Grande parte do mercado de bioinsumos é impulsionada por culturas de grande escala, como soja e milho. O estudo realizado entre CropLife Brasil com a S&P Global analisou oito culturas em oito estados diferentes, abrangendo uma área total de 47 milhões de hectares. Os dados indicam uma taxa de adoção de controle biológico próxima a 39%, o que significa que em 16,6 milhões de hectares, os produtores realizaram pelo menos uma aplicação. A previsão é de que esse setor bilionário continue a crescer, de modo que o estudo ainda projetou um valor próximo a R\$ 17 bilhões para o setor até 2030, com uma taxa de crescimento anual entre 2022 e 2023 estimada em 23% (CROPLIFE BRASIL; S&P, 2023).

Embora a adoção e o mercado de defensivos biológicos apresentem um crescimento substancial nos últimos anos, a disponibilização de um produto envolve

diversas etapas científicas, tecnológicas e regulatórias (Figura 11). Tais etapas envolvidas desde até a descoberta de um agente de controle biológico até o registro e comercialização são laboriosas e onerosas. Essas etapas macro correspondem à bioprospecção ou *screening* do agente de controle biológico, ao desenvolvimento de métodos produtivos ou bioprocessos, ao desenvolvimento de formulações, avaliação de performance agrônômica em casa de vegetação e campo e ao registro de produto. Essas grandes fases ou etapas podem variar substancialmente a depender da maturidade de conhecimento científico, tecnológico e regulatório do agente de controle biológico e do tipo de produto como, por exemplo, prazos e custos superiores para produtos com composição de diferentes ingredientes ativos ou agentes de controle biológico não convencionais.

Figura 11. Etapas de desenvolvimento, industrialização e registro de bioinsumos



Fonte: Retirado de CROPLIFE BRASIL (2020b)

Especialmente no que tange ao desenvolvimento de defensivos microbiológicos, a etapa de bioprospecção corresponde a todos os estudos relativos ao isolamento, caracterização de mecanismos e comprovação de atividade biológica para controle de pragas e doenças por um agente de controle biológico. A bioprospecção usualmente é a etapa de formação dos bancos de culturas microbiológicas em universidades, institutos e empresas do ramo a partir de

expedições em biomas com alto potencial biotecnológico. A partir dos bancos de culturas, o potencial de atividade para controle biológico das linhagens é avaliado e seus mecanismos elucidados como, por exemplo, a atividade de hiperparasitismo ou produção de metabólitos antagonistas ao alvo de interesse (LACAVA; BOGAS; CRUZ, 2022; RAYMAEKERS *et al.*, 2020). A caracterização de mecanismos é essencial para a elaboração de estratégias que maximizem a atividade biológica do futuro produto a ser desenvolvido e direcione os objetivos das etapas de desenvolvimento de bioprocessos e formulações (JANGIR; SHARMA; SHARMA, 2021; KILANI-FEKI *et al.*, 2016; SHAHID *et al.*, 2021).

Bioprocessos são processos industriais que utilizam organismos vivos, como bactérias, leveduras ou células animais, para produzir produtos desejados ou realizar transformações químicas e que, no contexto dos defensivos microbiológicos, corresponde à produção industrial de células do agente de controle biológico ou seus metabólitos associados. O desenvolvimento de bioprocessos pode compreender a etapa de fermentação ou *upstream* e a etapa de acabamento ou *downstream*.

O desenvolvimento da fermentação (*upstream*) refere-se à etapa de entendimento e otimização de parâmetros de cultivo das células microbianas, determinando parâmetros ótimos do inóculo, meio de cultura, otimização da cinética de crescimento e estabelecimento de parâmetros de qualidade, de modo que o processo possa ser escalonável industrialmente (RATHORE *et al.*, 2021). Na indústria de bioinsumos, usualmente, busca-se no *upstream* a produção de estruturas microbianas mais resistentes como estruturas reprodutivas (conídios, por exemplo) ou estruturas de resistência (endósporos, por exemplo) que serão os ingredientes ativos a serem formulados e, conseqüentemente, possam apresentar uma maior estabilidade. Os processos fermentativos para produção de bioinsumos usualmente são fermentações submersas ou fermentações em estado sólido. A fermentação em estado sólido (FES) é majoritariamente utilizada para produção de fungos por apresentar características propícias para formação de estruturas reprodutivas, baixo custo e fácil implantação industrial, embora, apresente menor controle de parâmetros e susceptibilidade para contaminações industriais (MATTEDI *et al.*, 2023). Em contrapartida, a fermentação submersa é majoritariamente adotada para produção de bactérias e metabólitos, apresentando um maior custo para implantação, mas provendo um sistema fermentativo com mais possibilidades de controle (RAVENSBERG, 2011).

As etapas de acabamento ou *downstream* correspondem a passos de separação ou recuperação de biomassa, lise celular, concentração do cultivo, secagem ou purificação de metabólitos. O *downstream* na indústria de bioinsumos é de suma importância pois envolve etapas de concentração celular para produção de produtos com doses de campo mais competitivas, etapas de secagem para estabilização de estruturas microbianas e, até mesmo, etapas de lise celular e purificação de metabólitos com atividade de controle biológico (TEIXIDÓ; USALL; TORRES, 2022).

O desenvolvimento de formulações para defensivos microbiológicos envolve várias etapas que visam funcionalizar o ativo biológico, garantindo sua eficácia, entrega e estabilidade durante o armazenamento, aplicação e ação no campo. Os tipos de formulações de defensivos biológicos usualmente seguem as modalidades utilizadas por agroquímicos (Figura 12), entretanto, a estratégia de formulação pode variar substancialmente a depender das características do microrganismo ou metabólito a ser formulado, podendo ser formulações líquidas ou sólidas. A atividade de água (A_w) é uma variável relevante na estabilização de microrganismos em formulações (LÓPEZ-MALO; ALZAMORA, 2015), culminando em diversas estratégias utilizadas para alcançar valores de A_w adequados para a estabilização de ingredientes ativos como, por exemplo, a secagem (*spray dryer* ou liofilização) ou utilização de redutores de atividade de água (glicóis, açúcares, etc.) (KAWAKITA; LEVEAU; JEOH, 2021). Alguns ingredientes ativos, especialmente não baseados em estruturas de resistência, podem ainda apresentar susceptibilidade a outros fatores como radiação UV, temperatura, salinidade e incompatibilidade com co-formulantes (ESSIEDU; ADEPOJU; IVANTSOVA, 2020; WILSON *et al.*, 2020). Nesse sentido, técnicas de encapsulamento vêm sendo desenvolvidas para maximizar a estabilidade, compatibilidade e, até mesmo, a liberação controlada de ativos no campo, garantindo sua efetividade em todo o ciclo (BEHLE; BIRTHISEL, 2023; SINGH; PAITHANKAR, 2023).

Figura 12. Classificação ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) de formulações agroquímicas



Fonte: Retirado de MAIS AGRO - SYNGENTA (2021)

Todas as etapas de desenvolvimento de um defensivo microbiológico envolvem a avaliação da atividade biológica do ingrediente ativo ou do produto formulado para o controle de pragas e doenças. Usualmente essa avaliação acontece *in vitro* durante a fase de bioprospecção e elucidação de mecanismos e em ensaios *in vivo* ou *in planta* em casa de vegetação e em campos experimentais para as demais fases. A performance *in vivo* é usualmente associada com resultados positivos em campo, entretanto, nem sempre o comportamento é reproduzível no ambiente de campo (SILVA *et al.*, 2022). Ainda, microrganismos com baixa atividade *in vitro* podem apresentar alta atividade *in planta* ou, eventualmente, variáveis do manejo agrônomo possam ser desfavoráveis a bons candidatos selecionados *in vitro*. Dessa forma, a validação agrônoma em todas as etapas de desenvolvimento possui uma importância substancial para garantir a manutenção da atividade biológica do microrganismo na cadeia de desenvolvimento e o entendimento do seu comportamento nos diversos cenários de manejo agrônomo.

Em termos de regulamentação, no Brasil, a avaliação e o registro de defensivos biológicos são regidos por um triunvirato de órgãos governamentais, a saber, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O domínio das substâncias biológicas está sujeito à regulamentação da Lei de Pesticidas, bem como por meio de decretos e especificações de referência referentes a essa categoria específica de pesticidas.

Cada uma dessas entidades realiza uma forma distinta de avaliação do produto, independentemente das outras. A ANVISA realiza um exame do dossiê toxicológico, avaliando o grau de toxicidade que o produto representa para a população, bem como determinando as condições sob as quais seu uso pode ser considerado seguro. O IBAMA assume a responsabilidade de construir um dossiê ambiental, no qual é avaliado o potencial do produto de infligir efeitos prejudiciais ao meio ambiente. O MAPA, por outro lado, avalia a eficácia do produto na aplicação prática, resultando na criação de um dossiê agrônômico.

Os dados solicitados e avaliados em dossiê de registro são: identidade e pureza do ativo biológico, métodos analíticos usados para identificar o ativo, dados de eficácia, propriedades físicas, químicas e biológicas, informações sobre uso, processos de produção e atividade de campo, possíveis efeitos na saúde humana, informações sobre presença ou ausência de resíduos, efeitos sobre não-alvos. Além disso, para garantir a conformidade com a legislação, a coleta de materiais biológicos requer autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) através do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (Sisbio). A Instrução Normativa nº 03/2014 estabelece as diretrizes para esse processo. Além disso, as leis do patrimônio genético, como a Lei nº 13.123/2015 e o Decreto nº 8.772/2016, resultaram na criação do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen) e do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGen). A coleta regulamentada exige a identificação precisa do ativo biológico, crucial para a replicação dos resultados. Por fim, o estudo de novos ativos biológicos requer um Registro Especial Temporário (RET) para importação ou produção. A obtenção de dados sobre a aplicação prática, dose, preparo da calda e indicações específicas são exigências, assim como protocolos de teste de estabilidade adaptados para cada tipo de ativo biológico. A ANVISA emprega protocolos específicos, incluindo testes de patogenicidade validados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, para avaliar o impacto na saúde humana e no meio ambiente.

Em termos relativos, a tramitação regulatória de defensivos biológicos no Brasil é considerada complexa, laboriosa e lenta. Visando modernizar o processo, em 2023 as instituições responsáveis publicaram a Portaria Conjunta SDA/Mapa - Ibama - Anvisa nº 1/2023. A nova Portaria Conjunta estabelece procedimentos específicos para o registro de produtos microbiológicos, isentando-os do registro de produto técnico e instituindo um processo simplificado, aplicável quando a composição e o

microrganismo utilizado são idênticos a um produto de referência cujas análises já foram concluídas. Além disso, define as documentações necessárias a serem apresentadas ao MAPA, Anvisa e Ibama, incluindo justificativas técnicas para isenção de estudos, e específicas situações em que produtos microbiológicos são dispensados de estudos toxicológicos e ecotoxicológicos. Por fim, proíbe o registro de produtos com microrganismos de classes de risco biológico 3 ou 4, estabelece tramitação prioritária para registros microbiológicos, e dispensa receituário agrônomo para certos produtos, exigindo que a dispensa seja indicada no rótulo e na bula. Nesse sentido, a Portaria busca adequar a legislação às inovações, permitindo o registro de microrganismos inativados, regulamentando bioestimulantes, metabólitos e organismos geneticamente modificados e buscando simplificações e esclarecimentos no procedimento de registro desses produtos (DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, 2023).

Dessa forma, fica evidente a dimensão já alcançada e potencial futuro dos bioinsumos para construção de práticas agrícolas mais efetivas e sustentáveis, especialmente no Brasil. Adicionalmente, com a contribuição substancial da cultura da soja para o cenário agrícola brasileiro e fatores limitantes do seu potencial produtivo como, por exemplo, a mancha-alvo, reforça-se a necessidade de desenvolvimento de novas soluções biotecnológicas que possam integrar o manejo da cultura. Logo, o bioma mangue representa uma importante fonte de biodiversidade e potencial biotecnológico prospecção de ativos biológicos como, por exemplo, bactérias do filo dos actinomicetos, que apresentam um grande potencial para aplicação agrícola. Além disso, das 40 espécies registradas como defensivos microbiológicos no Brasil, ainda nenhuma é pertencente ao grupo das actinobactérias, reforçando o potencial desses microrganismos para agregarem novos mecanismos às ferramentas disponíveis no mercado.

REFERÊNCIAS

- A. VELIZ, E.; MARTÍNEZ-HIDALGO, P.; M. HIRSCH, A. Chitinase-producing bacteria and their role in biocontrol. **AIMS Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 689–705, 2017.
- ABDALLAH, M. E. *et al.* Application of actinomycetes as biocontrol agents in the management of onion bacterial rot diseases. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 46, n. 15, p. 1797–1808, 2013.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. [s.l.] Elsevier, 2005.
- AGROFIT. **Produtos técnicos - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT)**. Disponível em: <https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 5 jan. 2024.
- AGUIAR, F. M. **Caracterização de isolados de *Corynespora cassiicola* e avaliação da sensibilidade in vitro a fungicidas**. [s.l.] Universidade de Brasília, 13 maio 2015.
- AL-ASKAR, A. A.; KHAIR, A. In vitro antifungal activity of *Streptomyces spororaveus* RDS 28 against some phytopathogenic fungi. **African Journal of Agricultural Research**, v. 6, n. 12, p. 2835–2842, 2011.
- ALDESUQUY, H. S.; MANSOUR, F. A.; ABO-HAMED, S. A. Effect of the culture filtrates of *Streptomyces* on growth and productivity of wheat plants. **Folia Microbiologica**, v. 43, p. 465–470, 1998.
- ALLALI, K. *et al.* Optimisation of talcum powder formulation based on *Nocardiosis albirubida* strain NA2 spores for biocontrol of *Bipolaris sorokiniana* root rot in durum wheat seedlings. **Biocontrol Science and Technology**, v. 32, n. 12, p. 1434–1452, 2 dez. 2022.
- ALMEIDA, A. M. R. *et al.* Ocorrência de *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 1, n. 1, p. 111–112, 1976.
- ALMEIDA, Á. M. R. *et al.* Survival of pathogens on soybean debris under no-tillage and conventional tillage systems. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 10, p. 1231–1238, out. 2001.
- ALMEIDA, F.; RODRIGUES, M. L.; COELHO, C. The still underestimated problem of fungal diseases worldwide. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 214, 2019.
- ALONGI, D. M. Present state and future of the world's mangrove forests. **Environmental Conservation**, v. 29, n. 3, p. 331–349, 13 set. 2002.
- ALONGI, D. M. Mangrove forests: Resilience, protection from tsunamis, and responses to global climate change. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 76, n. 1, p. 1–13, jan. 2008.
- ALORI, E. T.; BABALOLA, O. O. Microbial inoculants for improving crop quality and

human health in Africa. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2213, 2018.

ALPHEY, N.; BONSALL, M. B. Genetics-based methods for agricultural insect pest management. **Agricultural and forest entomology**, v. 20, n. 2, p. 131–140, 2018.

AMORIM, L. Avaliação de doenças. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**, 1995.

AMORIM, L.; PASCHOLATI, S. F. Ciclo das relações planta-patógeno. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**, v. 4, p. 59–100, 2011.

ARFAOUI, A. *et al.* Combining *Streptomyces hygroscopicus* and phosphite boosts soybean's defense responses to *Phytophthora sojae*. **BioControl**, v. 65, n. 3, p. 363–375, 14 jun. 2020.

ARSENEAULT, T.; FILION, M. Biocontrol through antibiosis: exploring the role played by subinhibitory concentrations of antibiotics in soil and their impact on plant pathogens. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 39, n. 3, p. 267–274, 2017.

AVOZANI, A.; REIS, E. M.; TONIN, R. B. Sensitivity loss by *Corynespora cassiicola*, isolated from soybean to the fungicide carbendazim. **Summa Phytopathologica**, v. 40, p. 273–276, 2014.

AWLA, H. K. *et al.* Plant growth-promoting abilities and biocontrol efficacy of *Streptomyces* sp. UPMRS4 against *Pyricularia oryzae*. **Biological Control**, v. 112, p. 55–63, set. 2017.

AYILARA, M. S. *et al.* Biopesticides as a promising alternative to synthetic pesticides: A case for microbial pesticides, phytopesticides, and nanobiopesticides. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 16 fev. 2023.

BANDARA, A. Y. *et al.* Dissecting the economic impact of soybean diseases in the United States over two decades. **PloS one**, v. 15, n. 4, p. e0231141, 2020.

BARKA, E. A. *et al.* Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 80, n. 1, p. 1–43, 2016.

BARTHE, P. *et al.* Structural analysis of cassiicolin, a host-selective protein toxin from *Corynespora cassiicola*. **Journal of molecular biology**, v. 367, n. 1, p. 89–101, 2007.

BASU, A. *et al.* Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: recent developments, constraints, and prospects. **Sustainability**, v. 13, n. 3, p. 1140, 2021.

BEHLE, R.; BIRTHISEL, T. Formulations of entomopathogens as bioinsecticides. Em: **Mass Production of Beneficial Organisms**. [s.l.] Elsevier, 2023. p. 407–429.

BELLENGER, J. P. *et al.* Biological nitrogen fixation by alternative nitrogenases in terrestrial ecosystems: a review. **Biogeochemistry**, v. 149, n. 1, p. 53–73, 30 maio 2020.

BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. **Genetics and molecular biology**, v. 35, p. 1044–1051, 2012.

BENSON, D. R.; SILVESTER, W. B. Biology of Frankia strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. **Microbiological Reviews**, v. 57, n. 2, p. 293–319, jun. 1993.

BESSET-MANZONI, Y. *et al.* Does in vitro selection of biocontrol agents guarantee success in planta? A study case of wheat protection against Fusarium seedling blight by soil bacteria. **PLOS ONE**, v. 14, n. 12, p. e0225655, 5 dez. 2019.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 1327–1350, 2012.

BHATTI, A. A.; HAQ, S.; BHAT, R. A. Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. **Microbial pathogenesis**, v. 111, p. 458–467, 2017.

BIBI, F. *et al.* Isolation, diversity, and biotechnological potential of rhizo- and endophytic bacteria associated with mangrove plants from Saudi Arabia. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 2, 2017.

BIBI, F. *et al.* Microbial Flora Associated with the Halophyte—*Salsola imbricate* and Its Biotechnical Potential. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 31 jan. 2018.

BOUBEKRI, K. *et al.* Multifunctional role of Actinobacteria in agricultural production sustainability: A review. **Microbiological Research**, v. 261, p. 127059, 2022.

BOUILLON, S. *et al.* Mangrove production and carbon sinks: A revision of global budget estimates. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 22, n. 2, 9 jun. 2008.

BOUKHATEM, Z. F.; MERABET, C.; TSAKI, H. Plant growth promoting actinobacteria, the most promising candidates as bioinoculants? **Frontiers in Agronomy**, v. 4, p. 849911, 2022.

BUNTING, P. *et al.* The Global Mangrove Watch—A New 2010 Global Baseline of Mangrove Extent. **Remote Sensing**, v. 10, n. 10, p. 1669, 22 out. 2018.

BURNS, J. A. Actinovate STP Fungicide. **Washington, DC: United States Environmental Protection Agency**, p. 20460, 2017.

CARRIS, L. M.; GLAWE, D. A.; GRAY, L. E. Isolation of the soybean pathogens *Corynespora cassiicola* and *Phialophora gregata* from cysts of *Heterodera glycines* in Illinois. **Mycologia**, v. 78, n. 3, p. 503–506, 1986.

CASTRO, R. A. *et al.* Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 382, 28 dez. 2014.

CASTRO, R. A. *et al.* Mangrove endophyte promotes reforestation tree (*Acacia polyphylla*) growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 59–66, jan. 2018.

CATTELAN, A. J.; DALL'AGNOL, A. The rapid soybean growth in Brazil. **OCL**, v. 25, n. 1, p. D102, 17 jan. 2018.

CHEN, K.-I. *et al.* Soyfoods and soybean products: from traditional use to modern applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 1, p. 9–22, 8 out. 2012.

CIMMINO, T. *et al.* Genome sequence and description of *Actinomyces polynesiensis* str. MS2 sp. nov. isolated from the human gut. **New Microbes and New Infections**, v. 12, p. 1–5, 2016.

CLARDY, J.; FISCHBACH, M. A.; WALSH, C. T. New antibiotics from bacterial natural products. **Nature biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1541–1550, 2006.

COMBY, M. *et al.* Screening of wheat endophytes as biological control agents against Fusarium head blight using two different in vitro tests. **Microbiological research**, v. 202, p. 11–20, 2017.

CONAB. **BOLETIM DA SAFRA DE GRÃOS**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>>. Acesso em: 13 jan. 2024.

COOKE, M. C. New melon disease. **Gardner's Chron**, v. 10, p. 271–272, 1896.

CROPLIFE BRASIL. **Produtos biológicos: Brasil lidera mercado global com adoção crescente**. Disponível em: <<https://croplifebrasil.org/produtos-biologicos/produtos-biologicos-brasil-lidera-mercado-global-com-adocao-crescente/>>. Acesso em: 30 dez. 2023a.

CROPLIFE BRASIL. **Desenvolvimento de produtos biológicos**. Disponível em: <<https://croplifebrasil.org/publicacoes-areas/produtos-biologicos/>>. Acesso em: 19 jan. 2024b.

CROPLIFE BRASIL. **Produtos biológicos registrados**. Disponível em: <<https://croplifebrasil.org/publicacoes/produtos-biologicos-registrados/>>. Acesso em: 18 jan. 2024a.

CROPLIFE BRASIL. **Biodefensivos, cada vez mais presentes no campo**. Disponível em: <<https://croplifebrasil.org/noticias/biodefensivos-cada-vez-mais-presentes-no-campo/>>. Acesso em: 30 dez. 2023b.

CROPLIFE BRASIL. **Biodefensivos, cada vez mais presentes no campo**. Disponível em: <<https://croplifebrasil.org/noticias/biodefensivos-cada-vez-mais-presentes-no-campo/>>. Acesso em: 5 jan. 2024c.

CROPLIFE BRASIL; S&P. **Sumário Executivo Biodefensivos Safra 2021/22**. Disponível em: <<https://croplifebrasil.org/publicacoes/mercado-de-biodefensivos-safra-2021-22/>>. Acesso em: 5 jan. 2024.

CUTRIM, F. A.; SILVA, G. S. Patogenicidade de *Corynespora cassiicola* a diferentes espécies de plantas. **Fitopatologia brasileira**, v. 28, p. 193–194, 2003.

DALL'AGNOL, A. **A Embrapa Soja no contexto do desenvolvimento da soja no Brasil: histórico e contribuições**. [s.l.] Brasília, DF: Embrapa, 2016., 2016.

DASTAGER, S. G.; DAMARE, S. Marine actinobacteria showing phosphate-solubilizing efficiency in Chorao Island, Goa, India. **Current microbiology**, v. 66, p. 421–427, 2013.

DE LAMOTTE, F. *et al.* Purification and characterization of cassiicolin, the toxin produced by *Corynespora cassiicola*, causal agent of the leaf fall disease of rubber tree. **Journal of Chromatography B**, v. 849, n. 1–2, p. 357–362, abr. 2007.

DE SOUZA SEBASTIANES, F. L. *et al.* Species diversity of culturable endophytic fungi from Brazilian mangrove forests. **Current Genetics**, v. 59, n. 3, p. 153–166, 6 ago. 2013.

DEGUINE, J.-P. *et al.* Integrated pest management: good intentions, hard realities. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 41, n. 3, p. 38, 2021.

DEL CARMEN OROZCO-MOSQUEDA, M.; GLICK, B. R.; SANTOYO, G. ACC deaminase in plant growth-promoting bacteria (PGPB): An efficient mechanism to counter salt stress in crops. **Microbiological Research**, v. 235, p. 126439, 2020.

DÉON, M. *et al.* Characterization of a cassiicolin-encoding gene from *Corynespora cassiicola*, pathogen of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Plant Science**, v. 185, p. 227–237, 2012.

DÉON, M. *et al.* Diversity of the cassiicolin gene in *Corynespora cassiicola* and relation with the pathogenicity in *hevea brasiliensis*. **Fungal Biology**, v. 118, n. 1, p. 32–47, 2014.

D'ERRICO, G. *et al.* Nematicidal efficacy of new abamectin-based products used alone and in combination with indolebutyric acid against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Redia: Giornale di Zoologia**, v. 100, 2017.

DEVI, S. S.; RAO, K. V. B. Exploration of antimicrobial compounds from *Streptomyces* S9 against a phytopathogen, *Corynespora cassiicola* (Berk & Curtis). **Journal of Biopesticides**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2017.

DEZAM, A. P. G. *et al.* Microbial production of organic acids by endophytic fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 282–287, jul. 2017.

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO. **PORTARIA CONJUNTA SDA/MAPA - IBAMA - ANVISA Nº 1, DE 10 DE ABRIL DE 2023**. Disponível em:

<<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-conjunta-sda/mapa-ibama-anvisa-n-1-de-10-de-abril-de-2023-480871674>>. Acesso em: 6 jan. 2024.

DIAS, A. C. F. *et al.* Diversity and biotechnological potential of culturable bacteria from Brazilian mangrove sediment. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 7, p. 1305–1311, 14 jul. 2009.

DIXON, L. J. *et al.* Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*. **Phytopathology**, v. 99, n. 9, p. 1015–1027, set. 2009.

DONALD, L. *et al.* *Streptomyces*: Still the biggest producer of new natural secondary metabolites, a current perspective. **Microbiology Research**, v. 13, n. 3, p. 418–465, 2022.

DOS SANTOS, A. L. G.; DE LIMA, N. G. B. BIOGEOGRAFIA DOS MANGUEZAIS: OCORRÊNCIA, ÁREA DE DISTRIBUIÇÃO E DIVERSIDADE DE ESPÉCIES. **XIV Encontro Nacional de Pós-Graduação em Pesquisa em Geografia**, 2021.

DOUMBOU, C. L. *et al.* Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. **Phytoprotection**, v. 82, n. 3, p. 85–102, 12 abr. 2005.

DUAN, Y. *et al.* Benzimidazole-and Qol-resistance in *Corynespora cassiicola* populations from greenhouse-cultivated cucumber: An emerging problem in China. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 153, p. 95–105, 2019.

EBRAHIMI-ZARANDI, M.; SABERI RISEH, R.; TARKKA, M. T. Actinobacteria as effective biocontrol agents against plant pathogens, an overview on their role in eliciting plant defense. **Microorganisms**, v. 10, n. 9, p. 1739, 2022.

EDWARDS MOLINA, J. P. *et al.* Meta-analysis of fungicide efficacy on soybean target spot and cost–benefit assessment. **Plant Pathology**, v. 68, n. 1, p. 94–106, 2019.

EDWARDS MOLINA, J. P. *et al.* Soybean target spot caused by *Corynespora cassiicola*: a resurgent disease in the Americas. **Tropical Plant Pathology**, v. 47, n. 3, p. 315–331, 1 jun. 2022.

ELLIS, M. B.; SUBRAMANIAN, C. V. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria. **CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria**, n. Set 17, 1968.

EL-TARABILY, K. A. *et al.* Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 13–26, 2009.

EL-TARABILY, K. A.; NASSAR, A. H.; SIVASITHAMPARAM, K. Promotion of growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a calcareous soil by a phosphate-solubilizing, rhizosphere-competent isolate of *Micromonospora endolithica*. **Applied soil ecology**, v. 39, n. 2, p. 161–171, 2008.

EMBRAPA SOJA. **Soja em números (safra 2022/23)**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acesso em: 13 jan. 2024.

ESCHER, F.; WILKINSON, J. A economia política do complexo Soja-Carne Brasil-China. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 57, n. 4, p. 656–678, dez. 2019.

ESSIEDU, J. A.; ADEPOJU, F. O.; IVANTSOVA, M. N. **Benefits and limitations in using biopesticides: A review**. 2020.

FATMAWATI, U. *et al.* Optimization of culture medium and bioformulation of rhizobial actinomycetes to enhance soybean plant growth. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 24, n. 5, 4 jun. 2023.

FERREIRA, M. J.; SILVA, H.; CUNHA, A. Siderophore-producing rhizobacteria as a promising tool for empowering plants to cope with iron limitation in saline soils: A review. **Pedosphere**, v. 29, n. 4, p. 409–420, 2019.

FILIZOLA, P. R. B. *et al.* Biodiversity and phylogeny of novel *Trichoderma* isolates from mangrove sediments and potential of biocontrol against *Fusarium* strains. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 1, p. 89, 23 dez. 2019.

FISHER, M. C. *et al.* Threats posed by the fungal kingdom to humans, wildlife, and agriculture. **MBio**, v. 11, n. 3, p. 10–1128, 2020.

FRAC. **Summary of annual Sensitivity Monitoring**. Disponível em: <<https://www.frac.info/knowledge-database/summary-of-annual-monitoring>>. Acesso em: 13 jan. 2024.

FREITAS, M. A CULTURA DA SOJA NO BRASIL: O CRESCIMENTO DA PRODUÇÃO BRASILEIRA E O SURGIMENTO DE UMA NOVA FRONTEIRA AGRÍCOLA. **ENCICLOPEDIA BIOSFERA**, v. 7, n. 12, 31 maio 2011.

FRÓES, A. *et al.* Selection of a *Streptomyces* strain able to produce cell wall degrading enzymes and active against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Microbiology**, v. 50, n. 5, p. 798–806, 4 out. 2012.

FULMER, A. M. *et al.* First report of target spot caused by *Corynespora cassiicola* on cotton in Georgia. **Plant disease**, v. 96, n. 7, p. 1066, 2012.

GALBIERI, R. *et al.* *Corynespora* Leaf Blight of Cotton in Brazil and Its Management. **American Journal of Plant Sciences**, v. 05, n. 26, p. 3805–3811, 2014.

GIRI, C. *et al.* Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. **Global Ecology and Biogeography**, v. 20, n. 1, p. 154–159, 17 jan. 2011.

GLICK, B. R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. **FEMS microbiology letters**, v. 251, n. 1, p. 1–7, 2005.

GODOY, C. V. Target spot. **Hartman, GL; Rupe, JC; Sikora, EJ; Domier, LL**, 2015.

GODOY, C. V. *et al.* Eficiência de fungicidas para o controle da mancha-alvo, *Corynespora cassiicola*, na cultura da soja, na safra 2022/2023: resultados

sumarizados dos ensaios cooperativos. **Circular técnica 194**, 2023.

GOHAIN, A. *et al.* Actinobacteria: diversity and biotechnological applications. **Recent advancements in microbial diversity**, p. 217–231, 2020.

GONG, Y. *et al.* Antifungal volatile organic compounds from *Streptomyces setonii* WY228 control black spot disease of sweet potato. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 88, n. 6, p. e02317-21, 2022.

GTARI, M. *et al.* Phylogenetic perspectives of nitrogen-fixing actinobacteria. **Archives of Microbiology**, v. 194, n. 1, p. 3–11, 21 jan. 2012.

GU, S. *et al.* Siderophore-mediated interactions determine the disease suppressiveness of microbial consortia. **Msystems**, v. 5, n. 3, p. 10–1128, 2020.

HAMDALI, H. *et al.* Screening for rock phosphate solubilizing Actinomycetes from Moroccan phosphate mines. **Applied soil ecology**, v. 38, n. 1, p. 12–19, 2008.

HAO, L. *et al.* Exploring the Potential of Natural Products From Mangrove Rhizosphere Bacteria as Biopesticides Against Plant Diseases. **Plant Disease**, v. 103, n. 11, p. 2925–2932, nov. 2019.

HARTMAN, G. L. *et al.* **Compendium of soybean diseases and pests**. [s.l.] American Phytopathological Society St. Paul, MN, 2015.

HASSAN, M. K.; MCINROY, J. A.; KLOEPFER, J. W. The interactions of rhizodeposits with plant growth-promoting rhizobacteria in the rhizosphere: a review. **Agriculture**, v. 9, n. 7, p. 142, 2019.

HA-TRAN, D. M. *et al.* Roles of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in stimulating salinity stress defense in plants: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 6, p. 3154, 2021.

HAYAT, S. *et al.* Actinobacteria: potential candidate as plant growth promoters. **Plant stress physiology**, v. 117, 2021.

HOLGUIN, G.; VAZQUEZ, P.; BASHAN, Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. **Biology and Fertility of Soils**, v. 33, n. 4, p. 265–278, 9 abr. 2001.

HONG-THAO, P. T. *et al.* Biological characteristics and antimicrobial activity of endophytic *Streptomyces* sp. TQR12-4 isolated from elite Citrus nobilis cultivar Ham Yen of Vietnam. **International Journal of Microbiology**, v. 2016, 2016.

HUTCHINGS, M. I.; TRUMAN, A. W.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current opinion in microbiology**, v. 51, p. 72–80, 2019.

ICMBIO. **Atlas dos manguezais do Brasil**. [s.l.] Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2018.

JAMALIZADEH, M. *et al.* A review of mechanisms of action of biological control organisms against post-harvest fruit spoilage. **Eppo Bulletin**, v. 41, n. 1, p. 65–71, 2011.

JANGIR, M.; SHARMA, S.; SHARMA, S. Development of next-generation formulation against *Fusarium oxysporum* and unraveling bioactive antifungal metabolites of biocontrol agents. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 22895, 24 nov. 2021.

JAVED, Z. *et al.* Actinomycetes—the microbial machinery for the organic-cycling, plant growth, and sustainable soil health. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 31, p. 101893, 2021.

JENNERJAHN, T. C.; ITTEKKOT, V. Relevance of mangroves for the production and deposition of organic matter along tropical continental margins. **Naturwissenschaften**, v. 89, n. 1, p. 23–30, 19 jan. 2002.

JIA, S.-L. *et al.* Fungi in mangrove ecosystems and their potential applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 40, n. 6, p. 852–864, 17 ago. 2020.

JONES, J. P. A leaf spot of cotton caused by *Corynespora cassiicola*. **Phytopathology**, v. 51, n. 5, p. 305–308, 1961.

JOSE, P. A.; MAHARSHI, A.; JHA, B. Actinobacteria in natural products research: Progress and prospects. **Microbiological Research**, v. 246, p. 126708, 2021.

JUROSZEK, P.; VON TIEDEMANN, A. Plant pathogens, insect pests and weeds in a changing global climate: a review of approaches, challenges, research gaps, key studies and concepts. **The Journal of Agricultural Science**, v. 151, n. 2, p. 163–188, 2013.

KAARI, M. *et al.* Biological control of *Streptomyces* sp. UT4A49 to suppress tomato bacterial wilt disease and its metabolite profiling. **Journal of King Saud University-Science**, v. 34, n. 1, p. 101688, 2022.

KAUR, T.; RANI, R.; MANHAS, R. K. Biocontrol and plant growth promoting potential of phylogenetically new *Streptomyces* sp. MR14 of rhizospheric origin. **AMB Express**, v. 9, p. 1–14, 2019.

KAWAKITA, R.; LEVEAU, J. H. J.; JEOH, T. Optimizing viability and yield and improving stability of Gram-negative, non-spore forming plant-beneficial bacteria encapsulated by spray-drying. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 44, n. 11, p. 2289–2301, 28 nov. 2021.

KHAMNA, S.; YOKOTA, A.; LUMYONG, S. Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 649–655, 2009.

KHERADMAND, K. *et al.* Biological responses of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) to sub-lethal concentrations of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Bulletin of Entomological Research**, v. 112, n. 1, p. 70–77, 25

fev. 2022.

KILANI-FEKI, O. *et al.* Improvement of antifungal metabolites production by *Bacillus subtilis* V26 for biocontrol of tomato postharvest disease. **Biological Control**, v. 95, p. 73–82, abr. 2016.

KIM, D.-R.; KWAK, Y.-S. Optimization of Culture and Sporulation for Two Plant Beneficial *Streptomyces* Strains. **Research in Plant Disease**, v. 29, n. 2, p. 174–183, 30 jun. 2023.

KIM, H. J. *et al.* Biosynthesis of spinosyn in *Saccharopolyspora spinosa*: synthesis of permethylated rhamnose and characterization of the functions of SpnH, SpnI, and SpnK. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 9, p. 2901–2903, 2010.

KOENNING, S. R. *et al.* Increased occurrence of target spot of soybean caused by *Corynespora cassiicola* in the Southeastern United States. **Plant Disease**, v. 90, n. 7, p. 974, 2006.

KÖHL, J.; KOLNAAR, R.; RAVENSBERG, W. J. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. **Frontiers in plant science**, p. 845, 2019.

KUMAR, J. *et al.* An overview of some biopesticides and their importance in plant protection for commercial acceptance. **Plants**, v. 10, n. 6, p. 1185, 2021.

KUMAR, V.; KHAN, M. R.; WALIA, R. K. Crop Loss Estimations due to Plant-Parasitic Nematodes in Major Crops in India. **National Academy Science Letters**, v. 43, n. 5, p. 409–412, 29 out. 2020.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A.; REZENDE, J. A. M. Doenças das cucurbitáceas. **KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.** p. 325–337, 2005.

KURTH, F. *et al.* *Streptomyces*-induced resistance against oak powdery mildew involves host plant responses in defense, photosynthesis, and secondary metabolism pathways. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 27, n. 9, p. 891–900, 2014.

LACAVA, P. T.; BOGAS, A. C.; CRUZ, F. DE P. N. Plant Growth Promotion and Biocontrol by Endophytic and Rhizospheric Microorganisms From the Tropics: A Review and Perspectives. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 6, 21 mar. 2022.

LACAVA, P. T.; BOGAS, A. C.; MOREIRA, C. C. Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi from mangrove forests. **Endophytic Fungi; Nova Science Publishers, Inc.: New York, NY, USA**, p. 49, 2022.

LEBLANC, N. Bacteria in the genus *Streptomyces* are effective biological control agents for management of fungal plant pathogens: A meta-analysis. **BioControl**, v. 67, n. 1, p. 111–121, 2022.

LEE, J. *et al.* Siderophore production by actinomycetes isolates from two soil sites in

Western Australia. **Biometals**, v. 25, n. 2, p. 285–296, 2012.

LI, S. *et al.* Polyketide pesticides from actinomycetes. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 69, p. 299–307, 2021.

LIAN, Q. *et al.* The biocontrol efficacy of *Streptomyces pratensis* LMM15 on *Botrytis cinerea* in tomato. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

LIN, L.; XU, X. Indole-3-acetic acid production by endophytic *Streptomyces* sp. En-1 isolated from medicinal plants. **Current microbiology**, v. 67, p. 209–217, 2013.

LINDAU, G. Rabenhorst's Kryptogamen. **Flora**, 2 Aufl., 1 (pilze), v. 9, p. 805–807, 1910.

LIU, W. *et al.* Genomic and biocontrol potential of the crude lipopeptide by *Streptomyces bikiniensis* HD-087 against *Magnaporthe oryzae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 888645, 2022.

LOBO, C. B. *et al.* Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies. **Microbiological research**, v. 219, p. 12–25, 2019.

LOPEZ, D. *et al.* Genome-wide analysis of *Corynespora cassiicola* leaf fall disease putative effectors. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 276, 2018.

LÓPEZ-MALO, A.; ALZAMORA, S. M. Water Activity and Microorganism Control: Past and Future. Em: [s.l: s.n.]. p. 245–262.

LOVELOCK, C. E.; DUARTE, C. M. Dimensions of Blue Carbon and emerging perspectives. **Biology Letters**, v. 15, n. 3, p. 20180781, 6 mar. 2019.

MACKENZIE, K. J. *et al.* A review of *Corynespora cassiicola* and its increasing relevance to tomato in Florida. **Plant Health Progress**, v. 19, n. 4, p. 303–309, 2018.

MAGRIS, R. A.; BARRETO, R. Mapping and assessment of protection of mangrove habitats in Brazil. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 5, n. 4, p. 546–556, 2010.

MAHADEVAN, B.; CRAWFORD, D. L. Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, n. 7, p. 489–493, maio 1997.

MAIS AGRO - SYNGENTA. **Tecnologia aplicada às formulações eleva patamar da agricultura**. Disponível em: <<https://maisagro.syngenta.com.br/inovacoes-e-tendencias/tecnologia-aplicada-as-formulacoes-eleva-patamar-da-agricultura/>>. Acesso em: 19 jan. 2024.

MANCERA-LÓPEZ, M. E. *et al.* Polymeric Encapsulate of *Streptomyces* Mycelium Resistant to Dehydration with Air Flow at Room Temperature. **Polymers**, v. 15, n. 1, p. 207, 31 dez. 2022.

MAPA. **Mapa registra 63 produtos formulados para controle de pragas na agricultura.** Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-registra-63-produtos-formulados-para-controle-de-pragas-na-agricultura>>. Acesso em: 2 jan. 2024.

MAQSOOD, A.; KHALIQ, H. Interaction of Plant Parasitic Nematode with Fusarium Wilt a Disease Complex. **Jammu Kashmir Journal of Agriculture**, v. 2, n. 2, p. 33–44, 30 ago. 2022.

MARAMOROSCH, K.; LOEBENSTEIN, G. Plant disease resistance: natural, non-host innate or inducible. 2009.

MAROLDI, M. M. C. *et al.* Potential of Mangrove-Associated Endophytic Fungi for Production of Carbohydrolases with High Saccharification Efficiency. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, n. 3, p. 806–820, 2 mar. 2018.

MARTINHO, V. *et al.* Enzymatic potential and biosurfactant production by endophytic fungi from mangrove forest in Southeastern Brazil. **AMB Express**, v. 9, n. 1, p. 130, 19 dez. 2019.

MARTINS, P. M. M. *et al.* Persistence in Phytopathogenic Bacteria: Do We Know Enough? **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 25 maio 2018.

MASHELA, P. W. *et al.* Alternative nematode management strategies. **Nematology in South Africa: a view from the 21st century**, p. 151–181, 2017.

MATTEDI, A. *et al.* Solid-State Fermentation: Applications and Future Perspectives for Biostimulant and Biopesticides Production. **Microorganisms**, v. 11, n. 6, p. 1408, 26 maio 2023.

MEENA, R. S. *et al.* Impact of agrochemicals on soil microbiota and management: A review. **Land**, v. 9, n. 2, p. 34, 2020.

MEHTA, Y. R.; MOTOMURA, K. F.; ALMEIDA, W. P. *Corynespora* leaf spot of cotton in Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 131, 2005.

MELLO, F. E. DE *et al.* Resistance of *Corynespora cassiicola* from soybean to QoI and MBC fungicides in Brazil. **Plant Pathology**, v. 71, n. 2, p. 373–385, 5 fev. 2022.

MENDES, M. A. S. **Fungos em plantas no Brasil.** [s.l.] Serviço de Produção de Informação, 1998.

MERZAEVA, O. V.; SHIROKIKH, I. G. Colonization of plant rhizosphere by actinomycetes of different genera. **Microbiology**, v. 75, n. 2, p. 226–230, mar. 2006.

MESQUINI, R. M. **Componentes monocíclicos e quantificação de danos no patossistema *Corynespora cassiicola* - soja.** Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2013.

MEYER, M. C. *et al.* Bioinsumos na cultura da soja. Em: **Embrapa Soja**. 21. ed. Brasília: Embrapa Soja, 2022.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA (MAPA). **BIOINPUTS - Increasing Brazilian Biodiversity**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inovacao/bioinsumos/national-bioinputs-program>>. Acesso em: 30 dez. 2023

MITRA, D. *et al.* Actinobacteria-enhanced plant growth, nutrient acquisition, and crop protection: Advances in soil, plant, and microbial multifactorial interactions. **Pedosphere**, v. 32, n. 1, p. 149–170, fev. 2022.

MOLINA, J. P. E. **Yield losses of soybean due to target spot (*Corynespora cassiicola*) and its genetic and chemical management**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 1 ago. 2018.

MOREIRA, C. C. *et al.* Leishmanicidal, cytotoxic, antimicrobial and enzymatic activities of *Diaporthe* species, a mangrove-isolated endophytic fungus. **African Journal of Microbiology Research**, v. 14, n. 9, p. 516–524, 2020.

MOREIRA, C. C. *et al.* Avaliação in vitro das atividades antimicrobiana, leishmanicida e citotóxica dos fungos endofíticos *Diaporthe* sp. e *Pseudofusicoccum* sp. obtidos das áreas de mangue e cerrado brasileiros. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 6, n. 2, p. 934–950, 16 abr. 2023.

MUTHUSAMY, S. *et al.* Bioconversion and bioethanol production from agro-residues through fermentation process using mangrove-associated actinobacterium *Streptomyces olivaceus* (MSU3). **Biofuels**, v. 10, n. 2, p. 167–179, 4 mar. 2019.

N. RONDON, M.; LAWRENCE, K. The fungal pathogen *Corynespora cassiicola*: A review and insights for target spot management on cotton and Soya bean. **Journal of phytopathology**, v. 169, n. 6, p. 329–338, 2021.

NAING, A. H.; MAUNG, T.; KIM, C. K. The ACC deaminase-producing plant growth-promoting bacteria: influences of bacterial strains and ACC deaminase activities in plant tolerance to abiotic stress. **Physiologia Plantarum**, v. 173, n. 4, p. 1992–2012, 2021.

NARSING RAO, M. P. *et al.* Actinobacteria–plant interactions in alleviating abiotic stress. **Plants**, v. 11, n. 21, p. 2976, 2022.

NAZARI, M. T. *et al.* Using *Streptomyces* spp. as plant growth promoters and biocontrol agents. **Rhizosphere**, v. 27, p. 100741, set. 2023.

NETO, D. C. **Manual de doenças da soja**. [s.l.] Cheminova, 2010.

NOVO, L. A. B. *et al.* Plant growth–promoting rhizobacteria-assisted phytoremediation

of mine soils. Em: **Bio-geotechnologies for mine site rehabilitation**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 281–295.

OLANREWAJU, O. S.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 1–16, 2017.

OLIVE, L. S.; BAIN, D. C.; LEFEBVRE, C. L. A leaf spot of Cowpea and Soybean caused by an undescribed species of *Helminthosporium*. **Phytopathology**, v. 35, n. 10, 1945.

OLIVEIRA, K. C. L. DE *et al.* BIOLOGICAL MANAGEMENT OF *Pratylenchus brachyurus* IN SOYBEAN CROPS. **Revista Caatinga**, v. 32, n. 1, p. 41–51, mar. 2019.

OLIVEIRA, R. R. *et al.* Chlamydospore formation by *Corynespora cassiicola*. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, n. 6, p. 415–418, dez. 2012.

OTTONI, F. P. *et al.* Brazilian mangroves at risk. **Biota Neotropica**, v. 21, n. 2, 2021.

PACIOS-MICHELENA, S. *et al.* Application of *Streptomyces* antimicrobial compounds for the control of phytopathogens. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, p. 696518, 2021.

PALANIYANDI, S. A. *et al.* Biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) in yam by *Streptomyces* sp. MJM5763. **Journal of applied microbiology**, v. 111, n. 2, p. 443–455, 2011.

PALANIYANDI, S. A.; YANG, S. H.; SUH, J.-W. Extracellular proteases from *Streptomyces phaeopurpureus* ExPro138 inhibit spore adhesion, germination and appressorium formation in *Colletotrichum coccodes*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 1, p. 207–217, jul. 2013.

PATRA, J. K.; MOHANTA, Y. K. Antimicrobial compounds from mangrove plants: A pharmaceutical prospective. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 20, n. 4, p. 311–320, 30 abr. 2014.

PAULA, S. DE. **Taxtomina parcialmente purificada e preparações de *Streptomyces scabies* na indução de resistência em soja à *Phakopsora pachyrhizi***; Piracicaba: Universidade de São Paulo, 23 jul. 2019.

PENG, X. *et al.* Identification and field control efficacy of biocontrol actinomycetes against *Heterodera glycines*. **Chinese Journal of Oil Crop Sciences**, v. 39, n. 2, p. 234, 2017.

PRICE, C. L. *et al.* Azole fungicides—understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens. **Pest management science**, v. 71, n. 8, p. 1054–1058, 2015.

PUSPARAJAH, P. *et al.* Whole-Genome Sequence of *Streptomyces pluripotens* strain MUM 16J, a Potential Resource of Glycopeptide Antibiotic and Biocontrol Agent

against Biofilm-forming Bacteria. **Progress In Microbes & Molecular Biology**, v. 6, n. 1, 2 maio 2023.

QI, Y.-X. *et al.* Morphological and molecular analysis of genetic variability within isolates of *Corynespora cassiicola* from different hosts. **European Journal of Plant Pathology**, v. 130, p. 83–95, 2011.

RASHAD, F. M. *et al.* Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial, nematocidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt. **Microbiological Research**, v. 175, p. 34–47, jun. 2015.

RATHORE, A. S. *et al.* Bioprocess Control: Current Progress and Future Perspectives. **Life**, v. 11, n. 6, p. 557, 13 jun. 2021.

RAVENSBERG, W. J. Mass Production and Product Development of a Microbial Pest Control Agent. Em: **A Roadmap to the Successful Development and Commercialization of Microbial Pest Control Products for Control of Arthropods**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011. p. 59–127.

RAYMAEKERS, K. *et al.* Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management – A review. **Biological Control**, v. 144, p. 104240, maio 2020.

REDDY, P. P. Nematode Diseases of Crop Plants: An Overview. Em: **Nematode Diseases of Crops and their Management**. Singapore: Springer Singapore, 2021. p. 3–32.

REIS, B. P. *et al.* First report of *Corynespora cassiicola* causing severe leaf blight on Eucalyptus in Brazil. **New Disease Reports**, v. 29, n. 7, p. 2044–2588, 2014.

RISHAD, K. S. *et al.* Biocontrol potential of Halotolerant bacterial chitinase from high yielding novel *Bacillus pumilus* MCB-7 autochthonous to mangrove ecosystem. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 137, p. 36–41, abr. 2017.

RISTAINO, J. B. *et al.* The persistent threat of emerging plant disease pandemics to global food security. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 23, p. e2022239118, 2021.

ROBLES LÓPEZ, K. *et al.* Diversidad e interacciones biológicas en el ecosistema de manglar. **Revista de Ciencias**, v. 22, n. 2, 13 maio 2019.

RONDON, M. N.; LAWRENCE, K. S. *Corynespora cassiicola* Isolates from Soybean in Alabama Detected with G143A Mutation in the *Cytochrome b* Gene. **Plant Health Progress**, v. 20, n. 4, p. 247–249, 1 jan. 2019.

RUANPANUN, P. *et al.* Nematicidal activity of fervenulin isolated from a nematicidal actinomycete, *Streptomyces* sp. CMU-MH021, on *Meloidogyne incognita*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 1373–1380, 2011.

RUNGIN, S. *et al.* Plant growth enhancing effects by a siderophore-producing endophytic streptomycete isolated from a Thai jasmine rice plant (*Oryza sativa* L. cv.

KDML105). **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 102, p. 463–472, 2012.

SABERI-RISEH, R.; MORADI-POUR, M. A novel encapsulation of *Streptomyces fulvissimus* Uts22 by spray drying and its biocontrol efficiency against *Gaeumannomyces graminis*, the causal agent of take-all disease in wheat. **Pest Management Science**, v. 77, n. 10, p. 4357–4364, 19 out. 2021.

SADEER, N. B.; ZENGİN, G.; MAHOMOODALLY, M. F. Biotechnological applications of mangrove plants and their isolated compounds in medicine-a mechanistic overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 43, n. 3, p. 393–414, 3 abr. 2023.

SADEGHI, A. *et al.* Plant growth promotion and suppression of *Phytophthora drechsleri* damping-off in cucumber by cellulase-producing *Streptomyces*. **BioControl**, v. 62, n. 6, p. 805–819, 10 dez. 2017.

SAIF, S. *et al.* Role of phosphate-solubilizing actinomycetes in plant growth promotion: current perspective. **Phosphate Solubilizing Microorganisms: Principles and Application of Microphos Technology**, p. 137–156, 2014.

SAIMMAI, A. *et al.* Mangrove sediment, a new source of potential biosurfactant-producing bacteria. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1669–1679, 23 dez. 2012.

SALGADO, V. L. Studies on the mode of action of spinosad: insect symptoms and physiological correlates. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 60, n. 2, p. 91–102, 1998.

SALWAN, R.; SHARMA, V. The role of actinobacteria in the production of industrial enzymes. Em: **New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 165–177.

SAMAC, D. A.; KINKEL, L. L. Suppression of the root-lesion nematode (*Pratylenchus penetrans*) in alfalfa (*Medicago sativa*) by *Streptomyces* spp. **Plant and soil**, v. 235, p. 35–44, 2001.

SAMADA, L. H.; TAMBUNAN, U. S. F. Biopesticides as promising alternatives to chemical pesticides: A review of their current and future status. **Online J. Biol. Sci**, v. 20, n. 2, p. 66–76, 2020.

SANI, I. *et al.* A Review of the Biology and Control of Whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), with Special Reference to Biological Control Using Entomopathogenic Fungi. **Insects**, v. 11, n. 9, p. 619, 10 set. 2020.

SANTOS, A. R. B. *et al.* Agentes de biocontrole no manejo de *Meloidogyne incognita* na cultura da soja. **DELOS: DESARROLLO LOCAL SOSTENIBLE**, v. 16, n. 45, p. 1615–1631, 17 ago. 2023.

SANTOS, I. P. DOS *et al.* Ocorrência de mancha alva, causada por *Corynespora cassiicola*, em alface cultivado em hidroponia no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 33, p. 420, 2007.

SAWICKA, B.; EGBUNA, C. Pests of agricultural crops and control measures. Em: **Natural remedies for pest, disease and weed control**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 1–16.

SEBASTIANES, F. L. S. *et al.* 3-Hydroxypropionic Acid as an Antibacterial Agent from Endophytic Fungi *Diaporthe phaseolorum*. **Current Microbiology**, v. 65, n. 5, p. 622–632, 12 nov. 2012.

SEBASTIANES, F. L. S.; DE AZEVEDO, J. L.; LACAVA, P. T. Diversity and Biotechnological Potential of Endophytic Microorganisms Associated with Tropical Mangrove Forests. Em: **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 37–56

SCHNEIDER, K. *et al.* Nocardichelins A and B, siderophores from *Nocardia* strain acta 3026. **Journal of natural products**, v. 70, n. 6, p. 932–935, 2007.

SEGARAN, G. *et al.* A review on endophytic actinomycetes and their applications. **J Chem Pharm Res**, v. 9, n. 10, p. 152–158, 2017.

SHAHID, I. *et al.* Profiling of Metabolites of *Bacillus* spp. and Their Application in Sustainable Plant Growth Promotion and Biocontrol. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, 22 fev. 2021.

SHARMA, M. *et al.* Nematicidal potential of *Streptomyces antibioticus* strain M7 against *Meloidogyne incognita*. **AMB Express**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2019.

SHARMA, S.; KOONER, R.; ARORA, R. Insect pests and crop losses. **Breeding insect resistant crops for sustainable agriculture**, p. 45–66, 2017.

SHIMOMOTO, Y. *et al.* *Corynespora* blight of sweet pepper (*Capsicum annuum*) caused by *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei. **Journal of general plant pathology**, v. 74, p. 335–337, 2008.

SHRIVASTAVA, P. *et al.* Isolation and Characterization of Streptomycetes with Plant Growth Promoting Potential from Mangrove Ecosystem. **Polish Journal of Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 339–349, 31 dez. 2015.

SHRIVASTAVA, P.; KUMAR, R.; YANDIGERI, M. S. In vitro biocontrol activity of halotolerant *Streptomyces aureofaciens* K20: A potent antagonist against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. **Saudi journal of biological sciences**, v. 24, n. 1, p. 192–199, 2017.

SHUTSRIRUNG, A. *et al.* Diversity of endophytic actinomycetes in mandarin grown in northern Thailand, their phytohormone production potential and plant growth promoting activity. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 59, n. 3, p. 322–330, 2013.

SIDDIQUI, Z. A. **PGPR: biocontrol and biofertilization**. [s.l.] Springer, 2006.

SILVA, G. S. DA; RODRIGUES, A. A. C.; SOARES JÚNIOR, A. C. Mancha de *Corynespora* em acerola (*Malpighia glabra*). **Fitopatologia brasileira**, v. 22, n. 3, p. 452, 1997.

SILVA, G. DA C. *et al.* The potential use of actinomycetes as microbials inoculants and biopesticides in agriculture. **Frontiers in Soil Science**, v. 2, 2022.

SILVA, L.; CAMPOS, H. D.; SILVA, J. C. Fortalecida e agressiva. **Revista Cultivar-Grandes Culturas. Ano X (114)**, p. 20–22, 2008.

SILVA, W. P. K. *et al.* RFLP and RAPD analyses in the identification and differentiation of isolates of the leaf spot fungus *Corynespora cassiicola*. **Australian Journal of Botany**, v. 43, n. 6, p. 609–618, 1995.

SINCLAIR, J. B.; BACKMAN, P. A. **Compendium of soybean diseases**. [s.l.] American Phytopathological Society, 1989.

SINGH, D. P. *et al.* Actinomycetes as potential plant growth-promoting microbial communities. Em: **Crop Improvement Through Microbial Biotechnology**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 27–38

SINGH, G.; PAITHANKAR, I. Encapsulation of Biofertilizers, Biopesticides and Biocontrol Agents. Em: SINGH, N. K.; CHATTOPADHYAY, A.; LICHTFOUSE, E. (Eds.). **Sustainable Agriculture Reviews 60: Microbial Processes in Agriculture**. Cham: Springer Nature Switzerland, 2023. p. 121–150.

SINGH, V. K. Nematode Problem in Pulses and Their Management. Em: **Abiotic and Biotic Stress Management in Plants**. London: CRC Press, 2022. p. 165–178.

SINGH, Y. D.; SINGH, M. C.; PANDA, M. K. Biotechnological aspects of mangrove microorganisms. Em: **Biotechnological Utilization of Mangrove Resources**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 381–398.

SMOLIŃSKA, U.; KOWALSKA, B. Biological control of the soil-borne fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* — a review. **Journal of Plant Pathology**, v. 100, n. 1, p. 1–12, 5 abr. 2018.

SOLANS, M. *et al.* Production of phytohormones by root-associated saprophytic actinomycetes isolated from the actinorhizal plant *Ochetophila trinervis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 2195–2202, 2011.

SOUMARE, A. *et al.* Exploiting Biological Nitrogen Fixation: A Route Towards a Sustainable Agriculture. **Plants**, v. 9, n. 8, p. 1011, 11 ago. 2020.

SOUSA, C. DA S.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. DA S. Characterization of streptomycetes with potential to promote plant growth and biocontrol. **Scientia Agricola**, v. 65, n. 1, p. 50–55, fev. 2008.

SOUZA, A. F. *et al.* First report of *Corynespora cassiicola* causing leaf and berry spots on *Coffea canephora* in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 4, n. 1, p. 72–74, 2009.

SOUZA, R. DE; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting

bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and molecular biology**, v. 38, p. 401–419, 2015.

SPALDING, M. **World atlas of mangroves**. [s.l.] Routledge, 2010.

STENBERG, J. A. *et al.* When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. **Journal of Pest Science**, v. 94, n. 3, p. 665–676, 2021.

SUMABAT, L. G.; KEMERAIT JR, R. C.; BREWER, M. T. Phylogenetic diversity and host specialization of *Corynespora cassiicola* responsible for emerging target spot disease of cotton and other crops in the southeastern United States. **Phytopathology**, v. 108, n. 7, p. 892–901, 2018.

SWARNALAKSHMI, K. *et al.* Significance of plant growth promoting rhizobacteria in grain legumes: Growth promotion and crop production. **Plants**, v. 9, n. 11, p. 1596, 2020.

TAECHOWISAN, T.; PEBERDY, J. F.; LUMYONG, S. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 381–385, 2003.

TAILLARDAT, P.; FRIESS, D. A.; LUPASCU, M. Mangrove blue carbon strategies for climate change mitigation are most effective at the national scale. **Biology Letters**, v. 14, n. 10, p. 20180251, 24 out. 2018.

TEIXIDÓ, N.; USALL, J.; TORRES, R. Insight into a Successful Development of Biocontrol Agents: Production, Formulation, Packaging, and Shelf Life as Key Aspects. **Horticulturae**, v. 8, n. 4, p. 305, 4 abr. 2022.

TERAMOTO, A. *et al.* In vitro sensitivity of *Corynespora cassiicola* isolated from soybean to fungicides and field chemical control of target spot. **Summa Phytopathologica**, v. 43, p. 281–289, 2017.

TERRA INVESTIMENTOS. **Soja safra 2023/2024: para onde vai o preço?** Disponível em: <<https://blog.terrainvestimentos.com.br/soja-safra-2023-2024-para-onde-vai-o-preco/>>. Acesso em: 13 jan. 2024.

THATOI, H. *et al.* Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: a review. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 1–19, 2 mar. 2013.

ULLOA, M.; HANLIN, R. T. **Illustrated dictionary of mycology**. [s.l.] APS press, 2000.

ULLOA-OGAZ, A. L.; MUÑOZ-CASTELLANOS, L. N.; NEVÁREZ-MOORILLÓN, G. V. Biocontrol of phytopathogens: antibiotic production as mechanism of control. **The battle against microbial pathogens: basic science, technological advances and educational programs**, v. 1, p. 305–309, 2015.

USDA. **World Agricultural Production**. Disponível em: <<https://usda.library.cornell.edu/concern/publications/5q47rn72z?locale=en&page=4#>>

release-items>. Acesso em: 13 jan. 2024.

USDA. **World Agricultural Production**. Disponível em: <<https://www.fas.usda.gov/data/world-agricultural-production>>. Acesso em: 13 jan. 2024.

VAN BERGEIJK, D. A. *et al.* Ecology and genomics of Actinobacteria: new concepts for natural product discovery. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 10, p. 546–558, 2020.

VENCATO, A. Z. *et al.* Anuário brasileiro da soja 2010. **Santa Cruz do Sul: Ed. Gazeta Santa Cruz**, v. 144, 2010.

VERMA, V. C.; SINGH, S. K.; PRAKASH, S. Bio-control and plant growth promotion potential of siderophore producing endophytic *Streptomyces* from *Azadirachta indica* A. Juss. **Journal of basic microbiology**, v. 51, n. 5, p. 550–556, 2011.

VINOD KUMAR, N.; SUBHA RAJAM, K.; ESTHER RANI, M. Plant Growth Promotion Efficacy of Indole Acetic Acid (IAA) Produced by a Mangrove Associated Fungi-*Trichoderma viride* VKF3. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 11, p. 2692–2701, 20 nov. 2017.

WANG, W. *et al.* Siderophore production by actinobacteria. **Biometals**, v. 27, p. 623–631, 2014.

WARD, R. D. *et al.* Impacts of climate change on mangrove ecosystems: a region by region overview. **Ecosystem Health and Sustainability**, v. 2, n. 4, 19 abr. 2016.

WEI, C. T. **Notes on Corynespora. Mycological papers No. 34**. Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey,, England, , 1950.

WILSON, K. *et al.* A novel formulation technology for baculoviruses protects biopesticide from degradation by ultraviolet radiation. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 13301, 6 ago. 2020.

WU, J. *et al.* Variation of cassiicolin genes among Chinese isolates of *Corynespora cassiicola*. **The Journal of Microbiology**, v. 56, n. 9, p. 634–647, 2018.

WU, Y. *et al.* Subtilisin-involved morphology engineering for improved antibiotic production in actinomycetes. **Biomolecules**, v. 10, n. 6, p. 851, 2020.

YADAV, A. N. *et al.* Actinobacteria from rhizosphere: molecular diversity, distributions, and potential biotechnological applications. Em: **New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 13–41.

YENG, C. M.; PAHIRULZAMAN, K. A. K. **Potential application of actinomycetes as natural fungicide**. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. **Anais...**IOP Publishing, 2021.

ZAMOUM, M. *et al.* Formulation of biofungicides based on *Streptomyces caeruleatus*

strain ZL-2 spores and efficacy against *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato seedlings. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 10, p. 629, 17 out. 2022.

ZENG, Q. *et al.* A new nematicidal compound produced by *Streptomyces albogriseolus* HA10002. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 103, p. 1107–1111, 2013.

ZHAO, S.; DU, C.-M.; TIAN, C.-Y. Suppression of *Fusarium oxysporum* and induced resistance of plants involved in the biocontrol of Cucumber Fusarium Wilt by *Streptomyces bikiniensis* HD-087. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 2919–2927, 2012.

ZHOU, D. *et al.* Biocontrol potential of a newly isolated *Streptomyces* sp. HSL-9B from mangrove forest on postharvest anthracnose of mango fruit caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Food Control**, v. 135, p. 108836, maio 2022.

ZHUANG, W. *et al.* Diversity, function and assembly of mangrove root-associated microbial communities at a continuous fine-scale. **npj Biofilms and Microbiomes**, v. 6, n. 1, p. 52, 12 nov. 2020.

CAPÍTULO 2 - ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E POTENCIAL BIOCONTROLE *IN VIVO* DE *Corynespora cassicola* POR ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DO MANGUE

2.1 INTRODUÇÃO

A cultura da soja desempenha um papel fundamental no agronegócio brasileiro e possui relevância mundial na saúde alimentar. A mancha-alvo, causada pelo fitopatógeno *Corynespora cassicola* é uma das principais doenças com potencial para redução da produtividade na cultura da soja, podendo apresentar perdas de até 42% na produção (EDWARDS MOLINA *et al.*, 2019b). O controle biológico é uma importante ferramenta no manejo de doenças como a mancha-alvo e tem expandido sua relevância por meio da bioprospecção de novos agentes de controle biológico em biomas de alto potencial biotecnológico.

O bioma do mangue é um exemplo de bioma com alto potencial biotecnológico para bioprospecção de microrganismos de aplicação agrícola para promoção de crescimento vegetal e biocontrole (LACAVA; BOGAS; MOREIRA, 2022; SINGH; SINGH; PANDA, 2020; SUKSAARD; PATHOM-AREE; DUANGMAL, 2017; THATOI *et al.*, 2013). Dentre os grupos de microrganismos que apresentam potencial para a aplicação agrícola, as actinobactérias apresentam destaque por sua histórica e inerente característica para produção de biomoléculas de alto valor biotecnológico (GOHAIN *et al.*, 2020), além de seu papel e abundância no solo (MITRA *et al.*, 2022). Nesse sentido, a bioprospecção de actinobactérias do mangue pode ser uma importante estratégia para a descoberta e desenvolvimento de biofungicidas para o controle da mancha-alvo e outras doenças da cultura da soja.

Enzimas líticas são reportadas como importantes biomarcadores para prospecção de agentes de controle biológico para fungos fitopatogênicos. Nesse contexto, um destaque especial é dado para as quitinases e β -1,3-glucanases devido aos seus mecanismos de modificação da parede celular de fitopatógenos, podendo comprometer a síntese, degradar ou realizar a sua lise, comprometendo sua estrutura, funcionalidade e sobrevivência (MISHRA *et al.*, 2020). Um outro marcador importante são os sideróforos, que auxiliam na obtenção de ferro do meio ambiente e na sua disponibilização para as células microbianas, o que pode ter um efeito antagônico sobre fitopatógenos (DEB; TATUNG, 2024). Além de mecanismos envolvidos em biocontrole, o entendimento de mecanismos de promoção vegetal como a produção de substâncias indólicas e solubilização de fosfato inorgânico é imprescindível para a

compreensão de rotas de interação microrganismo-planta (DUCA *et al.*, 2014; SAIF *et al.*, 2014).

Embora as etapas iniciais de descoberta de novos agentes de controle biológico sejam majoritariamente baseadas em quantificação de marcadores em ensaios *in vitro*, a confirmação dos mecanismos em um ambiente relevante, efetivamente, ocorre em investigações *in vivo* ou *in planta*. Especialmente para a mancha-alvo, as condições de ensaio *in vivo* apresentam maior relevância pela alta diversidade genética do patógeno (DIXON *et al.*, 2009), heterogeneidade de suscetibilidade, severidade e impacto na produtividade a depender da variedade (EDWARDS MOLINA *et al.*, 2019b), além da especificidade de condições para ocorrência do ciclo e manifestação da severidade da doença (N. RONDON; LAWRENCE, 2021). DEVI; RAO (2017) reportaram 85,5% de inibição *in vitro* da actinobactéria *Streptomyces* sp. S9 e uma eficiência de controle *in vivo* variando de 78,4% a 80,7% para seus metabólitos purificados. Nesse sentido, a investigação em ambiente relevante é um passo importante no desenvolvimento de biofungicidas baseados em actinobactérias para o controle da mancha-alvo.

Assim, o objetivo desse capítulo foi realizar o isolamento específico de actinobactérias de amostras de sedimento do mangue, avaliar seletivamente o potencial de isolados para o controle de fitopatógenos *in vitro*, realizar etapas de caracterização para enzimas líticas, produção de AIA, sideróforos, solubilização de fósforo e avaliação do potencial dos isolados para realizar o controle *in vivo* de *C. cassiicola* na cultura da soja.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Amostragem de sedimentos do mangue

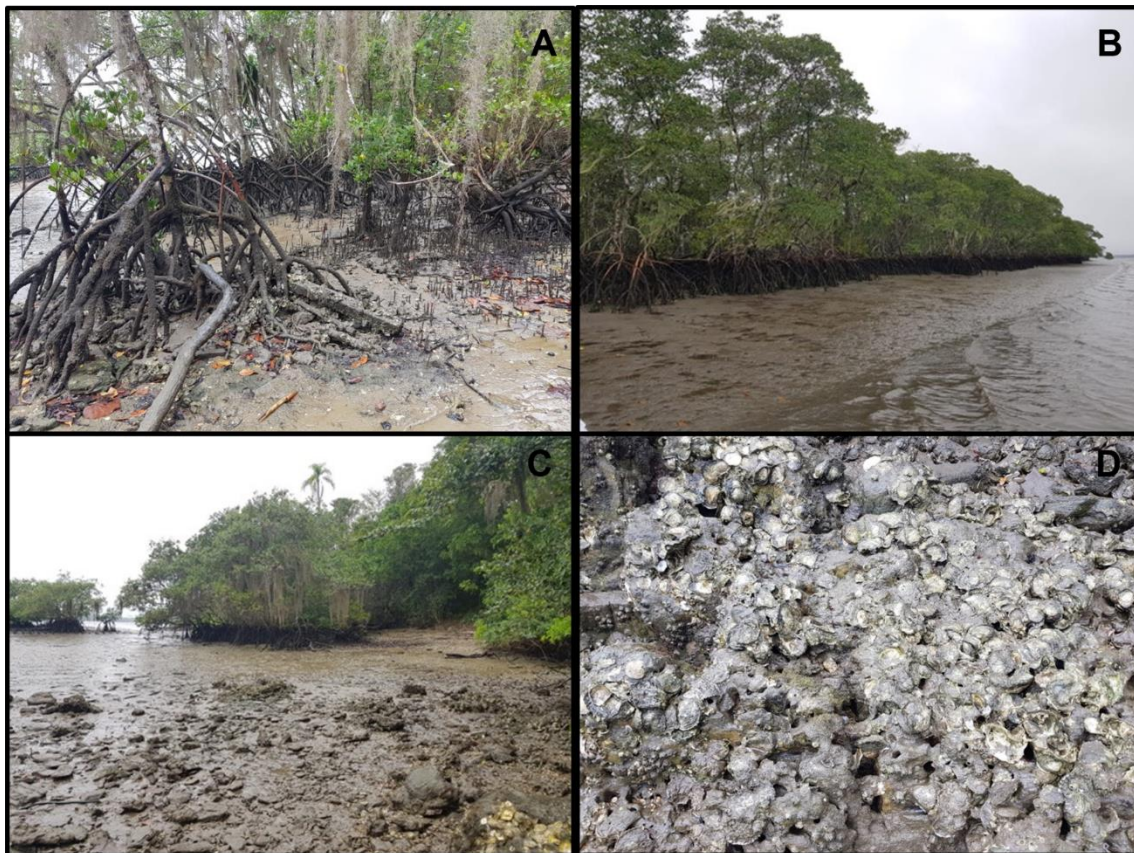
As amostras foram coletadas na área de manguezal da Ilha do Cardoso e Ilha da Casca, município de Cananéia, São Paulo, Brasil. A estratégia de coleta no mangue foi baseada na amostragem da rizosfera de vegetação, de sedimentos e da raspagem de carcaças de animais, conforme detalhado na tabela 3.

Tabela 3. Identificação, local e tipo de amostragem de coleta realizada no mangue

Identificação da amostra	Local	Tipo de amostra
M1	Cananéia	Sedimento de mangue
M3	Ilha da Casca	Sedimento de mangue
M5	Ilha do Cardoso	Raspagem de carcaças
M8	Cananéia	Rizosfera de Mangue-Branco (<i>Laguncularia racemosa</i>)
M10	Ilha da Casca	Raspagem sedimento da filosfera de plantas do mangue

As amostras foram retiradas de sedimentos e da rizosfera de árvores nativas de manguezal (figura 13). De cada planta, coletou-se uma amostra de, aproximadamente, 100 g de sedimento rizosférico de 0 a 15 cm de profundidade. O mesmo padrão de amostragem foi adotado para coleta de sedimentos nas proximidades das plantas. Para amostragem de sedimentos da filosfera e de carcaças de animais, adotou-se uma retirada de, aproximadamente 30g de sedimentos através de raspagem.

Figura 13. Região de coleta de sedimentos de manguezais. **(A)** Ilha do Cardoso. **(B)** e **(C)** Ilha da Casca. **(D)** Sedimento coletado de carcaça de animais na Ilha da Casca.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

Imediatamente após a coleta, as amostras foram acondicionadas em condição refrigerada (gelo seco) por 48h a 72h até que pudessem ser fracionadas para atividades de isolamento em laboratório.

2.2.2 Isolamento de actinobactérias

A estratégia de isolamento consistiu na utilização de meios de cultivo e condições seletivas para isolamento de actinobactérias do gênero *Streptomyces* mas também para bactérias dos gêneros *Amycolatopsis* e *Micromonospora*, conforme tabela 4. Além disso, as amostras foram submetidas a duas tentativas de isolamento.

Na primeira tentativa de isolamento, alíquotas de 10g de cada uma das amostras M1, M3, M5, M8 e M10 foram diluídas em 90mL de tampão PBS e posteriormente submetidas a um tratamento térmico em banho-maria a 60°C por 15 minutos. Após o tratamento térmico, para cada amostra, realizou-se uma diluição seriada até a diluição 1:1000 (v/v) em solução salina-tween 80 (NaCl 0,9% (m/m) +

Tween 80 0,05% (m/m)) e posterior plaqueamento das diluições nos meios de cultivo rafinose, GA e SM3 (tabela 4). As diluições plaqueadas foram incubadas em incubadora Tecnal®, modelo TE-371/240L DBO (demanda biológica de oxigênio) a $28^{\circ}\text{C} \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ por 15 dias. As placas de Petri eram checadas diariamente para verificar o surgimento de colônias e, logo após o surgimento dessas, foram submetidas a sucessivas purificações em meio de cultura ISP-2 (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966) e incubação a $28^{\circ}\text{C} \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ por 15 dias até a obtenção de culturas puras.

Tabela 4. Meios de cultivo utilizados para isolamento de actinobactérias do mangue

Meio de cultivo	Gêneros alvo	Descrição (g.L ⁻¹)		Referência
GA	<i>Micromonospora</i> e <i>Streptomyces</i>	Amido solúvel	20,0	GAUZE (1958)
		KNO ₃	1,00	
		NaCl	3,00	
		K ₂ HPO ₄	0,50	
		MgSO ₄ .7H ₂ O	0,50	
		FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01	
		Ágar	18,00	
		Ácido nalidíxico	10 µg/mL	
		Ciclohexamida	50 µg/mL	
		Nistatina	50 µg/mL	
		pH	7.0 ± 0.2	
Rafinose	<i>Micromonospora</i> e <i>Streptomyces</i>	Rafinose	5,00	Adaptado de LU et al (2019)
		L-histidina	1,00	
		KNO ₃	1,00	
		NaCl	1,00	
		CaCl ₂	2,00	
		K ₂ HPO ₄	1,00	
		MgSO ₄ .7H ₂ O	1,00	
		Ágar	18,00	
		Ácido nalidíxico	10 µg/mL	
		Ciclohexamida	50 µg/mL	
		Nistatina	50 µg/mL	
		pH	7.0 ± 0.2	
		Glicose	10,00	
		Peptona	5,00	

SM3	<i>Amycolatopsis</i> e <i>Streptomyces</i>	Triptona	3,00	Adaptado de TAN; WARD; GOODFELLOW (2006)
		NaCl	5,00	
		Ágar	15,00	
		Ciclohexamida	50 µg/mL	
		Ácido nalidíxico	10 µg/mL	
		Novobiocina	10 µg/mL	
		Nistatina	50 µg/mL	
		pH	7.0 ± 0.2	
		Extrato de malte	10,00	
		Extrato de levedura	4,00	
ISP2	<i>Streptomyces</i>	Cerelose	4,00	Adaptado de SHIRLING; GOTTLIEB (1966)
		Ágar	15,00	
		Ciclohexamida	50 µg/mL	
		Ácido nalidíxico	10 µg/mL	
		Novobiocina	10 µg/mL	
		Nistatina	50 µg/mL	
		pH	7.0 ± 0.2	

Na segunda tentativa de isolamento, alíquotas de 10g de cada uma das amostras M1, M3, M5, M8 e M10 foram diluídas em 90mL de tampão PBS e não foram submetidas ao tratamento térmico. Para cada amostra, realizou-se uma diluição seriada até a diluição 1:100 (v/v) em solução salina-tween 80 (NaCl 0,9% (m/m) + Tween 80 0,05% (m/m)) e posterior plaqueamento das diluições nos meios de cultivo GA e SM3. A todos os meios de cultura utilizados, antibióticos foram adicionados, buscando evitar o desenvolvimento de microrganismos não alvo, conforme detalhado na tabela 4. As condições de cultivo e método de obtenção de culturas puras foi conduzido conforme a primeira tentativa de isolamento.

Os meios de cultura foram escolhidos de forma a conterem diferentes fontes nutricionais, principalmente carbono e nitrogênio, visando obter a maior diversidade de morfotipos possível de bactérias do gênero *Streptomyces*. As colônias foram selecionadas para as etapas de purificação de acordo com sua morfologia, que deveria ter morfologia típica de bactérias do gênero *Streptomyces*, apresentando esporulação ou produção de pigmentos. Após a obtenção das culturas puras, os

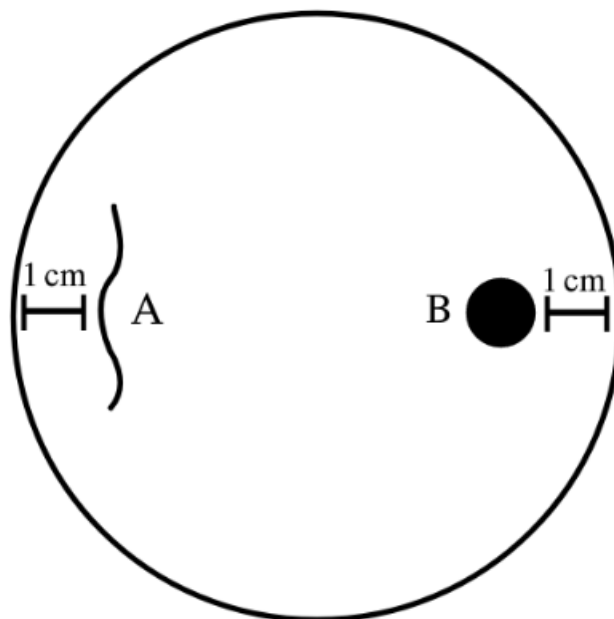
isolados foram preservados em solução de glicerol 10% (v/v) a -80°C em ultracongelador Eppendorf CryoCube F570. Os isolados preservados foram posteriormente caracterizados em relação ao seu potencial para aplicação agrícola.

2.2.3 Atividade fungicida *in vitro*

Baseando-se na diversidade morfológica, 31 isolados foram selecionados para serem avaliados quanto à sua atividade fungicida *in vitro* contra *Corynespora cassiicola* (agente causal da “Mancha-Alvo”), *Rhizoctonia solani* (agente causal da “Podridão Radicular”), *Macrophomina phaseolina* (agente causal da “Podridão de Carvão”), *Sclerotinia sclerotiorum* (agente causal do “Mofo-Branco”) e *Colletotrichum truncatum* (agente causal da “Antracnose”). A escolha dos fitopatógenos foi baseada na relevância e potencial de perda para a cultura da soja, considerando fitopatógenos de parte aérea e fitopatógenos de solo. As linhagens de fungos fitopatogênicos foram obtidas da coleção microbiológica da empresa Agrivalle Brasil Indústria e Comércio de Produtos Agrícolas SA. Para tal, utilizou-se a técnica de co-cultivo com os isolados bacterianos selecionados resultantes do isolamento do mangue (DE MELO; SANHUEZA, 1995).

O teste de antagonismo foi performedo utilizando-se o meio de cultivo sólido BDA, estriando-se uma dispersão de células bacterianas obtida de uma colônia pura previamente cultivada em meio ISP2 a 28°C por 14 dias no lado oposto de um bloco de ágar de 0,4 x 0,4 cm coberto com micélio fúngico em crescimento ativo e incubado a 25°C por 10 dias. Culturas de controle contendo apenas o fungo foram utilizadas para comparar a inibição do crescimento do fungo (figura 14)

Figura 14. Esquema representativo de técnica de co-cultivo para avaliação de atividade antagonista



Retirado de SILVA (2023)

Definiu-se como premissa experimental que as três linhagens com atividade antagônica *in vitro* para *C. cassiicola* e maior espectro de atividade antagônica *in vitro* frente aos demais fitopatógenos seriam selecionadas para a caracterização de alguns marcadores de potencial para promoção do crescimento e biocontrole, além da avaliação do potencial para controle *in vivo* de *C. cassiicola*. Para tais avaliações, as linhagens foram comparadas com *Streptomyces* sp. ACTR8, sendo essa uma linhagem de referência para controle de *C. cassiicola in vitro* oriunda da coleção microbiológica da Agrivalle Brasil Indústria e Comércio de Produtos Agrícolas AS (dados não publicados).

2.2.4 Atividade de quitinase

Os três isolados e *Streptomyces* sp. ACTR8 foram cultivados em meio de crescimento YEPD adaptado (extrato de levedura 10,0 g.L⁻¹, dextrose 10,0 g.L⁻¹, peptona bacteriológica 1,5 g.L⁻¹) em incubadora shaker Infors Multitron Standard® a 28°C, 150 rpm por 7 dias. Em seguida, as células foram removidas por centrifugação a 10.000 rpm e 4°C por 15 minutos em centrífuga Hitachi himac CF-RN. O sobrenadante oriundo da centrifugação dos cultivos foi usado para determinação de quitinase.

A atividade da quitinase foi realizada utilizando o kit de ensaio de quitinase

CS0980 (Sigma-Aldrich). O ensaio do kit é baseado na hidrólise enzimática de substratos de quitinase. Essa hidrólise libera p-nitrofenol (4-nitrofenol), que após ionização em pH básico pode ser medido colorimetricamente a 405 nm. A atividade quitinolítica foi determinada para substratos 4-Nitrofenil N, N'-diacetil- β -D-quitobiosídeo (exoquitinase) e 4-Nitrofenil N-acetil- β -D-glucosaminida (endoquitinase). Uma unidade (U) de quitinase é definida como a quantidade de enzima que libera 1,0 μ mol de p-nitrofenol do substrato apropriado por minuto a pH 4,8 a 37 °C.

2.2.4.1 Solução de parada

Adicionou-se 24mL de água ultrapura ao conteúdo da garrafa de carbonato de cálcio fornecida pelo kit. O conteúdo foi homogeneizado com um agitador magnético até a dissolução completa. A solução de parada foi armazenada em temperatura ambiente.

2.2.4.2 Solução de substratos

Dissolveu-se 1mg de cada um dos substratos apropriados 4-Nitrofenil N, N'-diacetil- β -D-quitobiosídeo e 4-Nitrofenil N-acetil- β -D-glucosaminida em 1mL do tampão de ensaio fornecido pelo kit. A dissolução dos substratos foi realizada incubando as soluções em incubadora shaker a 150 rpm em temperatura ambiente por um período de, aproximadamente, 1 hora. Após a dissolução, a solução foi armazenada em freezer a -20°C e mantida em gelo durante todo o experimento.

2.2.4.3 Enzima quitinase controle

Adicionou-se 5 mL de tampão PBS ao conteúdo do frasco de quitinase fornecido pelo kit para obter uma concentração final de quitinase de 0,2 mg/mL. A dissolução foi realizada em Vortex até obtenção da dissolução completa. Alíquotas de trabalho foram preparadas e armazenadas a -20 °C. Imediatamente antes do uso, as alíquotas de quitinase foram diluídas 20 vezes em tampão PBS e mantidas em gelo durante todo o experimento.

2.2.4.4 Solução padrão

Imediatamente antes do ensaio, diluiu-se 5 μ L da solução de p-nitrofenol 10 mM fornecida pelo kit com 995 μ L de solução de parada. A homogeneização foi realizada brevemente em vortex e armazenada em gelo.

2.2.4.5 Reação enzimática

A hidrólise da quitinase é realizada em ambiente ácido (pH 4,8) a 37 °C, liberando p-nitrofenol. A adição da solução de parada básica causa a ionização do p-nitrofenol para formar o íon p-nitrofenilato amarelo, que possui absorvância medida a 405 nm em espectrofotômetro.

Para tal, a solução dos substratos e a solução padrão foram climatizadas, incubando-as em banho termostático a 37°C por 5 minutos. As reações foram realizadas em microtubos com os seguintes tratamentos: branco (substrato sem enzima) contendo 100 µL de solução do substrato, padrão contendo 300 µL de solução padrão, controle positivo (quitinase padrão fornecida pelo kit) contendo 90 µL de solução do substrato + 10 µL da enzima quitinase controle e amostras teste (sobrenadantes de cultivos) contendo 90 µL de solução do substrato + 10 µL do sobrenadante dos cultivos dos microrganismos avaliados.

Todas as reações foram preparadas em triplicata e os tubos foram incubados em banho termostático por 30 minutos a 37°C. A reação foi interrompida adicionando-se 200µL de parada para cada tubo, exceto para o tratamento padrão. Após a adição da solução de parada, os tubos de reação adquiriram uma coloração amarelada.

A absorvância das amostras foi mensurada a 405 nm em espectrofotômetro Shimadzu UV-1900i em até 30 minutos após o fim da reação. O cálculo da atividade enzimática foi obtido através da equação 1.

$$\frac{U}{mL} = \frac{(A_{405} \text{ amostra} - A_{405} \text{ branco}) \times 0,05 \times 0,3 \times FD}{A_{405} \text{ padrão} \times \text{tempo} \times V_{enz}} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

A₄₀₅ amostra: absorvância aferida do tratamento amostra

A₄₀₅ branco: absorvância aferida do tratamento branco

0,05: µmol/mL de p-nitrofenol na solução padrão

0,3: volume final do tubo de reação após a adição da solução de parada (mL)

FD: fator de diluição da enzima quitinase original ou amostra teste

A₄₀₅ padrão: absorvância aferida do tratamento padrão

tempo: tempo de reação (minutos)

V_{enz}: volume da amostra (mL)

2.2.5 Atividade de β-1,3-Glucanase

Os três isolados e *Streptomyces* sp. ACTR8 foram avaliados quanto ao seu

potencial de produção da enzima β -1,3-glucanase.

2.2.5.1 Cultivo das bactérias

As bactérias foram primeiramente pré-inoculadas em 10mL de meio basal contendo laminarina ($2,0 \text{ g.L}^{-1}$), K_2HPO_4 (1 g.L^{-1}), NaNO_3 (3 g.L^{-1}), KCl ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$), MgSO_4 ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$) e FeSO_4 ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$) e incubadas em agitadora shaker a 28°C e 150 rpm por 4 dias. Após esse período, as culturas foram transferidas para frascos Erlenmeyer contendo 250 mL do mesmo meio de cultivo e incubadas nas mesmas condições por 72h. Após esse período, o sobrenadante das culturas foi obtido por centrifugação a 10.000 rpm a 4°C por 15 minutos e esse foi utilizado para a reação enzimática e investigação da β -1,3-glucanase.

2.2.5.2 Preparo do reagente DNS

Dissolveu-se 10g de ácido dinitrosalicílico (DNS) em 200 mililitros de hidróxido de sódio 2M (NaOH). A mistura foi aquecida a 70°C para garantir a completa dissolução. Paralelamente, 300g de tartarato de sódio e potássio (Sal de Rochelle) foram dispersos em 500 mL de água destilada. A solução de ácido dinitrosalicílico foi então combinada com a solução de tartarato de sódio e potássio e transferida para um balão volumétrico, onde o volume final de 1000 mL foi alcançado com água destilada. O composto resultante foi armazenado em um recipiente âmbar, protegido da luz, até o momento de utilização(VASCONCELOS; PINTO; DE ARAGÃO, 2013).

2.2.5.3 Construção de curva padrão

Para preparar a curva padrão, 0,04 gramas de glicose foram pesados e dissolvidos em 100 mL de água destilada, resultando em uma solução estoque de $400 \mu\text{g/mL}$. Posteriormente, foram realizadas diluições em série para obter soluções com concentrações de 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 e $50 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Em seguida, cada solução foi submetida à reação com o reagente DNS, seguindo o mesmo procedimento utilizado na reação enzimática (item 3.2.5.3). A curva padrão foi então construída utilizando o software UV Probe.

2.2.5.3 Reação enzimática

Uma alíquota de 500 μL do sobrenadante dos cultivos foi adicionada em microtubos preenchidos com 500 μL de tampão acetato de sódio (pH 5.5) 100mM,

contendo 0,2% de laminarina (m/v). Posteriormente, os microtubos foram incubados em banho termostático a 50°C por 60 minutos. A reação foi terminada fervendo-se os tubos de reação a 100°C por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 2 mL de DNS por tubo e ferveu-se por 10 minutos. A absorbância foi aferida no comprimento de onda 540 nm e a concentração de glicose obtida através da curva padrão obtida (WU *et al.*, 2018b).

Os valores de atividade foram expressos em Unidades.mL⁻¹ (U.mL⁻¹), obtidos de acordo com a equação 2 de modo que uma Unidade representa 1µmol de glicose liberada por minuto na reação.

$$U. mL^{-1} = \frac{C \times V_t}{T \times V_e \times V_c} \text{ (Equação 2)}$$

Onde:

C = concentração determinada pela equação da curva padrão (µmol/mL⁻¹)

V_t = volume total da reação enzimática (mL)

T = tempo da reação enzimática (min)

V_e = volume do sobrenadante (mL)

V_c = volume da reação colorimétrica (mL)

2.2.6 Produção de sideróforos

A produção de sideróforos foi avaliada pelo ensaio líquido Chrome Azurol S (CAS) adaptado, descrito por SCHWYN; NEILANDS (1987). Nesse método, é utilizado um complexo corante-ferro colorido de modo que, quando um ligante forte sequestra e complexa o ferro, o corante é liberado, causando a mudança de cor. O corante é o cromoazurol (CAS) e o ligante pode ser um ou mais sideróforos produzidos pelas bactérias.

2.2.6.1 Solução de cromoazurol S (CAS)

Para o preparo da solução indicadora de cromo azurol S (CAS), adicionou-se 6mL da solução de HDTMA 10mM e uma pequena quantidade de água deionizada em um balão volumétrico de 100mL. Em seguida, adicionou-se lentamente, sob agitação, 1,5mL da solução férrica (FeCl₃·6H₂O 1 mM e HCl 0,01N) e 7,5 mL de uma solução aquosa de cromo azurol S 2 mM. Separadamente, dissolveu-se 4,307 g de piperazina anidra em, aproximadamente, 20 mL de água deionizada e adicionou-se

6,25 mL de HCl (solução tampão).

Essa solução tampão (pH=5,6) foi então transferida para o balão volumétrico contendo os demais reagentes e o volume foi completado para 100 mL com água deionizada.

2.2.6.2 Quantificação de sideróforos

Todas as vidrarias utilizadas no experimento foram previamente tratadas com HCl 6M. As linhagens foram cultivadas em meio de cultura MM9 modificado depletado de ferro, conforme descrito por MURUGAPPAN; ARAVINTH; KARTHIKEYAN (2011) e incubadas por 3 dias a 150 rpm e 28°C. Posteriormente, as células foram removidas por centrifugação a 10.000 rpm e 4°C por 10 minutos para obtenção do sobrenadante dos cultivos.

Após a obtenção do sobrenadante, as reações foram preparadas em triplicata, misturando-se 500 µL do sobrenadante dos cultivos com 500 µL do reagente CAS, seguido da adição de 10 µL de uma solução de ácido sulfossalicílico 0,2 M e deixando reagir por 1h. Após a reação, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro Shimadzu UV-1900i em comprimento de onda de 630 nm e água destilada como branco. Os valores foram comparados com uma curva padrão de sal mesilato de deferoxamina (DMS) para obtenção dos valores de sideróforos em µM.

2.2.7 Produção de substâncias indólicas

2.2.7.1 Preparo do reagente de Salkowski

A determinação da produção de ácido indol-3-acético (AIA) foi realizada conforme adaptação do método colorimétrico descrito por GORDON; WEBER (1951). Inicialmente, o reagente de Salkowski foi preparado pela adição de 10 mL de uma solução 0,5 M de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a uma solução previamente composta por 250 mL de ácido perclórico (HClO_4) a 70% e 200 mL de água deionizada. Essa combinação foi feita em um balão volumétrico de 500 mL, ajustando-se o volume final conforme necessário. O reagente foi então transferido para um recipiente âmbar para armazenamento até ser utilizado.

2.2.7.2 Construção da curva padrão

A curva de calibração foi gerada utilizando ácido indol-3-acético (AIA)

comercial. Para isso, 50 mg de AIA foram dissolvidos em 50 mL de água deionizada, resultando em uma solução estoque de concentração 1 g/L. A partir dessa solução, foram feitas diluições para obter concentrações de 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 8.0, 16, 32 e 64 µg/mL. Cada tubo contendo as soluções de concentrações conhecidas foi então submetido a uma reação colorimétrica com o reagente de Salkowski na proporção de 2:1 (reagente e amostra). Os tubos foram deixados em repouso no escuro por 30 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, em triplicata, a absorbância das amostras foi aferida em espectrofotômetro Shimadzu UV-1900i a um comprimento de onda de 530 nm. A curva de calibração foi gerada utilizando o software UV Probe

2.2.7.3 Cultivo dos isolados e reação

Os três isolados e *Streptomyces* sp. ACTR8 foram inoculados em 10 mL de meio TSB (Tryptic Soy Broth) 10% suplementado com 5 mM de L-triptofano, em triplicata. Os cultivos foram incubados a 28 °C, sob agitação de 150 rpm, por 5 dias. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm a 4°C por 10 minutos. A quantidade de ácido indol-3-acético (AIA) produzido foi estimada pela combinação de 1 mL do reagente de Salkowski com 500 µL do sobrenadante dos cultivos, seguida de incubação por 30 minutos no escuro. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro Shimadzu UV-1900i a um comprimento de onda de 530 nm. A concentração de AIA produzido (em µg/mL) foi determinada utilizando a equação obtida na curva de calibração (item 2.2.7.2).

2.2.8 Solubilização de fosfato inorgânico

Foi realizada uma avaliação qualitativa da capacidade dos isolados em solubilizar fosfato inorgânico, mediante o crescimento bacteriano em meio de cultivo sólido NBRIP (*National Botanical Research Institutes Phosphate*) (glicose 10,0 g.L⁻¹, Ca₂(PO₄)₂ 5,0 g.L⁻¹, MgCl₂ 5,0 g.L⁻¹, MgSO₄ 0,25 g.L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 0.1 g.L⁻¹ e ágar 15,0 g.L⁻¹). Cada um dos três isolados foi inoculado no centro da placa, em triplicata, utilizando-se uma alça de inoculação e uma cultura em meio sólido pré-existente. As placas foram então incubadas a 28 °C por 7 dias.

Após o período de incubação, foi medida a extensão do diâmetro da colônia bacteriana, bem como do halo transparente formado ao seu redor. Em seguida, o índice de solubilização de fosfato (PSI) foi calculado, conforme descrito por NWANYANWU; UMEH; SAPELE (2015).

2.2.9 Controle de *Corynespora cassiicola* *in vivo*

Três isolados selecionados na etapa de antagonismo e caracterizadas *in vitro* e a cepa de referência *Streptomyces* sp. isolado ACTR8 foram avaliados quanto ao seu potencial de controle da mancha-alvo em ensaios *in vivo*. A eficiência de controle e potencial de fitotoxicidade de cultivos dos isolados foram comparadas ao do Biofungicida Twixx, biofungicida comercialmente disponível para controle *C. cassiicola*.

2.2.9.1 Preparo das amostras

O tratamento controle adotado foi água destilada e Tween 20. Os isolados foram cultivados em meio de cultura ISP-2 (glicose 4,0 g.L⁻¹, extrato de levedura 4,0 g.L⁻¹, extrato de malte 10,0 g.L⁻¹) por 7 dias a 28°C e 150 rpm. Após o cultivo, a concentração final das amostras foi padronizada para 1,0 x 10⁷ UFC.mL⁻¹. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 12 repetições e os tratamentos descritos na tabela 5.

Tabela 5. Descrição e concentrações dos tratamentos utilizados para avaliação do controle *in vivo* de *C. cassiicola*

Tratamento	Composição	Concentração (UFC.mL ⁻¹)
Controle	Água destilada + Tween 20	-
Twixx	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , cepa CPQBA 040-11DRM01	1,0 x 10 ⁹
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , cepa CPQBA 040-11DRM04	
ACTR8	<i>Streptomyces</i> sp. ACTR8	1,0 x 10 ⁷
Isolado	Isolado	1,0 x 10 ⁷
Isolado	Isolado	1,0 x 10 ⁷
Isolado	Isolado	1,0 x 10 ⁷

2.2.9.2 Isolamento do fitopatógeno e preparo do inóculo

O isolado de *C. cassiicola* utilizado neste estudo para a inoculação foi obtido de folhas de soja sintomáticas da mancha-alvo do estado do Mato Grosso. Para o isolamento do fungo, folhas com sintomas foram cortadas e, em seguida, depositadas por 30 segundos em etanol 70% (v/v), desinfestadas em hipoclorito de sódio 1% (v/v) por 1 minuto e lavadas com água destilada esterilizada. Na sequência, foram

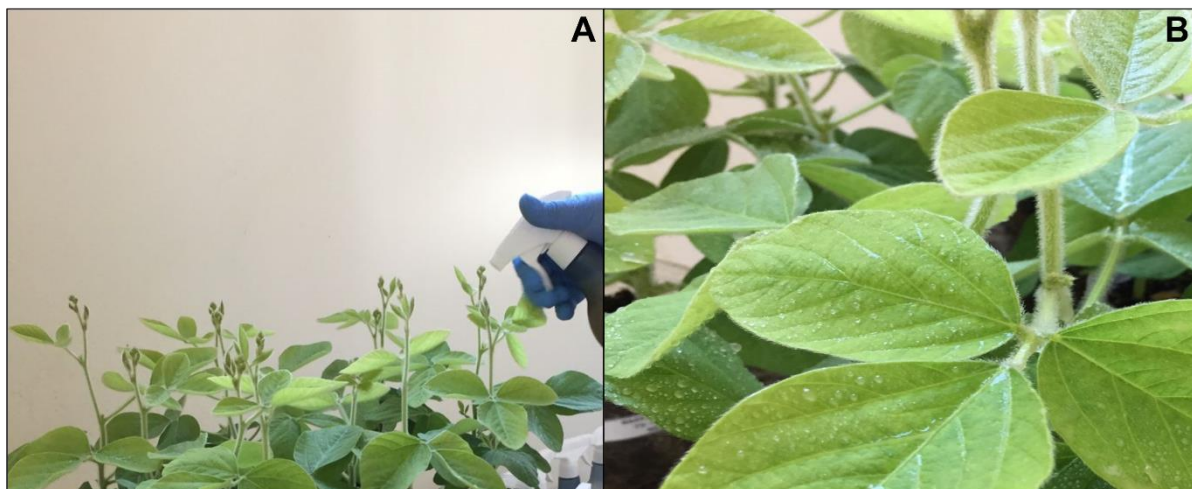
transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e mantidas em câmara de crescimento com temperatura $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas até o surgimento das estruturas do fungo. Posteriormente, o fungo foi transferido para ágar suco V8 (ágar $20,0\text{ g.L}^{-1}$, sacarose 1 g.L^{-1} , carbonato de cálcio $0,6\text{ g.L}^{-1}$, extrato de levedura $0,2\text{ g.L}^{-1}$ e 40 mL.L^{-1} de suco V8) (ALFENAS, 2007) e incubado por 15 dias a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, até o surgimento dos conídios. Na sequência obteve-se a cultura pura através de cultivo “monospórico” em meio suco V8 a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e, após 15 dias, procedeu-se o preparo da suspensão de conídios para a inoculação das plantas de soja (figura 16). A concentração de conídios do fitopatógeno na solução foi ajustada para $5,0 \times 10^4$ conídios. mL^{-1} e uma gota do tensoativo Tween 20 foi utilizada na suspensão para melhorar a distribuição do inóculo.

2.2.9.3 Plantio, inoculação e ensaio *in vivo*

Plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.); cultivar BMX Potência RR, ciclo médio, hábito de crescimento indeterminado, grupo de maturação 6,7, foram cultivadas em vasos plásticos com capacidade de 500 mL, com duas plantas por vaso, contendo mistura de solo e substrato 1:1 (m/m). Após a emergência das plantas foi realizado o desbaste, mantendo-se duas mudas por recipiente. No estágio vegetativo V4 – terceiro trevo expandido (FEHR *et al.*, 1971) - foram aplicados os tratamentos (figura 15) e, 24 horas depois, o fungo foi inoculado por pulverização dos folíolos até o ponto de escorrimento superficial (figura 15). Durante todo o ensaio, as plantas foram cultivadas em câmara de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas (Figura 16) O tratamento controle recebeu apenas pulverização com água destilada e Tween 20.

Antes da inoculação do fungo nas plantas de soja, foram contados os conídios presentes na suspensão, ajustando a concentração de conídios do fungo para $5,0 \times 10^4$ conídios. mL^{-1} . Para a inoculação do fungo por pulverização nas plantas de soja, utilizou-se uma gota de espalhador adesivo Tween 20 juntamente com a suspensão de conídios para melhorar a distribuição do inóculo.

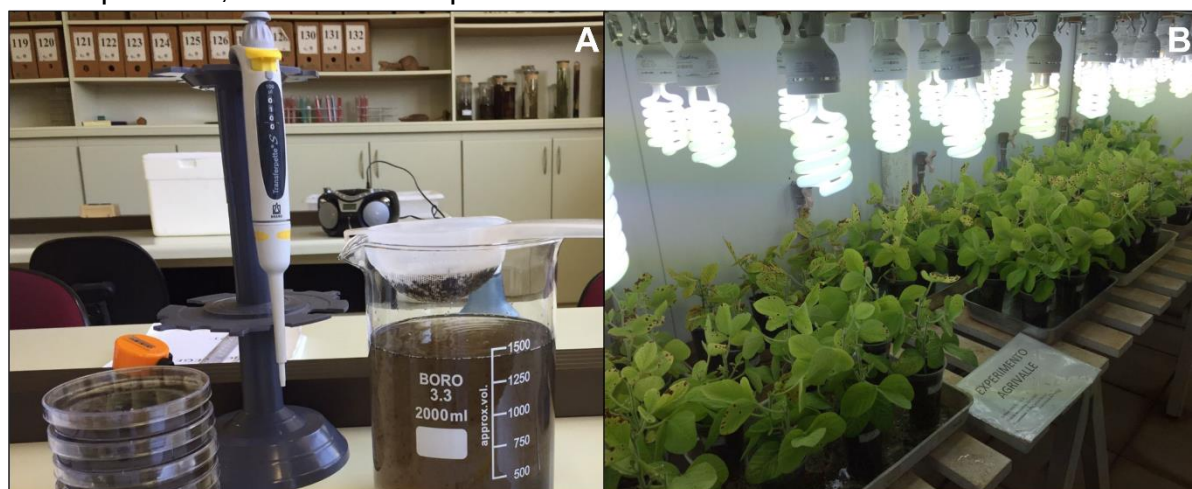
Figura 15. (A) Pulverização dos tratamentos nas plantas. **(B)** Aplicação do inóculo até o ponto de escoamento superficial



Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara de crescimento e, posteriormente, em câmara úmida por um período de 48 horas, utilizando sacos plásticos transparentes. Os sacos plásticos foram retirados das plantas e essas foram transferidas para câmaras de nebulização contendo aspersor, recebendo umedecimento foliar por 1 minuto em intervalos de 8 horas, permanecendo por um período de 20 horas de molhamento foliar, visando manter as condições de umidade para infecção e desenvolvimento da doença. Posteriormente, as plantas foram observadas diariamente até o aparecimento dos sintomas.

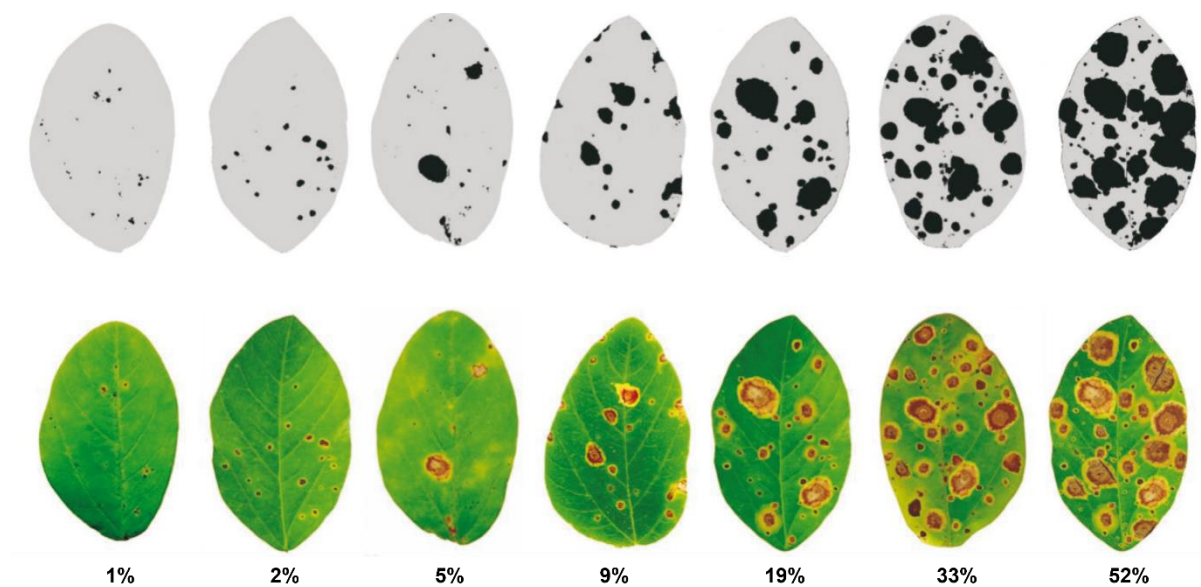
Figura 16. (A) Preparo da suspensão de conídios de *Corynespora cassiicola* para inoculação em soja. **(B)** Ensaio conduzido em câmara de crescimento com controle de temperatura, umidade e fotoperíodo.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

A severidade da doença foi avaliada no folíolo central de doze plantas de soja aos 15, 20, 25 e 30 dias após a inoculação do fungo, conforme escala diagramática descrita por SOARES; GODOY; OLIVEIRA (2009) (figura 17). A severidade refere-se à porcentagem de tecido atacado pela doença em relação à área total do folheto.

Figura 17. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha-alvo da soja



Fonte: Retirado de SOARES; GODOY; OLIVEIRA (2009)

A partir dos valores de severidade, foi calculada a Área Abaixo à Curva de Progresso da Doença (AACPD) conforme RIBEIRO; JUNIOR; ZAMBOLIM (2004). Essa área representa a quantidade total de doenças ocorridas durante o ciclo da cultura, conforme equação 3. A eficiência de controle (CE) foi calculada utilizando a equação descrita por ABBOTT (1925).

$$AACPD = \sum \left[\frac{(St + St-1)}{2} \times \Delta t \right] \text{ (Equação 3)}$$

Onde:

St: intensidade da doença no tempo t

St-1: é a intensidade da doença no tempo t-1

Δt: intervalo de tempo (dias)

A fitotoxicidade foliar foi avaliada de acordo com a escala de FRANS (1986) aos 3, 7, 10, 14 e 21 dias após a aplicação do tratamento.

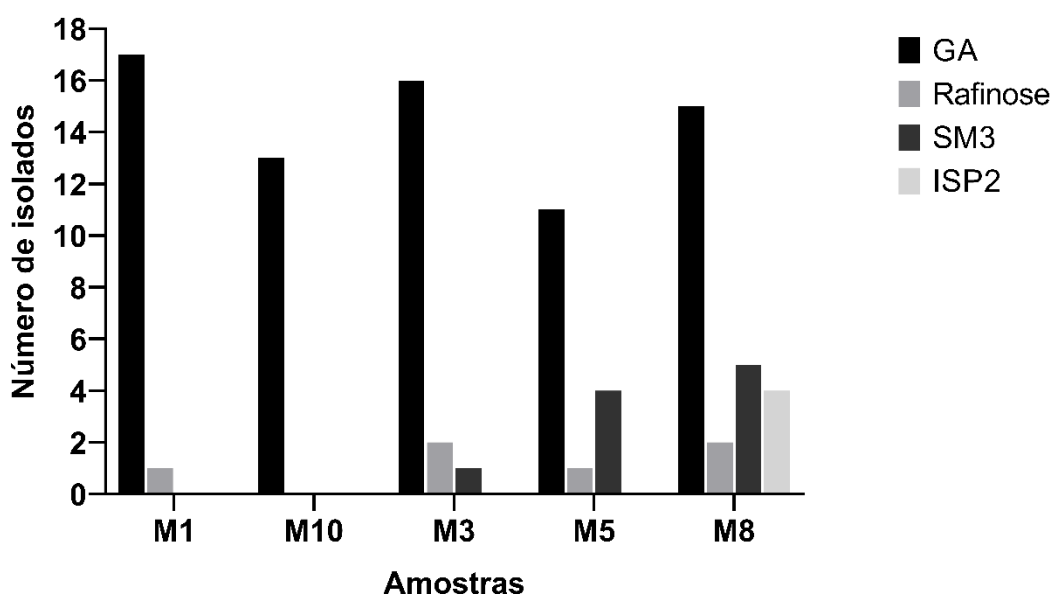
Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro, utilizando o programa computacional RStudio versão 1.2.5033 (R CORE TEAM, 2013).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Amostragem e isolamento de actinobactérias do mangue

A estratégia de isolamento resultou em 92 bactérias isoladas, purificadas e preservadas. O isolamento da amostra M8 (Rizosfera de Mangue-Branco) apresentou o maior número de isolados (26), seguido das amostras M3, M1, M5 e M10 que apresentaram 19, 18, 16 e 13 isolados, respectivamente (Figura 18).

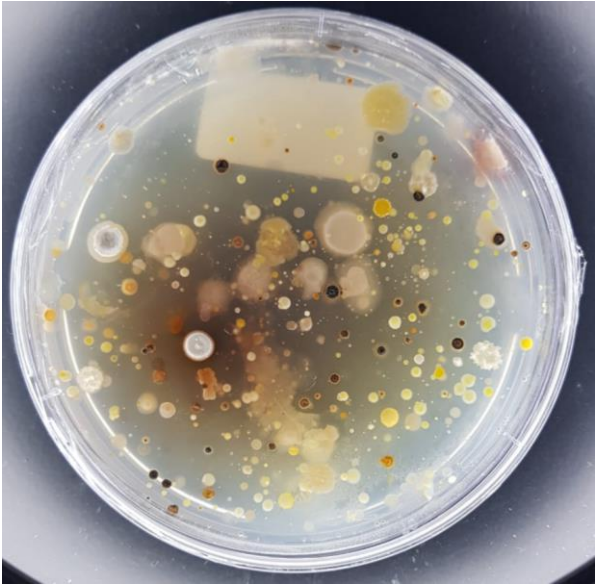
Figura 18. Número de isolados obtidos por amostra nos meios de cultura GA, rafinose, SM3 e ISP2



Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

Em relação aos meios de cultura, o meio GA apresentou o maior número de isolados obtidos entre todas as amostras (72) seguido dos meios de cultura SM3, Rafinose e ISP2 que apresentaram 10, 6 e 4 isolados, respectivamente. Uma grande diversidade morfológica de colônias foi observada em alguns dos meios e condições de isolamento conduzidas (figura 19).

Figura 19. Diversidade de morfotipos obtidos em condição de isolamento de actinobactérias



Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

2.3.2 Atividade fungicida *in vitro*

Os resultados dos testes de antagonismo contra fungos fitopatogênicos estão expressos na tabela 6.

Tabela 6. Atividade antagonista *in vitro* de isolados contra fitopatógenos

Isolado	Amostra	Atividade antagonista				
		<i>C. cassiicola</i>	<i>M. phaseolina</i>	<i>R. solani</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>C. truncatum</i>
MG04*	M8	+	+	+	+	+
MG30	M8	+	+	+	+	-
MG45	M3	+	+	+	+	-
MG61	M1	-	+	-	-	-
MG69*	M8	+	+	+	+	+
MG114	M3	+	-	-	+	-
MG86	M10	+	+	+	+	-
MG26*	M3	+	+	+	+	+
MG107	M1	+	+	+	+	-
MG119	M8	+	+	+	+	-
MG34	M1	-	+	-	-	+
MG08	M5	+	+	+	+	-
MG35	M5	+	+	+	+	-
MG36	M8	+	+	+	+	-
MG312	M1	+	-	-	+	+
MG25	M5	+	+	-	+	+
MG38	M1	+	-	-	+	+
MG12	M1	-	+	-	-	-
MG62	M1	-	+	-	+	+
MG27	M3	+	+	+	+	-

MG40	M3	+	+	+	+	-
MG28	M3	+	+	+	+	-
MG83	M3	+	-	-	-	-
MG31	M1	+	-	-	-	-
MG32	M1	-	+	-	-	-
MG19	M10	+	-	-	+	+
MG104	M10	+	-	-	-	+
MG87	M10	+	+	+	-	+
MG132	M8	+	+	+	+	-
MG24	M8	+	+	-	+	+
MG112	M3	-	-	-	-	-

+: Atividade antagonista positiva ao fitopatógeno

-: Ausência de atividade antagonista ao fitopatógeno

*: Isolados que apresentaram atividade antagonista frente a todos os fitopatógenos testados

Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

Dos 31 isolados avaliados, todos apresentaram atividade antagonista frente a pelo menos um dos fitopatógenos testados. Desses, 25 isolados (81%) apresentaram atividade antagonista frente a *Corynespora cassiicola*, 23 isolados (74%) apresentaram atividade antagonista frente a *Macrophomina phaseolina*, 22 isolados (71%) apresentaram atividade antagonista frente a *Sclerotinia sclerotiorum*, 16 isolados (52%) apresentaram atividade antagonista frente a *Rhizoctonia solani* e 12 isolados (39%) apresentaram atividade antagonista frente a *Colletotrichum truncatum*. Apesar do amplo percentual de isolados capazes de apresentar atividade antagonista a cada um dos fitopatógenos, dos isolados testados, somente 3 isolados (9,7%) apresentaram espectro de atividade antagonista para *C. cassiicola* (Figura 20) e todos os demais os fitopatógenos testados, sendo os isolados MG04, MG69 e MG26. Esses isolados (MG04, MG69 e MG26) foram selecionados para demais etapas de caracterização.

Figura 20. Ensaio de atividade antagonista *in vitro* dos isolados MG26, MG04 e MG69 para *Corynespora cassiicola*

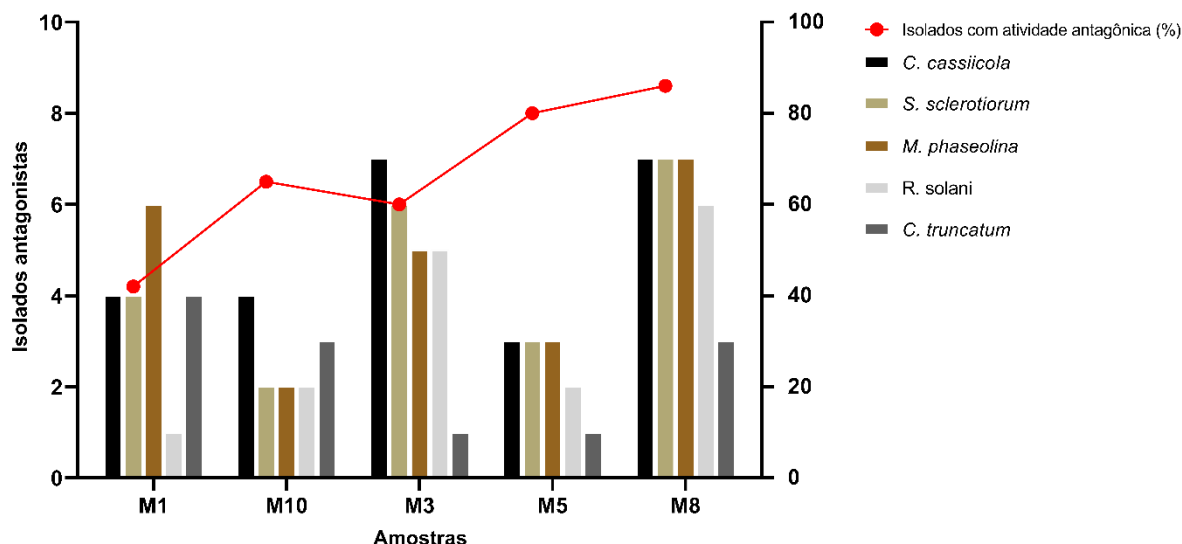


Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

Dos isolados selecionados para o ensaio de antagonismo, 9 isolados eram originários da amostra M1, 8 isolados eram originários da amostra M3, 7 isolados eram originários da amostra M8, 4 isolados eram originários da amostra M10 e 3 oriundos da amostra M3 (Figura 20). Em relação à distribuição do potencial antagonista por origem de isolamento, a amostra M8 apresentou o maior potencial, com 86% dos isolados apresentando atividade antagonista positiva aos fitopatógenos testados, seguido das amostras M5, M10, M3, e M1 que apresentaram percentuais de 80%, 65%, 60% e 42%, respectivamente (Figura 21). A amostra M8 também foi predominante no que tange ao maior número de isolados antagonistas para *S. sclerotiorum*, *M. phaseolina* e *R. solani* e, juntamente à amostra M3, foi também predominante no número de isolados antagonistas para *C. cassiicola*. A amostra M1 foi

predominante no que tange ao número de isolados antagonistas para *C. truncatum*.

Figura 21. Número total e percentual de isolados antagonistas a fitopatógenos em diferentes amostras de isolamento

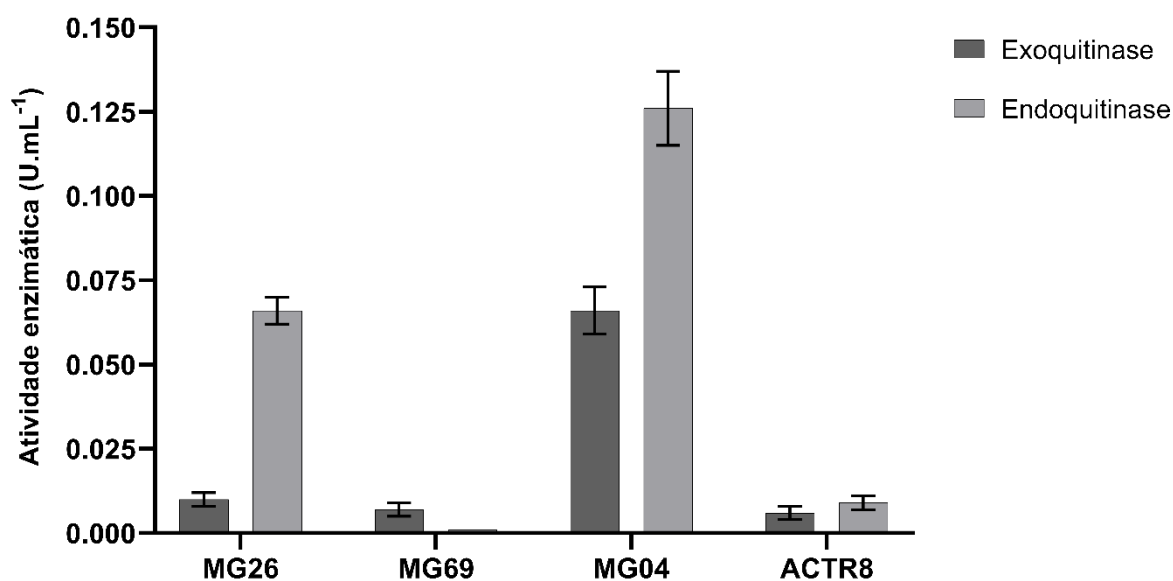


Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

2.3.3 Atividade de quitinase

Todos os isolados avaliados apresentaram atividade de endoquitinase e exoquitinase, com exceção do isolado MG069, que não apresentou atividade de endoquitinase (Figura 22).

Figura 22. Atividade de endoquitinase e exoquitinase de *Streptomyces* sp. ACTR8 e dos isolados MG26, MG69 e MG04



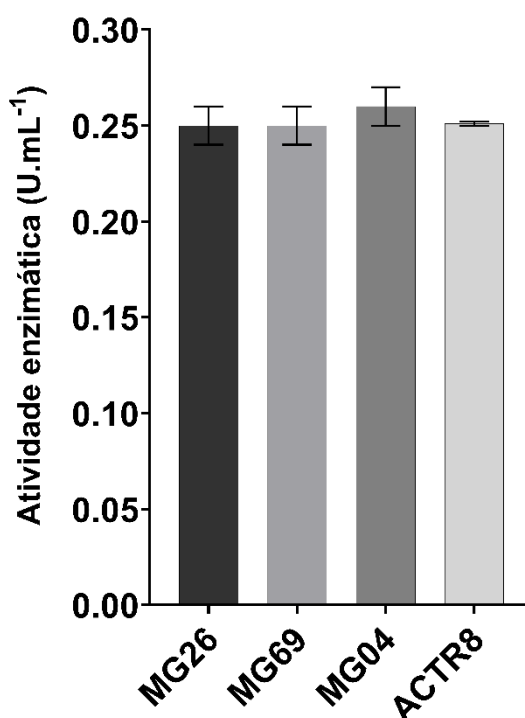
Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

O isolado MG04 apresentou o maior valor de atividade de endoquitinase ($0,126 \pm 0,011 \text{ U.mL}^{-1}$) seguido dos isolados MG26 ($0,066 \pm 0,004 \text{ U.mL}^{-1}$) e de *Streptomyces sp.* ACTR8 ($0,090 \pm 0,002 \text{ U.mL}^{-1}$). O isolado MG04 também apresentou o maior valor de atividade de exoquitinase ($0,066 \pm 0,002 \text{ U.mL}^{-1}$), seguido dos isolados MG26 ($0,010 \pm 0,002 \text{ U.mL}^{-1}$), MG69 ($0,007 \pm 0,002 \text{ U.mL}^{-1}$) e *Streptomyces sp.* ACTR8 ($0,006 \pm 0,004 \text{ U.mL}^{-1}$).

2.3.4 Atividade de β -1,3-glucanase

Os valores de atividade enzimática aferidos para os microrganismos testados estão representados na Figura 23.

Figura 23. Atividade de β -1,3-endoglucanase de *Streptomyces sp.* ACTR8 e dos isolados MG26, MG69 e MG04



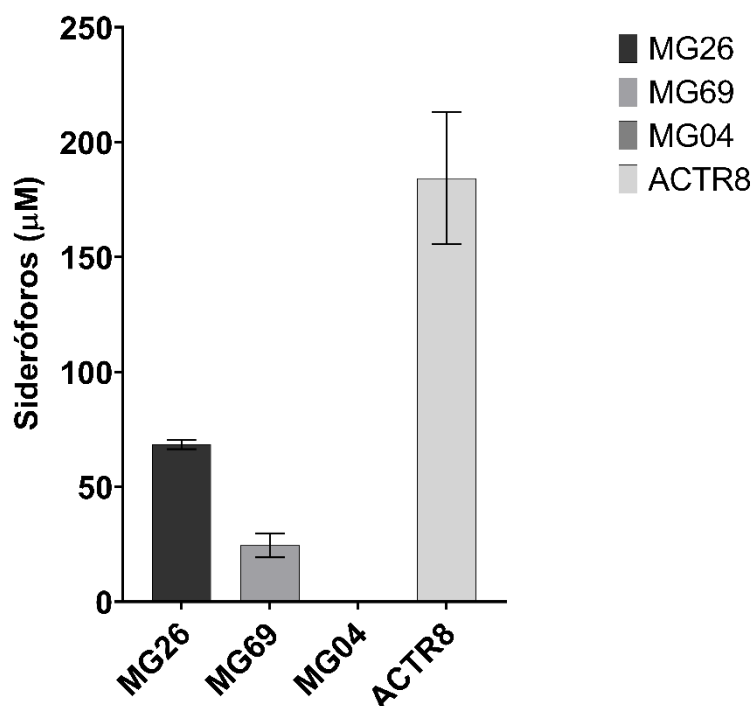
Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

Todas as bactérias avaliadas apresentaram valores de atividade enzimática para β -1,3-endoglucanase muito próximos com valores de $0,26 \pm 0,1 \text{ U.mL}^{-1}$ para o isolado MG04, de $0,25 \pm 0,1 \text{ U.mL}^{-1}$ para os isolados MG26 e MG69 e de $0,25 \pm 0$ para *Streptomyces sp.* ACTR8.

2.3.5 Produção de sideróforos

Os valores obtidos na investigação da produção de sideróforos pelos isolados estão representados na Figura 24.

Figura 24. Resultados da avaliação quantitativa da produção de sideróforos por *Streptomyces* sp. ACTR8 e isolados MG26, MG69 e MG04



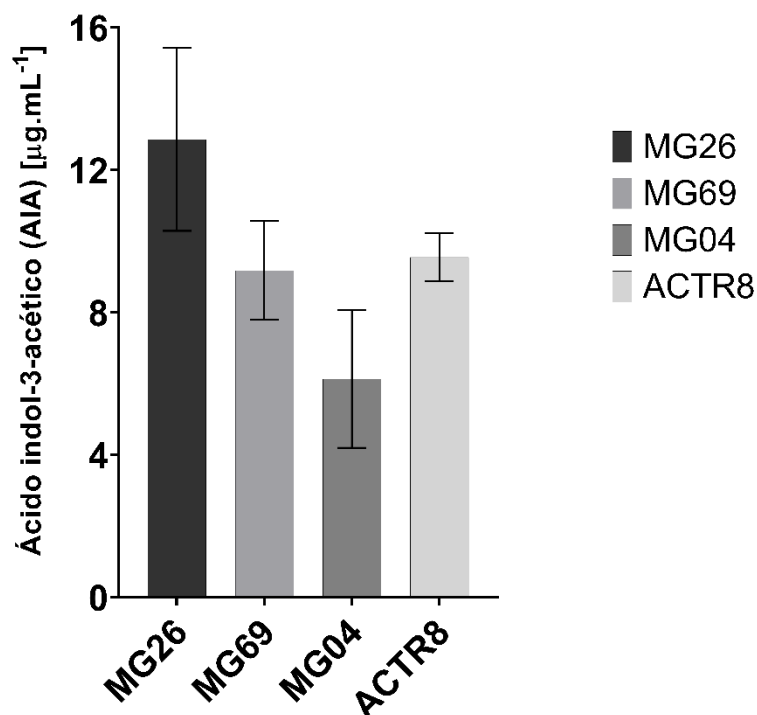
Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

A bactéria *Streptomyces* sp. ACTR8 apresentou o maior valor para produção de sideróforos ($184,3 \pm 28,7 \mu\text{M}$) seguido dos isolados MG26 ($12,86 \pm 2,57 \mu\text{M}$) e MG69 ($9,18 \pm 1,39 \mu\text{M}$). O isolado MG04 não apresentou produção de sideróforos.

2.3.6 Produção de substâncias indólicas

Os valores obtidos na investigação da produção de ácido indol-3-acético (AIA) pelos isolados bacterianos estão representados na Figura 25.

Figura 25. Resultados da avaliação quantitativa da produção de ácido indol-3-acético (AIA) por *Streptomyces* sp. ACTR8 e isolados MG26, MG69 e MG04



Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

O isolado MG26 apresentou o maior valor de produção de ácido indol-3-acético (AIA) ($12,86 \pm 2,57 \mu\text{g.mL}^{-1}$) seguido de *Streptomyces* sp. ACTR8 ($9,55 \pm 0,68 \mu\text{g.mL}^{-1}$), MG69 ($9,18 \pm 1,39 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e MG04 ($6,13 \pm 1,93 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

2.3.7 Solubilização de fosfato inorgânico

Nenhum dos isolados testados apresentou potencial para solubilização de fosfato nas condições testadas, de modo que não foi observado halo em nenhum tratamento conduzido (Figura 26).

Figura 26. Solubilização de fosfato inorgânico por por *Streptomyces* sp. ACTR8 e isolados MG26, MG69 e MG04



Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

Os resultados obtidos para as características avaliadas *in vitro* para promoção de crescimento vegetal e biocontrole indicam potencial para os isolados avaliados e para *Streptomyces* sp. ACTR8, conforme compilado na tabela 7.

Tabela 7. Resultados para os testes de atividade de quitinase, atividade de β -1,3-glucanase, produção de sideróforos, produção de ácido indol-3-acético (AIA) e solubilização de fosfato inorgânico (SF) para *Streptomyces* sp. ACTR8 e isolados MG04, MG26 e MG69 (médias $\pm$ DP, n=3)

Isolado	SF	Exoquitinase (U.mL ⁻¹)	Endoquitinase (U.mL ⁻¹)	β -1,3- glucanase (U.mL ⁻¹)	Sideróforos (μ M)	AIA (μ g.mL ⁻¹)
ACTR8	-	0,006 $\pm$ 0,004	0,090 $\pm$ 0,002	0,25 $\pm$ 0,0	184,3 $\pm$ 28,7	9,55 $\pm$ 0,68
MG04	-	0,066 $\pm$ 0,002	0,126 $\pm$ 0,011	0,26 $\pm$ 0,1	-	6,13 $\pm$ 1,93
MG26	-	0,010 $\pm$ 0,002	0,066 $\pm$ 0,004	0,25 $\pm$ 0,1	68,4 $\pm$ 2,57	12,86 $\pm$ 2,57
MG69	-	0,007 $\pm$ 0,002	-	0,25 $\pm$ 0,1	24,6 $\pm$ 1,39	9,18 $\pm$ 1,39

(+) resultado positivo, (-) resultado negativo

Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

2.3.8 Controle de *Corynespora cassiicola* *in vivo*

Para a avaliação de severidade da mancha-alvo, aos 15 dias, a doença ainda não estava visível na planta (tabela 8). A avaliação da doença 20 dias após a inoculação do fungo mostrou que o tratamento controle foi estatisticamente superior aos demais tratamentos, apresentando o maior valor de severidade da doença, seguido pelos tratamentos TWIXX, ACTR8, MG69, MG26 e MG04, que foram estatisticamente iguais. Nas avaliações de 25 e 30 dias os tratamentos controle e MG69 foram estatisticamente superiores aos demais tratamentos, apresentando os maiores valores de severidade, seguidos pelo tratamento ACTR8. Os menores valores da doença foram observados para os tratamentos TWIXX, MG26 e MG04, sendo estatisticamente inferiores aos demais tratamentos.

Tabela 8. Severidade de mancha alvo (%), Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) e eficiência de controle (%) em ensaio de eficácia agrônômica de produtos na cultura da soja. cv. BMX Potência RR.

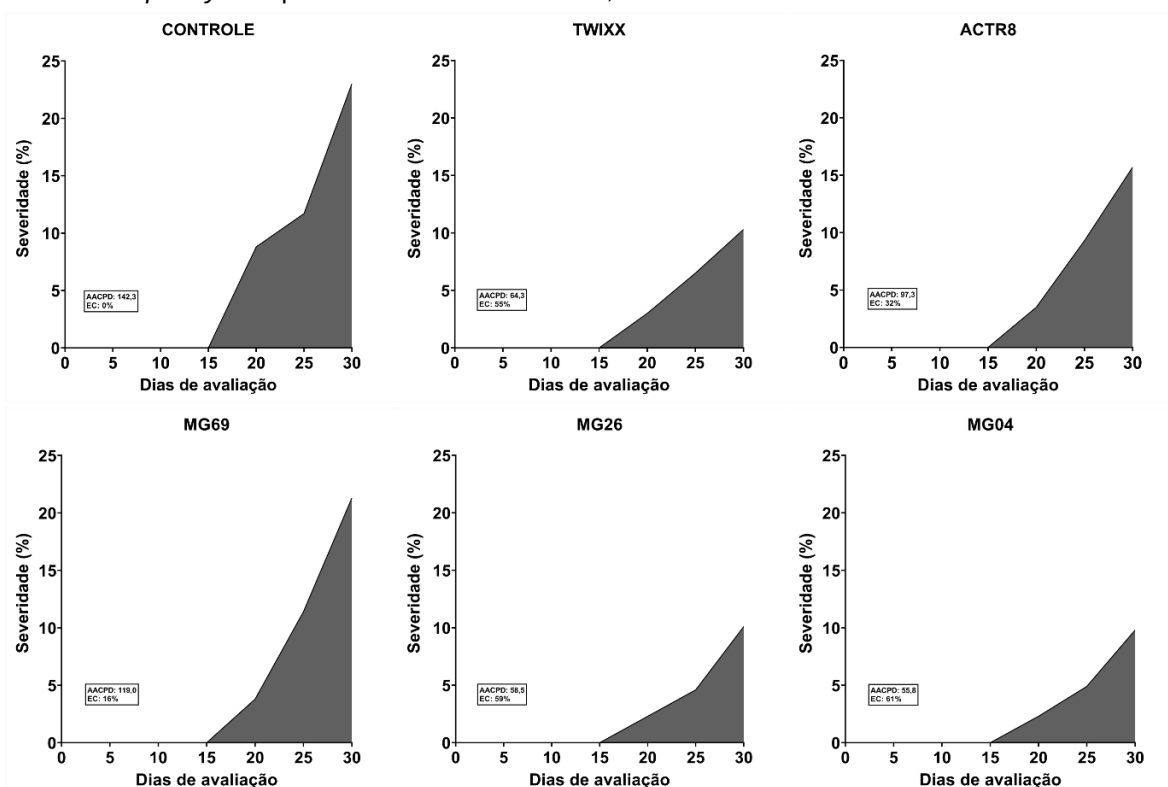
Tratamento	Severidade (%)				AACPD	EC ³ (%)
	15 dias	20 dias	25 dias	30 dias		
Controle	0,0 ^{NS1}	8,8 a ²	12,3 a ²	23,5 a ²	142,3	0
Twixx	0,0	3,0 b	6,3 c	10,1 c	64,3	55
ACTR8	0,0	3,5 b	9,6 b	16,2 b	97,3	32
MG69	0,0	3,5 b	11,5 a	21,1 a	119,0	16
MG26	0,0	2,3 b	5,3 c	10,5 c	58,5	59
MG04	0,0	2,2 b	5,0 c	10,1 c	55,8	61
C.V. (%)	-	19,8	13,9	11,7	9,2	-

¹NS: não significativo; ²Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade do erro; ³Eficiência de controle.

Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

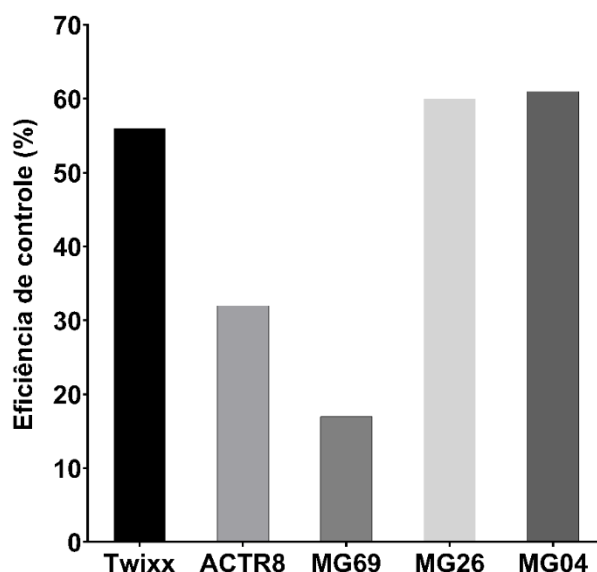
Para a AACPD, os menores valores foram encontrados para os tratamentos TWIXX, MG26 e MG04 enquanto os maiores valores foram para os tratamentos controle, ACTR8 e MG69 (Figura 27). Da mesma forma, a eficiência de controle foi maior para os tratamentos TWIXX, MG26 e MG04, e menor para os tratamentos ACTR8 e MG69 (Figura 28).

Figura 27. Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para os tratamentos controle, Twixx e *Streptomyces* sp. ACTR8 e isolados MG69, MG26 e MG04



Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

Figura 28. Eficiência de controle para os tratamentos controle, Twixx e *Streptomyces* sp. ACTR8 e isolados MG69, MG26 e MG04



Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

No que tange à avaliação de fitotoxicidade, para todos os tempos de avaliação após a inoculação do fungo, o tratamento controle diferiu estatisticamente de todos os tratamentos, não apresentando fitotoxicidade, seguido pelos tratamentos TWIXX, MG69, MG26 e MG04, que foram estatisticamente iguais. O tratamento ACTR8 apresentou o maior valor de fitotoxicidade (Tabela 9).

Tabela 9. Nota de fitotoxidez de produtos em ensaio de eficácia agrônômica de produtos na cultura da soja. cv. BMX Potência RR.

Tratamento	15 dias	20 dias	25 dias	30 dias
Controle	0,0 b ¹	0,0 b ¹	0,0 c ¹	0,0 c ¹
Twixx	0,5 a	1,2 a	1,5 b	1,9 b
ACTR8	0,9 a	1,5 a	3,5 a	4,3 a
MG69	0,7 a	1,1 a	1,3 b	1,3 b
MG26	0,7 a	1,2 a	1,5 b	1,7 b
MG04	0,5 a	1,3 a	1,5 b	1,5 b
C.V. (%)	11,5	13,8	11,6	9,1

¹ NS: não significativo; ²Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade do erro

Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

2.4 DISCUSSÃO

No Brasil, o cultivo de soja é vital para a segurança alimentar, o crescimento econômico e o desenvolvimento agrícola, entretanto, fatores limitantes como a mancha-alvo podem comprometer a produtividade em até 42% (PEREIRA GOULART; UTIAMADA, 2020). Nesse sentido, estratégias biotecnológicas se apresentam como ferramentas importantes para complementar atuais práticas e manejos de pragas e doenças (STENBERG *et al.*, 2021b). Uma importante vertente biotecnológica é a bioprospecção de actinobactérias com potencial para o controle biológico em biomas com alto potencial biotecnológico como, por exemplo, o mangue. Assim, um vasto número de trabalhos científicos tem explorado essa rota, dedicando-se ao entendimento de mecanismos e aplicação desses organismos no manejo mais sustentável de pragas e doenças (DOUMBOU *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2022). Neste trabalho, uma rota de bioprospecção partindo desde a identificação de um bioma de alto potencial biotecnológico, coleta de amostras, isolamento, caracterização e avaliação do potencial de isolados para o controle *in vivo* de *Corynespora cassiicola* foi realizada.

No que tange ao isolamento, o número de 92 actinobactérias isoladas corrobora com uma grande diversidade de trabalhos que reportaram números relevantes de isolados para isolamentos desse grupo de organismos de sedimentos ou solo rizosférico do mangue (GONG *et al.*, 2018; HONG *et al.*, 2009; JALAN *et al.*, 2022; PALLA *et al.*, 2018; ROSMINE; VARGHESE, 2016). Ainda, a presença e prevalência numérica de isolados de actinobactérias obtidas da amostra M8 (rizosfera de *Laguncularia racemosa*) corrobora com o trabalho de MOITINHO *et al.* (2019), que reportaram uma alta abundância de actinobactérias associadas ao Mangue-Branco. Embora o trabalho em questão tenha explorado a microbiota presente no filoplano de *Laguncularia racemosa*, a correlação é relevante, especialmente pelo isolamento ter sido realizado na mesma região geográfica de Cananéia, São Paulo.

O meio de cultura GA (Gauze-ágar, nº1) apresentou o maior número de isolados para todas as amostras, corroborando com estudos de isolamento conduzidos por ABONY *et al.* (2018); DAI *et al.* (2010); LIAO *et al.* (2009); TIAN *et al.* (2009), em que a utilização desse meio de cultura resultou em sucesso no isolamento de novas actinobactérias. Complementarmente, KUMAR; JADEJA (2016) destacaram a importância da escolha de amido como fonte de carbono para o isolamento de

actinobactérias, especialmente de ambiente marinho. Ainda, neste trabalho a estratégia de pré-tratamento da amostra e uso adequado dos antibióticos foi ressaltada como fator de sucesso, corroborando com resultados observados com baixa presença de bactérias Gram-negativas e contaminantes nos meios de isolamento. Por fim, SUBRAMANI; AALBERSBERG (2013) reportaram o uso dos meios de cultivo Rafinose e GA como meios de cultivo utilizados para a descoberta de actinomicetos raros e diversos de ambientes marinhos, reforçando o potencial de diversidade taxonômica e biotecnológica dos isolados obtidos e os métodos escolhidos no presente trabalho.

O ensaio de atividade fungicida *in vitro* foi realizado confrontando-se os isolados do mangue com fitopatógenos de alta relevância para a cultura da soja, contemplando fitopatógenos foliares (*Corynespora cassiicola* e *Colletotrichum truncatum*) e fitopatógenos de solo (*Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* e *Sclerotinia sclerotiorum*). Nesse sentido, o alto espectro de controle observado pelos isolados testados evidencia o potencial desse grupo de microrganismos para controle de complexos de fitopatógenos com diferentes ciclos biológicos e potencial de dano na cultura da soja. Além disso, o potencial de aplicação pode ser expandido quando se considera que os fitopatógenos em questão podem ser agentes causais em outras culturas de alta relevância. O potencial de actinobactérias para o controle de fungos fitopatogênicos de alta relevância agrícola já é amplamente conhecido e reportado (PÉREZ-CORRAL *et al.*, 2022; SILVA *et al.*, 2022; TORRES-RODRIGUEZ *et al.*, 2022).

O controle *in vitro* de fitopatógenos foliares apresentou resultados que corroboram com trabalhos que avaliaram a capacidade de actinobactérias de suprimir esse grupo de patógenos de plantas. SINGH *et al.* (2016) avaliaram a atividade antifúngica de actinomicetos para o controle dos fitopatógenos da soja *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum truncatum* e *Rhizoctonia solani*. Em concordância com o presente estudo, 16 isolados apresentaram atividade antagonista a *Colletotrichum truncatum*, sendo também o fitopatógeno em que foi observado o menor número de isolados com atividade antifúngica. A inibição do desenvolvimento do patógeno observada é promissora, principalmente dado que a infecção de *C. truncatum* ocorre diretamente após a germinação dos conídios e a formação de um apressório na superfície da planta (BOUFLEUR *et al.*, 2021) e o uso de controle biológico já tem sido empregado para o controle da doença *in vivo* (BEGUM *et al.*,

2010).

A alta prevalência de isolados com atividade antifúngica *in vitro* para *Corynespora cassiicola* (81%), fitopatógeno alvo do trabalho, revelaram grande potencial dos isolados testados para controle do fungo. Uma ampla diversidade de estudos tem reportado o potencial para inibição de *Corynespora cassiicola in vitro* por actinobactérias com percentuais de inibição de 57,9% (LIU *et al.*, 2019a), 85,5% (DEVI, 2017) e 78,34% (WANG; MA, 2018). Ainda, esse comportamento de atividade antifúngica é reportado para metabólitos e filtrados de cultivo de actinobactérias. WANG; MA (2018) alcançaram 96,5% de inibição da germinação de esporos do fitopatógeno utilizando o filtrado de um actinomiceto e WAN e colaboradores (2015) reportaram uma inibição do patógeno utilizando Novonestmicinas A e B oriundas de *Streptomyces phytohabitans*, observando uma concentração mínima inibitória (MIC) de 0.39 µg.mL⁻¹.

O espectro de controle *in vitro* de fitopatógenos de solo também foi amplo e revelou um importante potencial para aplicação dos isolados no controle desses fitopatógenos. *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Machophomina phaseolina* apresentam características de formação de estruturas de resistência e sobrevivência no solo (BUENO; AMBRÓSIO; SOUZA, 2007), que é o ambiente mais abundante e mais relatado como fonte de actinobactérias, especialmente do gênero *Streptomyces* (JAVED *et al.*, 2021). Corroborando com os resultados encontrados, actinobactérias já foram descritas inibindo tais fitopatógenos *in vitro* (BANIASADI *et al.*, 2009; GEBILY *et al.*, 2021; LIU *et al.*, 2019a; PATIL *et al.*, 2010) e *in vivo* (DÍAZ-DÍAZ *et al.*, 2022).

A prevalência de isolados positivos (80%) oriundos de amostra rizosférica (M8) para o controle *in vitro* de fitopatógenos corrobora com estudos que salientam o potencial biotecnológico desse microambiente para a bioprospecção de microrganismos com atividade antifúngica (PALLA *et al.*, 2018) e agentes de controle biológico (HAO *et al.*, 2019).

O principal mecanismo de biocontrole investigado foi a produção de enzimas líticas quitinase e β-1,3-glucanase. O interesse na caracterização desses mecanismos se dá especialmente pela capacidade dessas enzimas produzidas por microrganismos de modificar a síntese, degradar ou realizar a lise da parede celular de fitopatógenos (ROBERTI *et al.*, 2002). Nesse sentido, nos resultados obtidos, foi possível observar que isolados que apresentaram atividade antifúngica *in vitro* também apresentaram

atividade de quitinase positiva. A relevância das quitinases para a supressão de fitopatógenos é amplamente reportada na literatura (MISHRA *et al.*, 2020; SANDHU; SIDHU; YADAV, 2017; SHARMA *et al.*, 2023) e, adicionalmente, correlacionada a respostas de defesa da planta à infecção por fitopatógenos (KUMAR *et al.*, 2018).

Os isolados MG04 e MG26 apresentaram os maiores valores de atividade de endoquitinase e exoquitinase e, posteriormente, os tratamentos baseados em cultivos desses isolados também foram os tratamentos que apresentaram a melhor eficiência de controle de *Corynespora cassiicola* *in vivo*. O modelo agrônomico de avaliação do ensaio realizado assumiu aplicações preventivas dos tratamentos e posterior inoculação de conídios dos fitopatógenos. Dessa forma, um possível mecanismo de controle pela ação de quitinases presumiria a ação dessas enzimas sobre os conídios do fitopatógeno, inviabilizando-os e impedindo-os de que, por meio de apressórios, possam emitir tubos germinativos e iniciar a penetração através da epiderme da planta. O ciclo epidemiológico da mancha-alvo é curto e policíclico (MACKENZIE *et al.*, 2018) e, nesse sentido, um mecanismo de controle que atue inviabilizando e reduzindo a taxa de infecção de conídios torna-se promissor por reduzir o número de gerações da doença em uma safra.

O isolado MG04 foi o maior produtor de quitinases ($0,126 \pm 0,011 \text{ U.mL}^{-1}$) e o isolado que apresentou a maior eficiência para o controle de *Corynespora cassiicola*. Valores de atividade de quitinase similares foram observados por BAIYEE *et al.* (2019) para *Trichoderma spirale* T76-1 (0.93 U.mL^{-1}), produtor quitinases e β -1,3-glucanases capazes de causar alteração morfológica no micélio de *C. cassiicola*. Similarmente, *Streptomyces glauciniger* WICC-A03 e *Bacillus siamensis* TV16 apresentaram atividades de quitinase de 0.120 U.mL^{-1} e 0.175 U.mL^{-1} , respectivamente, sendo capazes de apresentar atividade antifúngica frente a *Fusarium oxysporum* (AWAD *et al.*, 2014) e *Corynespora cassiicola* (DUY, 2023).

Um eventual mecanismo de controle por ação de quitinases presumiria a ação por quitinases produzidas durante o cultivo dos isolados ou pelas células bacterianas em uma eventual colonização dos tecidos das folhas após a aplicação. Diversos trabalhos têm reportado a ação de quitinases purificadas produzidas por actinobactérias do gênero *Streptomyces* contra fitopatógenos. GOMES e colaboradores (2001) realizaram a purificação de uma endoquitinase de *Streptomyces* sp. RC 1071 capaz de causar a inibição da germinação de conídios e inibição parcial do crescimento de *Aspergillus parasiticus*. Similarmente, quitinases purificadas de

Streptomyces luridiscabiei U05 apresentaram atividade antifúngica contra os fitopatógenos *Alternaria alternata* e *Fusarium oxysporum* (SWIONTEK BRZEZINSKA *et al.*, 2019). Por fim, SANJIVKUMAR *et al.* (2020) realizaram a otimização da produção de uma quitinase de *Streptomyces olivaceus* (MSU3) isolada do mangue e observou a inibição máxima de *Aspergillus brasiliensis*, um patógeno humano. Para uma investigação mais profunda desse potencial mecanismo de biocontrole, a produção e purificação de quitinases do isolado MG04 e avaliação da atividade biológica *in vitro* e *in vivo* contra o fitopatógeno são propostas de rotas experimentais de elucidação.

Além do supracitado, as quitinases microbianas ainda apresentam atividade biológica inseticida e nematicida, podendo ser candidatas a ferramentas no manejo integrado de pragas (BERINI *et al.*, 2018). Somado a isso, a atividade quitinolítica em actinobactérias é amplamente descrita em termos funcionais, ecológicos e evolutivos (LACOMBE-HARVEY; BRZEZINSKI; BEAULIEU, 2018). Dessa forma, diante disso e diante dos resultados obtidos, os isolados de actinobactérias caracterizados e os ainda não caracterizados candidatam-se a potenciais linhagens a serem investigadas para o controle de insetos praga e fitonematóides em trabalhos futuros.

Todos os isolados testados apresentaram valores muito próximos de atividade de β -1,3-glucanases sugerindo que, mesmo que seja um mecanismo envolvido no controle de *C. cassicola*, é pouco provável que seja unicamente responsável. Essas enzimas são, principalmente, reconhecidas por sua função em alterar o glucano e manter a firmeza da estrutura da parede celular fúngica (MISHRA *et al.*, 2020). Dessa forma, conforme afirmado por AIMANIANDA *et al.* (2017), a capacidade das β -1,3-glucanases de modificar o polímero β -(1,3)-glucano nas paredes celulares fúngicas torna-as uma promissora ferramenta para o desenvolvimento de agentes de controle biológico (BCA). BAIYEE e colaboradores (2019) verificaram para *Trichoderma spirale* T76-1 valores de atividade de 10.13 U.mL^{-1} de β -1,3-glucanase capaz de inibir e alterar a morfologia de *C. cassicola*, substancialmente inferiores aos valores quantificados para os isolados deste trabalho. Por fim, as actinobactérias possuem uma posição relevante como produtoras de β -Glucanases com ampla aplicação em diversas vertentes (EDISON; PRADEEP, 2020), candidatando os isolados obtidos a futuras investigações. De maneira semelhante às quitinases, estudos de atividade biológica com a enzima purificada podem clarificar seu papel como mecanismo de biocontrole.

Os sideróforos produzidos por actinobactérias têm um papel multifacetado no biocontrole de patógenos de plantas pois, além de competir por ferro no ambiente, eles também exercem efeitos diretos sobre o crescimento e a sobrevivência dos fitopatógenos (DEB; TATUNG, 2024). Entretanto, ainda assim, a correlação do controle *in vivo* de *C. cassicola* com os resultados obtidos para produção de sideróforos pelos isolados tende a ser pouco elucidada, especialmente pelo caráter de múltiplos mecanismos de biocontrole frequentemente reportado para actinobactérias (KAUR *et al.*, 2023; WANG *et al.*, 2014). Ainda que a atividade antifúngica *in vitro* possa estar relacionada à depleção e competição por ferro em um ambiente controlado, o microambiente rizosférico ou do tecido foliar de uma planta é muito mais complexo e multivariado. De certa forma, é possível hipotetizar o comportamento de actinobactérias de competição pelo ferro por pirataria de sideróforos e sideróforos específicos de espécies com alteração de padrões de expressão gênica e morfológica entre actinobactérias (TRAXLER *et al.*, 2012) como uma possibilidade de interação antagônica também entre actinobactéria e fitopatógeno. Por fim, apesar de um mecanismo ainda pouco elucidado, LIU *et al.* (2019) reportaram *Streptomyces* sp. NEAU-S7GS2 como produtora de sideróforos inibindo *C. cassicola in vitro*.

A investigação e características de promoção de crescimento vegetal pode ser uma ferramenta de entendimento de mecanismos sinérgicos aos mecanismos de biocontrole, bem como uma rota de proposição de soluções biotecnológicas multifuncionais. O intervalo de valores observados para a produção de AIA ($6,13 \pm 1,93 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $12,86 \pm 2,57 \mu\text{g.mL}^{-1}$) compreendem o intervalo de resultados compilados por NAZARI *et al.* (2023) de bactérias do gênero *Streptomyces* capazes de promover o crescimento vegetal ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $96,60 \mu\text{g.mL}^{-1}$). De modo geral, o ácido indolacético-3 (AIA) destaca-se como a principal e essencial auxina nas plantas, conforme destacado por TEALE; PAPONOV; PALME (2006) com um papel muito além da simples regulação do crescimento das plantas, abrangendo a modulação da fisiologia bacteriana, adaptação ao estresse e na comunicação entre microrganismos (DUCA; GLICK, 2020; PAQUE; WEIJERS, 2016).

Alguns trabalhos têm reportado a ação do AIA contra o estresse biótico e supressão de fitopatógenos (DUCA *et al.*, 2014; FAN *et al.*, 2020; KHARE; ARORA, 2010; MARTÍNEZ NOËL *et al.*, 2001). Paradoxalmente, esse hormônio pode ter um comportamento deletério, uma vez que tanto bactérias promotoras de crescimento

vegetal quando fitopatógenos são capazes de produzi-lo (DUCA *et al.*, 2014; FU *et al.*, 2011). Enquanto bactérias benéficas auxiliam no crescimento das plantas, fitopatógenos que produzem AIA podem levar à suscetibilidade a doenças. Altos níveis de AIA de patógenos como *Agrobacterium tumefaciens* e *Pseudomonas syringae* causam lesões necróticas e formação de tumores galhais. Esses patógenos se beneficiam das respostas das plantas induzidas pelo AIA, mas perdem virulência quando incapazes de produzir AIA (MANULIS *et al.*, 1998). Embora o isolado MG26 tenha apresentado o maior valor de AIA entre os isolados avaliados e uma performance relevante no controle da mancha-alvo, as evidências são incipientes para construção de hipóteses de correlação. Em contrapartida, os resultados obtidos juntamente aos intervalos de produção de AIA reportados na literatura, candidatam os isolados obtidos do mangue a investigações futuras mais profundas quanto ao seu potencial e aplicação para promoção de crescimento vegetal em culturas de alta relevância.

Outra característica avaliada foi a habilidade de solubilização de fosfato inorgânico pelos isolados, da qual nenhum apresentou potencial qualitativo. O resultado corrobora com o fato de actinobactérias não serem reportadas como o principal grupo para tal característica, majoritariamente observada em bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Eterobacter* e *Pseudomonas* (SARMAH; SARMA, 2023). Em contrapartida, diversos trabalhos têm reportado a habilidade de actinobactérias do mangue para a solubilização de fósforo inorgânico e promoção de crescimento vegetal (EL-TARABILY *et al.*, 2021; MESTA *et al.*, 2018; SUKSAARD; PATHOM-AREE; DUANGMAL, 2017).

Até o presente momento, este é o primeiro trabalho a realizar o isolamento de actinobactérias do mangue e investigação do potencial de biocontrole *in vivo* de *Corynespora cassiicola* na cultura da soja por isolados obtidos do isolamento. Ainda que o número de publicações de agentes de controle biológico para o controle da mancha-alvo tenha crescido nos últimos anos, poucos trabalhos contemplam actinobactérias e conduzem a investigação até a avaliação da supressão da doença *in vivo*.

O potencial dos resultados obtidos torna-se ainda mais relevantes quando se observa que pelo menos dois isolados (MG04 e MG26) apresentaram eficiência de controle superiores (61% e 59%, respectivamente) ao produto Twixx (55% e 64,3), um biofungicida comercial registrado para o controle da mancha-alvo. Os valores de

AACPD (58,5 e 55,8, respectivamente) inferiores ao produto comercial e demais tratamentos também reforçam seu potencial de mitigação da progressão da severidade durante o período de avaliação proposto. Ainda, apesar de estatisticamente semelhantes, esses tratamentos apresentaram uma severidade e progressão da doença inferiores ao produto comercial e demais tratamentos, pelo menos, até 25 dias após a inoculação do patógeno. Estatisticamente inferiores em relação à severidade, os tratamentos MG69 e ACTR8 também repetiram o comportamento de controle *in vitro*, entretanto, somente ACTR8 diferiu estatisticamente do controle, comprovando seu potencial para controle da doença *in vivo*.

WAGGONER; BERGER (1987) afirmaram que a produtividade de uma planta está intimamente relacionada com sua área verde fotossintetizante e, dessa forma, doenças foliares são capazes de reduzir a produtividade em decorrência da redução da taxa fotossintética através do tecido foliar fotossintético ativo. Em culturas em que o número de folhas é fixo, como no caso dos cereais, as áreas foliares sadia e doente são altamente relacionadas, justificando uma construção da função de dano baseada na intensidade da doença (MESQUINI, 2013). Conforme determinado por EDWARDS MOLINA e colaboradores (2019b), a cultivar de soja BMX Potência RR apresenta um coeficiente de dano (DC) de 0,22, sendo o DC o dano produtivo em $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ para cada ponto percentual de severidade da mancha-alvo. Dessa forma, para esta cultivar, uma severidade hipotética de mancha-alvo de 50% pode resultar uma redução de, pelo menos, 11% da produtividade. Nesse sentido, reforça-se o potencial dos isolados MG04 e MG26 para redução da severidade da doença e consequente mitigação do impacto da presença da doença na produtividade do cultivar.

Para o ensaio de avaliação do controle *in vivo* da mancha alvo, adotou-se para os tratamentos baseados nos isolados de actinobactérias o cultivo dos microrganismos com concentração celular padronizada. Esse fato, aliado às eficiências de controle observadas para os melhores tratamentos reiteram o potencial dos isolados para métricas de controle ainda mais satisfatórias. Essa possibilidade é factível pois, durante o desenvolvimento de um bioinsumo, os mecanismos de controle são estudados, rotas de otimização são adotadas e tecnologias de formulações são aplicadas para garantir a estabilidade e reprodutividade da atividade biológica do ativo biotecnológico do produto.

Por meio de rotas de investigação, o ativo biotecnológico pode ser um

metabólito microbiano, passível de ter sua produção otimizada e etapas de purificação e concentração propostas, culminando em tecnologias com performance elevada no campo. Dessa forma, eficiências de controle satisfatórias com cultivos brutos de isolados microbianos possibilitam a proposição de rotas de desenvolvimento tecnológico que otimizem a eficácia e viabilidade desses ativos biotecnológicos no campo. Um exemplo prático da otimização da eficácia por purificação de metabólitos foi reportado por DEVI (2017) que realizou a purificação de dois metabólitos de *Streptomyces albolongus* S9 isolada de solo rizosférico que apresentaram inibição de fungos fitopatogênicos *in vitro* e eficiência de controle de 78,4% e 80,7% de *C. cassiicola* na cultura do tomateiro.

Embora a condição de avaliação *in vivo* proposta tenha sido realizada pela aspersão de conídios até o ponto de escorrimento, ou seja, um cenário de inoculação favorável ao fitopatógeno, ainda se trata de um ambiente controlado diferente das condições de campo. A ponderação é válida, especialmente por variáveis climáticas, de pressão da doença, entre outros fatores bióticos e abióticos que podem interferir na performance do agente de controle biológico (BUENO *et al.*, 2022). Um outro fator de ponderação sobre os resultados é a dosagem e homogeneidade da entrega do ativo ao sítio de ação no tecido vegetal que, em condições de campo, tende a ser muito mais heterogênea que em aplicações em condições controladas (HALL; FOX, 2018). A performance final de um bioinsumo também sempre deve ser considerada dentro de um contexto de manejo integrado, sendo essa influenciada, por exemplo, pela cultivar, patossistema, agroquímicos e aspectos fisiológicos e nutricionais da cultura (BUENO *et al.*, 2022; MEYER *et al.*, 2022; SEIXAS *et al.*, 2022). Dessa forma, ainda que o bioinsumo em questão mantenha seu potencial de mitigação da severidade da doença, a produtividade final é dependente das interações de muitas variáveis dentro do manejo da cultura.

É incipiente a proposição de potenciais mecanismos envolvidos no controle da mancha-alvo observado pelos isolados de actinobactérias sem uma caracterização genômica e metabolômica dos isolados individualmente. Entretanto, algumas hipóteses podem ser levantadas com base nos resultados e observações realizadas na literatura. FORTUNATO *et al* (2015) identificaram que, entre as várias alterações bioquímicas em folhas de soja durante a infecção por *C. cassiicola*, houve aumento significativo da atividade das enzimas líticas β -1-3-glucanase e quitinase, enzimas com atividade identificada e predominante nos isolados que apresentaram maiores

eficiências de controle para mancha-alvo neste trabalho (MG04 e MG26). Tais enzimas líticas são amplamente reportadas na literatura pelo seu papel na resposta de plantas à infecção e inibição de fitopatógenos (KUMAR *et al.*, 2018) e, portanto, são marcadores candidatos para investigações futuras mais profundas de potenciais mecanismos associados aos isolados em questão.

SUVALA; KOKATI (2019) realizaram a extração de metabólitos de *Streptomyces albolongus* e observaram a redução da severidade e desencadeamento da ativação de vias do ácido salicílico e do ácido jasmônico em tomateiros em resposta à inoculação de *Pseudomonas syringae* e *C. cassiicola*. Outro exemplo de potencial mecanismo pode estar associado à produção de antibióticos como verificado por (MA *et al.*, 2018), que reportaram alteração morfológica, inibição da germinação de conídios e redução significativa da severidade da mancha alvo na cultura do pepino desencadeada por tetramicina, um antibiótico produzido por actinobactérias do gênero *Streptomyces*.

2.5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos e na discussão previamente apresentada, pode-se concluir que:

- O bioma do mangue é uma importante fonte de produtos microbianos de aplicação biotecnológica, especialmente no desenvolvimento de bio defensivos agrícolas para o controle de fitopatógenos da cultura da soja;
- As estratégias de amostragem, seja por sua origem geográfica ou pelo tipo de amostra (rizosfera, filosfera e sedimentos), são eficazes, através do isolamento, para obtenção de uma diversidade morfológica relevante de isolados de actinobactérias;
- Os meios de cultura GA, Rafinose, SM3 e ISP2 são eficientes para o isolamento de actinobactérias de amostras do mangue. O meio GA é eficiente para todas as amostras e apresenta o maior número de isolados obtidos;
- Os isolados testados apresentam um amplo espectro de inibição *in vitro* de fungos fitopatogênicos. Os isolados MG04, MG26 e MG69 apresentam espectro de controle *in vitro* para todos os fungos fitopatogênicos testados. A amostra M8 (Rizosfera de Mangue-Branco - *Laguncularia racemosa*) é predominante em isolados, apresentando atividade antagonista positiva aos fitopatógenos testados;
- Os isolados testados apresentam a capacidade de produção, em diferentes níveis, das enzimas líticas β -1,3-glucanase e quitinase;
- Os isolados testados apresentam a capacidade de produção, em diferentes níveis, de ácido indol-3-acético (AIA) e de sideróforos;
- Os isolados testados apresentam valores de produção de AIA reportados para promoção de crescimento vegetal na literatura e são candidatos a investigações futuras para promoção de crescimento vegetal *in vivo*;
- Os isolados testados não apresentam a capacidade de solubilização de fosfato inorgânico sob avaliação qualitativa;
- O potencial dos isolados MG04 e MG26 para o controle da mancha-alvo *in vivo* pode estar relacionado a sua capacidade de produção de endoquitinases e exoquitinases;

- Os isolados MG04 e MG26 apresentam eficiência de controle superiores e AACPD inferiores ao biofungicida comercial Twixx para o controle da mancha-alvo na cultura da soja.
- Os isolados MG04, MG26, *Streptomyces* sp ACTR8 e o biofungicida Twixx mitigam significativamente a severidade de *C. cassicola* 30 dias após a inoculação do fitopatógeno;
- *Streptomyces* sp. ACTR8 apresenta fitotoxicidez significativa na cultura da soja.

REFERÊNCIAS

- ABONY, M. *et al.* ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ANTIBIOTIC PRODUCING MICROORGANISMS OF ACTINOBACTERIACEAE FAMILY FROM SOIL SAMPLES OF DHAKA AND COMILLA. v. 2, p. 13–22, 1 out. 2018
- ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **J. econ. Entomol.**, v. 18, n. 2, p. 265–267, 1925.
- AIMANIANDA, V. *et al.* The Dual Activity Responsible for the Elongation and Branching of β -(1,3)-Glucan in the Fungal Cell Wall. **mBio**, v. 8, n. 3, 5 jul. 2017.
- ALFENAS, A. C. **Métodos em fitopatologia**. [s.l.] UFV, 2007.
- AWAD, H. M. *et al.* A new chitinase-producer strain *Streptomyces glauciniger* WICC-A03: isolation and identification as a biocontrol agent for plants phytopathogenic fungi. **Natural Product Research**, v. 28, n. 24, p. 2273–2277, 17 dez. 2014.
- BANIASADI, F. *et al.* Biological Control of *Sclerotinia sclerotiorum*, Causal Agent of Sunflower Head and Stem Rot Disease, by Use of Soil borne Actinomycetes Isolates. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 4, n. 2, p. 146–151, 1 fev. 2009.
- BAIYEE, B. *et al.* *Trichoderma spirale* T76-1 displays biocontrol activity against leaf spot on lettuce (*Lactuca sativa* L.) caused by *Corynespora cassicola* or *Curvularia aeria*. **Biological Control**, v. 129, p. 195–200, fev. 2019.
- BEGUM, M. M. *et al.* Field performance of bio-primed seeds to suppress *Colletotrichum truncatum* causing damping-off and seedling stand of soybean. **Biological Control**, v. 53, n. 1, p. 18–23, abr. 2010.
- BERINI, F. *et al.* Microbial and viral chitinases: Attractive biopesticides for integrated pest management. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 3, p. 818–838, maio 2018.
- BUENO, C. J.; AMBRÓSIO, M. M. DE Q.; SOUZA, N. L. DE. Produção e avaliação da sobrevivência de estruturas de resistência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 1, p. 47–55, mar. 2007.
- BUENO, A. DE F. *et al.* Compatibilidade no uso de bioinsumos e insumos sintéticos no manejo da cultura da soja. 2022.
- BOUFLEUR, T. R. *et al.* Soybean anthracnose caused by *Colletotrichum* species: Current status and future prospects. **Molecular Plant Pathology**, v. 22, n. 4, p. 393–409, 20 abr. 2021.
- DAI, H.-Q. *et al.* *Verrucospora sediminis* sp. nov., a cyclodipeptide-producing actinomycete from deep-sea sediment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 8, p. 1807–1812, 1 ago. 2010.
- DE MELO, I. S.; SANHUEZA, R. M. V. Métodos de seleção de microrganismos

antagônicos a fitopatógenos: manual técnico. 1995.

DEB, C. R.; TATUNG, M. Siderophore producing bacteria as biocontrol agent against phytopathogens for a better environment: A review. **South African Journal of Botany**, v. 165, p. 153–162, fev. 2024.

DEVI, D. S. Shalini Devi and K. V. Bhaskara Rao. (2017) Exploration of antimicrobial compounds from *Streptomyces* S9 against a phytopathogen, *Corynespora cassicola* (Berk & Curtis). *Journal of Biopesticides*, 10(1): 01-09. **Journal of Biopesticides**, 10 jun. 2017.

DÍAZ-DÍAZ, M. *et al.* Characterization of Actinobacterial Strains as Potential Biocontrol Agents against *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani*, the Main Soil-Borne Pathogens of *Phaseolus vulgaris* in Cuba. **Plants**, v. 11, n. 5, p. 645, 26 fev. 2022.

DOUMBOU, C. L. *et al.* Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. **Phytoprotection**, v. 82, n. 3, p. 85–102, 12 abr. 2005.

DUCA, D. R.; GLICK, B. R. Indole-3-acetic acid biosynthesis and its regulation in plant-associated bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 20, p. 8607–8619, 2 out. 2020.

DUCA, D. *et al.* Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 1, p. 85–125, 21 jul. 2014.

DUY, L. Q. Evaluation of antifungal activity against *Corynespora cassicola* by bacteria isolated from soil in the root zone of cucumber plants. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 24, n. 12, 28 dez. 2023.

EDISON, L. K.; PRADEEP, N. S. Beta-Glucanolytic Soil Actinomycetes: Diversity and Applications. *Em: [s.l: s.n.].* p. 471–482.

EDWARDS MOLINA, J. P. *et al.* Effect of target spot on soybean yield and factors affecting this relationship. **Plant Pathology**, v. 68, n. 1, p. 107–115, 1 jan. 2019b.

EL-TARABILY, K. A. *et al.* A Consortium of Rhizosphere-Competent Actinobacteria Exhibiting Multiple Plant Growth-Promoting Traits Improves the Growth of *Avicennia marina* in the United Arab Emirates. **Frontiers in Marine Science**, v. 8, 13 set. 2021.

FAN, S. *et al.* Molecular functional analysis of auxin/indole-3-acetic acid proteins (Aux/IAAs) in plant disease resistance in cassava. **Physiologia Plantarum**, v. 168, n. 1, p. 88–97, 7 jan. 2020.

FORTUNATO, A. A. *et al.* Defence-Related Enzymes in Soybean Resistance to Target Spot. **Journal of Phytopathology**, v. 163, n. 9, p. 731–742, 5 set. 2015.

FEHR, W. R. *et al.* Stage of Development Descriptions for Soybeans, *Glycine Max* (L.) Merrill ¹. **Crop Science**, v. 11, n. 6, p. 929–931, nov. 1971

FRANS, R. Experimental design and techniques for measuring and analyzing plant

responses to weed control practices. **Research methods in weed science**, p. 29–46, 1986.

FU, J. *et al.* Manipulating Broad-Spectrum Disease Resistance by Suppressing Pathogen-Induced Auxin Accumulation in Rice . **Plant Physiology**, v. 155, n. 1, p. 589–602, 3 jan. 2011.

GAUZE, G. F. **Zur Klassifizierung der Actinomyceten**. [s.l.] Fischer, 1958.

GEBILY, D. A. S. *et al.* Characterization and potential antifungal activities of three *Streptomyces* spp. as biocontrol agents against *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary infecting green bean. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 31, n. 1, p. 33, 15 dez. 2021.

GONG, B. *et al.* Antibacterial and Antitumor Potential of Actinomycetes Isolated from Mangrove Soil in the Maowei Sea of the Southern Coast of China. **Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR**, v. 17, n. 4, p. 1339–1346, 2018.

GOMES, R. C. *et al.* Purification of a thermostable endochitinase from *Streptomyces* RC1071 isolated from a cerrado soil and its antagonism against phytopathogenic fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 4, p. 653–661, abr. 2001.

GORDON, S. A.; WEBER, R. P. COLORIMETRIC ESTIMATION OF INDOLEACETIC ACID. **Plant Physiology**, v. 26, n. 1, p. 192–195, 1 jan. 1951.

HALL, F. R.; FOX, R. D. The reduction of pesticide drift. Em: **Pesticide formulation and adjuvant technology**. [s.l.] CRC Press, 2018. p. 209–239.

HAO, L. *et al.* Exploring the Potential of Natural Products From Mangrove Rhizosphere Bacteria as Biopesticides Against Plant Diseases. **Plant Disease**, v. 103, n. 11, p. 2925–2932, nov. 2019.

HONG, K. *et al.* Actinomycetes for Marine Drug Discovery Isolated from Mangrove Soils and Plants in China. **Marine Drugs**, v. 7, n. 1, p. 24–44, 3 jan. 2009

JALAN, R. *et al.* Isolation and Identification of Antibacterial compound from Actinomycetes isolated from Mangrove soil. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, p. 1461–1466, 23 abr. 2022.

JAVED, Z. *et al.* Actinomycetes—the microbial machinery for the organic-cycling, plant growth, and sustainable soil health. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 31, p. 101893, 2021a.

KAUR, T. *et al.* Mechanistic insights into the role of actinobacteria as potential biocontrol candidates against fungal phytopathogens. **Journal of Basic Microbiology**, v. 63, n. 11, p. 1196–1218, 19 nov. 2023.

KHARE, E.; ARORA, N. K. Effect of Indole-3-Acetic Acid (IAA) Produced by *Pseudomonas aeruginosa* in Suppression of Charcoal Rot Disease of Chickpea. **Current Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 64–68, 5 jul. 2010.

KUMAR, R. R.; JADEJA, V. J. Isolation of Actinomycetes: A Complete Approach. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 5, p. 606–618, 15 maio 2016.

KUMAR, M. *et al.* Chitinases—Potential Candidates for Enhanced Plant Resistance towards Fungal Pathogens. **Agriculture**, v. 8, n. 7, p. 88, 22 jun. 2018.

LACAVA, P. T.; BOGAS, A. C.; MOREIRA, C. C. Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi from mangrove forests. **Endophytic Fungi; Nova Science Publishers, Inc.: New York, NY, USA**, p. 49, 2022.

LACOMBE-HARVEY, M.-È.; BRZEZINSKI, R.; BEAULIEU, C. Chitinolytic functions in actinobacteria: ecology, enzymes, and evolution. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 17, p. 7219–7230, 21 set. 2018.

LIAO, Z.-L. *et al.* *Verrucospora lutea* sp. nov., isolated from a mangrove sediment sample. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, v. 59, n. 9, p. 2269–2273, 1 set. 2009.

LIU, D. *et al.* Antifungal, Plant Growth-Promoting, and Genomic Properties of an Endophytic Actinobacterium *Streptomyces* sp. NEAU-S7GS2. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 10 set. 2019.

LU, Q.-P. *et al.* Exploitation of Potentially New Antibiotics from Mangrove Actinobacteria in Maowei Sea by Combination of Multiple Discovery Strategies. **Antibiotics**, v. 8, n. 4, p. 236, 27 nov. 2019.

MA, D. *et al.* Evaluation of bioactivity and control efficacy of tetramycin against *Corynespora cassiicola*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 152, p. 106–113, nov. 2018.

MACKENZIE, K. J. *et al.* A review of *Corynespora cassiicola* and its increasing relevance to tomato in Florida. **Plant Health Progress**, v. 19, n. 4, p. 303–309, 2018.

MANULIS, S. *et al.* Differential Involvement of Indole-3-Acetic Acid Biosynthetic Pathways in Pathogenicity and Epiphytic Fitness of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, v. 11, n. 7, p. 634–642, jul. 1998.

MARTÍNEZ NOËL, G. M. A. *et al.* Indole acetic acid attenuates disease severity in potato-*Phytophthora infestans* interaction and inhibits the pathogen growth in vitro. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 9, p. 815–823, set. 2001.

MESTA, S. C. *et al.* Phosphate solubilizing endophytic actinomycetes from mangrove plants *Rhizophora mucronata* and *Sonneratia caseolaris* and its effect on Seedling vigour. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 11, n. 3, p. 1172, 2018.

MESQUINI, R. M. **Componentes monocíclicos e quantificação de danos no patossistema *Corynespora cassiicola* - soja**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2013.

MEYER, M. C. *et al.* Bioinsumos na cultura da soja. Em: **Embrapa Soja**. 21. ed. Brasília: Embrapa Soja, 2022.

MITRA, D. *et al.* Actinobacteria-enhanced plant growth, nutrient acquisition, and crop protection: Advances in soil, plant, and microbial multifactorial interactions. **Pedosphere**, v. 32, n. 1, p. 149–170, fev. 2022.

MISHRA, P. *et al.* Microbial Enzymes in Biocontrol of Phytopathogens. Em: [s.l: s.n.]. p. 259–285.

MOITINHO, M. A. *et al.* Intraspecific variation on epiphytic bacterial community from *Laguncularia racemosa* phylloplane. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1041–1050, 31 out. 2019.

MURUGAPPAN, R. M.; ARAVINTH, A.; KARTHIKEYAN, M. Chemical and structural characterization of hydroxamate siderophore produced by marine *Vibrio harveyi*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 2, p. 265–273, 3 fev. 2011.

NAZARI, M. T. *et al.* Using *Streptomyces* spp. as plant growth promoters and biocontrol agents. **Rhizosphere**, v. 27, p. 100741, set. 2023.

N. RONDON, M.; LAWRENCE, K. The fungal pathogen *Corynespora cassiicola*: A review and insights for target spot management on cotton and Soya bean. **Journal of phytopathology**, v. 169, n. 6, p. 329–338, 2021.

NWANYANWU, C. E.; UMEH, S. I.; SAPELE, A. Effect of phosphate solubilizing bacteria on growth characteristics of maize, beans and groundnut seedlings in potted soil. **Nigerian Journal of Microbiology**, v. 29, p. 3159–3166, 2015.

PALLA, M. S. *et al.* Isolation and molecular characterization of antifungal metabolite producing actinomycete from mangrove soil. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 7, n. 2, p. 250–256, jun. 2018a.

PATIL, H. J. *et al.* Selective isolation, evaluation and characterization of antagonistic actinomycetes against *Rhizoctonia solani*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 12, p. 2163–2170, 2 dez. 2010.

PAQUE, S.; WEIJERS, D. Q&A: Auxin: the plant molecule that influences almost anything. **BMC Biology**, v. 14, n. 1, p. 67, 10 dez. 2016.

PEREIRA GOULART, A. C.; UTIAMADA, C. M. *Corynespora cassiicola* in soybean seeds – incidence and transmission. **Bioscience Journal**, v. 36, 30 dez. 2020.

PÉREZ-CORRAL, D. A. *et al.* MOLECULAR, MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF ACTINOMYCETES AND THEIR ANTAGONISTIC ACTIVITY AGAINST PHYTOPATHOGENIC FUNGI. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 45, n. 1, p. 103, 30 mar. 2022.

RIBEIRO, F. X.; JUNIOR, W. C. J.; ZAMBOLIM, L. Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas. **Belo Horizonte: Editora Perffil**, 2004.

R CORE TEAM, R. R: A language and environment for statistical computing. 2013.

ROBERTI, R. *et al.* Antagonistic fungi producing hydrolytic enzymes, active in degrading the cell wall of some foot rot pathogens (*Fusarium* spp.) of wheat / Antagonistische Pilze, die hydrolytische Enzyme erzeugen, welche zellwandabbauende Aktivität an einigen Erregern der Halmbasiskrankheiten (*Fusarium* spp.) des Weizens zeigen. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz / Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 109, n. 1, p. 101–108, 2002.

ROSMINE, E.; VARGHESE, S. A. Isolation of actinomycetes from mangrove and estuarine sediments of Cochin and screening for antimicrobial activity. **Journal of Coastal Life Medicine**, v. 4, n. 3, p. 207–210, mar. 2016.

SAIF, S. *et al.* Role of phosphate-solubilizing actinomycetes in plant growth promotion: current perspective. **Phosphate Solubilizing Microorganisms: Principles and Application of Microphos Technology**, p. 137–156, 2014

SANDHU, J. S.; SIDHU, M. K.; YADAV, I. S. Control of Fungal Diseases in Agricultural Crops by Chitinase and Glucanase Transgenes. Em: [s.l: s.n.]. p. 163–212.

SANJIVKUMAR, M. *et al.* Biosynthesis, statistical optimization and molecular modeling of chitinase from crab shell wastes by a mangrove associated actinobacterium *Streptomyces olivaceus* (MSU3) using Box-Behnken design and its antifungal effects. **Bioresource Technology Reports**, v. 11, p. 100493, set. 2020.

SARMAH, R.; SARMA, A. K. Phosphate Solubilizing Microorganisms: A Review. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 54, n. 10, p. 1306–1315, 31 maio 2023.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v. 160, n. 1, p. 47–56, jan. 1987.

SEIXAS, C. D. S. *et al.* Bioinsumos para o manejo de doenças foliares na cultura da soja. 2022

SHARMA, A. *et al.* Prospects of chitinase in sustainable farming and modern biotechnology: an update on recent progress and challenges. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, p. 1–31, 1 mar. 2023.

SHIRLING, E. B. T.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International journal of systematic bacteriology**, v. 16, n. 3, p. 313–340, 1966.

SILVA, G. DA C. *et al.* The potential use of actinomycetes as microbial inoculants and biopesticides in agriculture. **Frontiers in Soil Science**, v. 2, 2022.

SINGH, C. *et al.* Characterization of actinomycetes against phytopathogenic fungi of *Glycine max* (L.). **Asian J Pharm Clin Res**, v. 9, n. Suppl 1, p. 216–219, 2016.

SINGH, Y. D.; SINGH, M. C.; PANDA, M. K. Biotechnological aspects of mangrove microorganisms. Em: **Biotechnological Utilization of Mangrove Resources**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 381–398.

STENBERG, J. A. *et al.* When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. **Journal of Pest Science**, v. 94, n. 3, p. 665–676, 2021a.

SOARES, R. M.; GODOY, C. V; OLIVEIRA, M. C. N. DE. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha alvo da soja. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 5, p. 333–338, out. 2009.

SUBRAMANI, R.; AALBERSBERG, W. Culturable rare Actinomycetes: diversity, isolation and marine natural product discovery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 21, p. 9291–9321, 22 nov. 2013.

SUKSAARD, P.; PATHOM-AREE, W.; DUANGMAL, K. Diversity and plant growth promoting activities of actinomycetes from mangroves. **Chiang Mai J. Sci**, v. 44, n. 4, p. 1210–1223, 2017.

SUVALA, S. D.; KOKATI, V. B. R. Defense priming of tomato plants by *Streptomyces* metabolites to combat *Corynespora cassicola* and *Pseudomonas syringae* infestations. **Environmental Sustainability**, v. 2, n. 2, p. 189–198, 11 jun. 2019.

SWIONTEK BRZEZINSKA, M. *et al.* Characterization of chitinase from *Streptomyces luridiscabiei* U05 and its antagonist potential against fungal plant pathogens. **Journal of Phytopathology**, v. 167, n. 7–8, p. 404–412, 24 ago. 2019.

TAN, G. Y. A.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Exploration of Amycolatopsis diversity in soil using genus-specific primers and novel selective media. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 7, p. 557–569, nov. 2006.

THATOI, H. *et al.* Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: a review. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 1–19, 2 mar. 2013.

TIAN, X.-P. *et al.* *Sciscionella marina* gen. nov., sp. nov., a marine actinomycete isolated from a sediment in the northern South China Sea. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, v. 59, n. 2, p. 222–228, 1 fev. 2009.

TEALE, W. D.; PAPONOV, I. A.; PALME, K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 11, p. 847–859, 1 nov. 2006.

TRAXLER, M. F. *et al.* Interspecies modulation of bacterial development through iron competition and siderophore piracy. **Molecular Microbiology**, v. 86, n. 3, p. 628–644, 11 nov. 2012.

VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G. A. S.; DE ARAGÃO, F. A. S. Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3, 5-dinitrosalicílico: histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos. 2013.

WAGGONER, P. E.; BERGER, R. D. Defoliation, disease, and growth. **Phytopathology**, v. 77, n. 3, p. 393–398, 1987.

WAN, Z. *et al.* Novonestmycins A and B, two new 32-membered bioactive macrolides from *Streptomyces* phytohabitans HBERC-20821. **The Journal of Antibiotics**, v. 68, n. 3, p. 185–190, 10 mar. 2015.

WANG, W. *et al.* Siderophore production by actinobacteria. **Biomaterials**, v. 27, p. 623–631, 2014a.

WANG, M.; MA, Q. Biocontrol of Antagonistic actinomycete XN-1 isolated from cucumber phyllosphere against *Corynespora cassiicola*. 13 set. 2018.

WU, Q. *et al.* Isolation of β -1,3-Glucanase-Producing Microorganisms from *Poria cocos* Cultivation Soil via Molecular Biology. **Molecules**, v. 23, n. 7, p. 1555, 27 jun. 2018b.

ZHAO, L. *et al.* Methylerythritol Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 82, n. 1, p. 497–530, 2 jun. 2013.

CAPÍTULO 3 – IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Streptomyces solisilvae* MG04 E PROPOSIÇÃO DE ROTAS DE DESENVOLVIMENTO DE UM BIOINSUMO

3.1 INTRODUÇÃO

As etapas de desenvolvimento de bioinsumos compreendem fases de investigação e desenvolvimento que estão intimamente relacionadas à maturidade da tecnologia em cada uma destas etapas: bioprospecção, bioprocessos e formulações. A bioprospecção consiste na obtenção, identificação e avaliação de agentes biológicos contra pragas e doenças, desde sua descoberta até a compreensão de seus mecanismos de ação (CASTRO *et al.*, 2014). Bioprocessos na fabricação de defensivos microbiológicos envolvem o desenvolvimento de etapas para produção de organismos vivos ou seus metabólitos, além de etapas de separação, concentração e purificação para assegurar eficácia e estabilidade dos produtos no campo (MITROVIĆ *et al.*, 2020, 2022). Por fim, formulações de defensivos microbiológicos compreendem as etapas de desenvolvimento que visam garantir eficácia, entrega e estabilidade do ativo biológico no campo funcionalizado em um produto viável (KESWANI *et al.*, 2016; LEGGETT *et al.*, 2011). O sucesso de cada uma destas etapas está intrinsicamente relacionado ao nível de compreensão dos mecanismos envolvidos na atividade do agente de controle biológico, de modo que esta possa ser preservada ou otimizada nas etapas de desenvolvimento de um bioinsumo.

Bioinsumos usualmente são idealizados e estruturados considerando-se uma determinada quantidade de células ou metabólitos por unidade de produto como, por exemplo, unidades formadoras de colônia (UFC), endósporos ou conídios por grama ou litro de produto. Esta estruturação é usualmente baseada em uma determinada quantidade do ingrediente ativo necessária de ser pulverizada por hectare da cultura, culminando em uma dosagem final de produto em grama ou litros por hectare (GUINOSSI *et al.*, 2012; SPENCE *et al.*, 2020). Desta forma, a clareza em relação à identificação e classificação taxonômica do agente de controle biológico além dos mecanismos envolvidos no biocontrole permite que o desenvolvimento seja direcionado a viabilizar que o produto constitua uma determinada quantidade de microrganismo ou seus subprodutos suficientemente ativa para uma determinada área de aplicação na cultura.

Uma vez que o mecanismo é elucidado, especialmente na etapa de

bioprospecção, as etapas subsequentes podem ser direcionadas para otimizar a presença do ativo responsável pela atividade biológica. Por exemplo, durante o desenvolvimento de processos fermentativos em bioprocessos, é possível maximizar a quantidade de estruturas de resistência (RAO *et al.*, 2007; RUSSI; GRANADA; SCHWAMBACH, 2024) de um agente de controle biológico ou até mesmo de um metabólito secundário responsável pela atividade biológica de controle (AHSAN *et al.*, 2017, 2022; HAGGAG; ABO EL SOUD, 2012; YÁNEZ-MENDIZÁBAL; FALCONÍ; KANALEY, 2023). Ainda, através de tecnologias de formulações, é possível aumentar a estabilidade ou a eficiência de entrega de determinados ativos em seu sítio de ação no campo, maximizando sua eficiência (BEJARANO; PUOPOLO, 2020; BULLOCK, 2020; MELIN; SCHNÜRER; HÅKANSSON, 2011).

As tecnologias genômicas são importantes ferramentas para acelerar a descoberta de novos ativos biotecnológicos bem como nos potenciais mecanismos envolvidos (SARETHY; SAHARAN, 2021). A técnica de *genome mining* (mineiração genômica) envolve a análise de sequências de *clusters* de genes em genomas microbianos para descobrir novos produtos naturais (ZIEMERT; ALANJARY; WEBER, 2016), permitindo a exploração do potencial de metabólitos microbianos e a correlação das estruturas de produtos naturais com vias de síntese e sua atividade biológica de biocontrole. Muitos trabalhos têm reportado com sucesso o uso da mineração genômica para a investigação de mecanismos de biocontrole em microrganismos (BERTÊ *et al.*, 2022; BULGARI *et al.*, 2023; DOW *et al.*, 2023a; IQBAL; ULLAH; JANJUA, 2021; REHAN *et al.*, 2023). LIU e colaboradores (2019) utilizaram esta abordagem para analisar o genoma de *Streptomyces* sp. NEAU-S7GS2 e identificaram vários genes associados à assimilação de amônia, solubilização de fosfato e síntese de AIA, ACC-desaminase, glucanase e α -amilase, biossíntese de sideróforos, lindamicinas, fenazinas e um macrolídeo de poliol glicosilado, evidenciando marcadores para biocontrole e promoção de crescimento vegetal.

Desta forma, o presente capítulo objetivou realizar a extração do material genético, sequenciamento, montagem e anotação genômica do isolado MG04. Além disso, também objetivou-se realizar a análise do gene 16S rDNA para classificação taxonômica do isolado, a identificação taxonômica a nível de espécie por métricas genômicas e identificação de genes envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários (*genome mining*). Adicionalmente, rotas tecnológicas foram propostas para o desenvolvimento tecnológico de um bioinsumo baseado nesse isolado.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Extração, sequenciamento, montagem e anotação do DNA genômico

3.2.1.1 Extração do DNA genômico

Colônias do isolado MG04 isoladas em meio ISP-2 foram inoculadas em 10 mL de meio líquido GYEP (glicose 10 g.L⁻¹; extrato de levedura 10 g.L⁻¹ e peptona 1,5 g.L⁻¹) e incubadas a 150 rpm, 28°C por 7 dias. Após o cultivo, a cepa MG04 teve seu DNA extraído com o Wizard Genomic DNA Purification Kit, conforme instruções do fabricante. O DNA genômico foi quantificado via Nanodrop e Qubit para análise de qualidade

3.2.1.2 Sequenciamento do DNA genômico

A amostra de DNA foi preparada usando o kit de construção da biblioteca Nextera DNA Flex Library Prep. As concentrações foram quantificadas via QuBit 4 (Thermo-Fischer Scientific) com o kit DNA High Sensitivity. O tamanho dos fragmentos foi visualizado no equipamento Tapestation (Agilent Technologies) com kit D1000 ScreenTape System. Foi utilizada a plataforma NextSeq 550 (Illumina), com cartucho Mid Output para leituras de 300 pares de bases (2 x 150), podendo gerar até 130 milhões de leituras únicas.

3.2.1.3 Construção da biblioteca

As bibliotecas para sequenciamento foram preparadas com o kit Nextera DNA Flex Library Prep (Illumina) e tiveram sua concentração avaliada por meio de quantificação no QuBit 4 com o kit DNA High Sensitivity. Foram visualizados os tamanhos dos fragmentos pelo Tapestation (Agilent Technologies) com o kit D1000 ScreenTape System.

3.2.1.4 Verificação de qualidade e montagem do genoma

A qualidade das bibliotecas de reads produzidas pelo sequenciamento de DNA foi avaliada utilizando as ferramentas FastQC v0.11.9 e MultiQC v1.0.dev0 quanto aos parâmetros: qualidade por base (Q-score ≤ 5), qualidade por sequência, presença de adaptadores e presença de bases desconhecidas (N>10%). Em seguida,

os dados originais do sequenciamento foram pré-processados utilizando a ferramenta Trim Galore! Ferramenta v0.6.7 com objetivo de remover sequências adaptadoras remanescentes, remover bases N's dos terminais dos reads, filtrar reads menores que 50 bases e para remoção de bases com qualidade inferior a 20 (parâmetros --nextera --trim_n --length 50 -q 20).

A montagem das bibliotecas de reads do isolado foi realizada com a ferramenta Spades v.3.15.4 com os parâmetros --isolate --cov-cutoff auto -k 21,33,55. O resultado foi avaliado com a ferramenta Quast v.5.2.0 para determinação do conteúdo de GC, tamanho da montagem e grau de fragmentação do genoma. O software Busco v.5.3.2, que busca nos genomas recém-montados genes considerados essenciais, foi empregado para avaliação de qualidade das montagens.

3.2.2 Análise do gene 16S rDNA

A informação fornecida pelo sequenciamento do 16S rDNA é essencial para a identificação de gêneros bacterianos, mas a presença de regiões altamente conservadas decorre em baixa resolução para a identificação de níveis taxonômicos menores, como espécies, por exemplo (ZHI *et al.*, 2012). O limiar de 98,70% não sustenta distinções para a maioria das espécies bacterianas (STACKEBRANDT *et al.*, 2021), tendo em vista que percentuais maiores que o *cutoff* são frequentemente encontrados para diferentes espécies de um mesmo gênero ou diferentes gêneros. O limiar de 94,50% (YARZA *et al.*, 2014) sustenta a identificação de gêneros e tem boa correspondência de resultados com a maior parte dos gêneros descritos na literatura.

Para investigar as possíveis cópias de 16S rDNA presentes no genoma, foi utilizado o ContEst16S (LEE *et al.*, 2017). As sequências foram comparadas por meio de análise filogenética por Máxima Verossimilhança (ML, “*Maximum Likelihood*”) com todas as sequências de 16S rDNA do gênero de interesse obtidas em banco de dados de referência para taxonomia bacteriana (MEIER-KOLTHOFF *et al.*, 2022). As amostras também foram comparadas por meio de análise filogenética com sequências de 16S rDNA identificadas com o BLAST+ (CAMACHO *et al.*, 2009) no banco de dados BLAST 16S ribossomal RNA. Foram excluídas as duplicatas e sequências não identificadas como espécies-tipo do gênero. Também foram excluídos os resultados com identidade abaixo de 94,5% (YARZA *et al.*, 2014). A sequência foi avaliada quanto à análise de identidade nucleotídica e filogenia. Observa-se que árvores

baseadas em um único marcador filogenético tendem a ter ramos com baixos valores de *bootstrap* (KLENK; GÖKER, 2010).

O grupo externo foi selecionado por compartilhar a mesma família do gênero analisado. As sequências foram alinhadas e as posições contendo *gaps* foram removidas. Pacotes do software R foram utilizados para reconstruir uma árvore de *neighbor joining* (NJ). O modelo evolutivo foi selecionado de acordo com o critério de informação *Akaike*, o qual foi utilizado para construir árvores filogenéticas usando a estimativa de ML. Um protocolo com número de 500 *bootstraps* não paramétricos foi calculado. A árvore filogenética foi enraizada no grupo externo. A visualização e edição de árvores e cladogramas foi realizada com a linguagem de programação R.

3.2.3 Identificação de espécie por métricas genômicas e filogenia genômica

Métricas genômicas de avaliação da identidade média de nucleotídeos (ANI, *Average Nucleotide Identity*) (RICHTER; ROSSELLÓ-MÓRA, 2009) e hibridação de DNA-DNA digital (dDDH, *digital DNA-DNA hybridization*) (MEIER-KOLTHOFF *et al.*, 2013) foram utilizadas para identificação da espécie. Duas medidas de parentesco genético foram utilizadas para a definição do limiar de diferenciação de espécies, de acordo com a recomendação de MOORE *et al.* (1987). O ANI, que utiliza o alinhamento com BLAST (GORIS *et al.*, 2007), foi empregado como substituto do ΔT_m . Para substituir o DDH, foi utilizada distância entre genomas com o alinhador BLAST+ para calcular o dDDH e intervalos de confiança.

Para a filogenia genômica, distâncias intergenômicas foram usadas para inferir uma árvore filogenética de evolução mínima equilibrada. O suporte de cada um dos ramos foi inferido de 100 *pseudo-bootstraps*. As árvores filogenéticas foram enraizadas no ponto médio. Comparações com espécies/estirpes de *Streptomyces* foram realizadas na análise.

3.2.4 Predição gênica e anotação genômica

A anotação das coordenadas gênicas do genoma foi realizada através do software Prokka v.1.14.6. Foram usados os seguintes parâmetros: --compliant --locustag MG04 --prefix MG04.

3.2.5 Identificação de genes envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários – *genome mining*

O Software Pathway Tools foi utilizado para análises genômicas e estudo de vias biológicas. O Pathway Tools foi desenvolvido pelo grupo de bioinformática do SRI International e é uma ferramenta amplamente integrada com o banco de dados de vias biológicas e genomas mantidos pela instituição, o BioCyc. O BioCyc compreende uma série de plataformas para estudos de genes e processos biológicos, incluindo o EcoCyc, dedicado à *Escherichia coli* K-12, e o MetaCyc, que contém dados para diversos organismos. A ferramenta PathoLogic do software Pathway Tools foi utilizada para montagem de *Pathway/Genome Databases (PGDBs)*, que são bancos de dados interativos construídos a partir de genomas montados e anotados, nos mesmos moldes dos bancos utilizados dentro do MetaCyc. Estes bancos de dados permitem que o Pathway Tools seja utilizado para estudos diversos dos genomas criados, desde inspeções gerais através de um *Genome Browser* a estudos incluindo dados multiômicos para avaliação de expressão gênica e fluxo metabólico. Os PGDBs contêm também as vias biológicas identificadas nos genomas, com base no banco de dados do MetaCyc.

Clusters gênicos relacionados à biossíntese de metabólitos secundários também foram identificados com antiSMASH v.6.1.1. O antiSMASH (*antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell*) é um software que identifica agrupamentos (*clusters*) gênicos no genoma fornecido, encontrando-os com base em domínios proteicos característicos. Os agrupamentos são então checados contra o banco de dados MIBiG (*Minimum Information about a Biosynthetic Gene Cluster*) e classificados de acordo com o tipo de metabólito que eles produzem: sintase de peptídeos não-ribossômicos (NRPS), policetido-sintases (PKS), terpenos, sideróforos, dentre outros. O repositório MIBiG mantém agrupamentos gênicos envolvidos com a biossíntese de metabólitos secundários em diferentes microrganismos. Com base na similaridade entre as sequências dos genes nos agrupamentos do genoma de interesse e as sequências depositadas no banco de dados, tenta-se prever quais compostos são produzidos por cada *cluster* identificado. Os *clusters* identificados foram inspecionados manualmente e classificados em categorias de acordo com as propriedades biológicas dos metabólitos produzidos por *clusters* de genes semelhantes aos do isolado MG04. As categorias utilizadas para classificação foram

biocidas e quelantes, especialmente focando em compostos já reportados com atividade biológica para o controle de fitopatógenos.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Extração, sequenciamento, montagem e anotação do DNA genômico

As amostras extraídas com o kit Wizard Genomic DNA Purification apresentaram resultados satisfatórios para seguir com as construções das bibliotecas, conforme Tabela 10.

Tabela 10. Estatísticas da extração de DNA

Nanodrop (ng.µL ⁻¹)	A260/280	A260/230	QuBit (ng.µL ⁻¹)	Volume (µL)	Total de material (ng.µL ⁻¹)
43,11	1,75	1,71	15,2	54	820,8

O sequenciamento e construção das bibliotecas também foi realizado com sucesso. Foram produzidas 9,6 milhões de *reads*, correspondendo a aproximadamente cerca de 1,5 gigabases de dados brutos. A montagem do genoma ocorreu como esperado, conforme resultados dispostos na tabela 11.

Tabela 11. Estatísticas de sequenciamento* e montagem do genoma

Parâmetro	Valor esperado	Valor obtido (MG04)
Tamanho ¹	~ 11,6 Mb ¹⁰	11,35 Mb
Cobertura ²	> 100 x	191,34 x
Conteúdo GC ³	~71% ¹⁰	71,13 %
<i>Weighted completeness</i> ⁴	~1	0,99
<i>Weighted redundancy</i> ⁵	~ 1	1,0687
<i>Contigs</i> ⁶	< 300	228 <i>contigs</i>
<i>Contig N50</i> ⁷	-	144.537 bases
<i>Contig L50</i> ⁸	-	23 <i>contigs</i>
CD ⁹	~9462 ¹⁰	~ 9283 CDs
Leituras brutas*	-	14.488.004 (100%)
Leituras com adaptadores*	-	38.766(0,27%)
Leituras com N>10%*	-	40 (0,00%)
Leituras de baixa qualidade *	-	0 (0,00%)

Leituras limpas*

-

14.449.198 (99,73%)

¹ Tamanho: 1 Mb (*mega base pairs*) corresponde a 1.000.000 bp (*base pairs*).² Cobertura: número médio de leituras que se alinham ou "cobrem" bases de referência conhecidas³ GC: porcentagem de bases nitrogenadas identificadas como guanina ou citosina.⁴ *Weighted completeness*: estimativa da fração de marcadores encontrados.⁵ *Weighted redundancy*: estimativa da fração adicional de marcadores encontrados.⁶ *Contigs*: trechos contíguos de sequências que representam regiões consenso do genoma montado.⁷ *Contig N50*: metade das bases da montagem encontrados em *contigs* com sequência igual ou maior a este comprimento.⁸ *Contig L50*: *contigs* que contém a metade das bases da montagem e que são maiores ou iguais ao comprimento de N50;⁹ CD: região de codificação de um gene (*coding sequence*).¹⁰ Valor esperado, de acordo com único genoma de *S. solisilvae* disponível[\(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_015689475.1/\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_015689475.1/)

3.3.2 Análise do gene 16s rDNA

O genoma do isolado MG04 apresentou uma única sequência (cópia) de 16S rDNA com 1520 nucleotídeos, conforme abaixo:

> MG04

```
ttcacggagagtttgatcctggctcaggacgaacgctggcggcggtgcttaacacatgcaagtcgaacgatgaaccgg
tttcggccggggattagtggaacgggtgagtaaacacgtgggcaatctgccctgcactctgggacaagccctggaa
acggggtctaataccggatacgcgcgttccgcgtgggatacgtgtggaaagctccggcggtgcaggatgagccc
gcggcctatcagcttggtgggtgatggcctaccaaggcgacgcagggttagccggcctgagagggcgaccgg
ccacactgggactgagacacggcccagactcctacgggagggcagcagtggggaatattgcacaatgggcgcaag
cctgatgcagcgcgcggcggtgagggatgacggccttcgggtgtaaacctcttcagcagggaagaagcgtgagtg
acggtacctgcagaagaagcgccggctaactacgtgccagcagccgcgtaatacgtaggcgcaagcgttgctc
ggaattattgggcgtaaaagagctcgtaggcggctgtgcgctcggtatgtgaaagccgggggctaactccgggtctgc
attcgatacgggcaggctagagttcggtaggggagatcggaattcctggttagcgggtgaaatgcgcagatatcagg
aggaacaccgggtggcgaaggcggatctctgggccgatactgacgtgaggagcgaaagcgtggggagcgaaca
ggattagataccctggtagtcacgcgcgttaaactgtgggaactaggtgtgggcgacattccacgtgtccgtgccgca
gctaacgcattaagtccccgcctggggagtagcggccgcaaggctaaaactcaaaggaattgacgggggcccgcga
caagcggcgagcatgtggcctaattcgacgcgaacgcgaagaaccttaccaggcttgacataaccggaaaactc
tgagacaggggtccccctgtggtcggtgtacaggtggtgcatggctgtcgtcagctcgtgtcgtgagatgttgggttaa
gtcccgcaacgagcgcgaaccctgtcctgtgttgccagcgggttatgccggggactcacaggagactgccgggggtca
actcggaggaaggtggggacgacgtcaagtcacatgccccttatgtcttgggctgcacacgtgctacaatggccgggt
acaatgagctgcgaagccgtgaggtggagcgaatctcaaaaagccgggtctcagttcggttgggtctgcaactcga
ccccatgaagtcggagtcgtagtaatcgacagatcagcattgtcgggtgaatacgttccggggccttgacacaccg
cccgtcacgtcacgaaagtcggtaacacccgaagccgggtggccaaccctgtggagggagccgtcgaaggtggg
actggcgattgggacgaagtcgtaacaaggttagccgtaccggaaggtgcggctggtacacctcctt
```

A sequência do 16S rDNA apresenta, por análise de identidade nucleotídica, maior identidade com espécies pertencentes ao gênero *Streptomyces*. *Streptomyces samsunensis* M1463 (T) (acesso NR_116165.1) é o táxon mais próximo, com 99,73% de identidade. *Streptomyces malaysiensis* ATB-11 (T) (NR_114497.1) e *Streptomyces sabulosicollis* PRKS01-29 (T) (NR_180428.1) apresentam 99,53% e 99,11% de identidade,

respectivamente. Na análise filogenética, a sequência é agrupada sem suporte estatístico próximo a *Streptomyces samsunensis*, indicando proximidade com esta espécie. A partir da análise 16S rDNA do genoma em questão, este pode ser considerada como pertencente ao gênero *Streptomyces*.

A análise filogenética do 16S rRNA resultou na construção de árvore filogenética inferida por Máxima Verossimilhança, conforme Figuras 29, 30, 31 e 32.

Figura 29. Fragmento de árvore filogenética inferida por Máxima Verossimilhança. Os números de acesso das sequências (ncbi.nlm.nih.gov/genbank) são mostrados após a descrição dos nomes e linhagens das espécies bacterianas (LPSN). Os círculos pretos nos pontos de ramificação indicam valores de bootstrap > 70%.

Streptomyces griseiniger NRRL B-1865 AJ391818
Streptomyces amphotericinicus 1H-SSA8 KX777593
Streptomyces coeruleus NBRC 12758 AB184122
Streptomyces lilacinus NBRC 3944 AB184819
Streptomyces asiaticus A14P1 AJ391830
Streptomyces geldanamycininus NRRL 3602 DQ334781
Streptomyces mordarskii NRRL B-1346 EF408735
Streptomyces sioyaensis DSM 40032 MH628441
Streptomyces bryophytorum NEAU-HZ10 KF923804
Streptomyces lycii TRM 66187 MN567187
Streptomyces odonnellii 594 EU621880
Streptomyces paludis GSSD-12 MH636862
Streptomyces hiroshimensis NBRC 12785 JN566033
Streptomyces antimycoticus NBRC 12839 AB184185
Streptomyces orinoi NBRC 13466 AB184866
Streptomyces melanosporofaciens NRRL B-12234 AJ271887
Streptomyces samsunensis M1463 EU077190
Streptomyces palmae CMU-AB204 LC073309
Streptomyces axinellae Pol001 EU683612
Streptomyces coffeae CA1R205 MN116550
Streptomyces gelaticus NBRC 12866 AB184202
Streptomyces thioluteus NBRC 13341 AB184344
Streptomyces baliensis NBRC 104276 AB441718
Streptomyces guanduensis 701 AY876942
Streptomyces nanshensis SCSIO 01066 EU589334
Streptomyces tateyamensis Sp080513SC-30 AB473555
Streptomyces kronopolitis NEAU-ML8 KP050495
Streptomyces genisteinicus CRPJ-33 MT509587
Streptomyces zhihengii YIM T102 KU936048
Streptomyces sanyensis 219820 FJ261968
Streptomyces aqsuensis TRM46399 KY688182
Streptomyces hygrosopicus NBRC 13472 AB184428
Streptomyces sabulosicollis PRKS01-29 MK503616
Streptomyces cangkringensis D13P3 AJ391831
Streptomyces halioloniae Sp080513SC-31 AB473556
Streptomyces paucisporeus 1413 AY876943
Streptomyces xinghaiensis S187 EF577247
Streptomyces parmotrematis Ptm05 MZ922479
Streptomyces violaceusniger NRRL B-1476 AJ391822
Streptomyces solisilvae HNM0141 KY366443
Streptomyces kurssanovii NBRC 13192 AB184325
Streptomyces lydicamycinicus NBRC 110027 BBNQ01000020
Streptomyces celluloflavus NBRC 13780 AB184476
Streptomyces iranensis HM 35 FJ472862
Streptomyces peucetius JCM 9920 AB045887
Streptomyces yogyakartensis NBRC 100779 AB249942
Streptomyces epipremni PRB2-1 LC333557
Streptomyces synnematoformans S155 EF121313
Streptomyces aculeolatus NBRC 14824 AB184624
Streptomyces castelarensis NBRC 15875 AB184709
Streptomyces xantholiticus NBRC 13354 AB184349
Streptomyces albiflaviginiger NRRL B-1356 AJ391812
Streptomyces cuspidosporus NBRC 12378 AB184090
Streptomyces lacticiproducens GIMN4.001 GQ184344
Streptomyces rapamycinicus NRRL 5491 EF408733
Streptomyces yanglinensis 1307 AY876940
MG04 ←
Streptomyces himastatinicus ATCC 53653 EF408736
Streptomyces desertarenae SYSU D8023 MH518265
Streptomyces acididurans KK5PA1 MW201570
Streptomyces mobaraensis NBRC 13819 AB184870
Streptomyces alni D65 DQ460470
Streptomyces luteosporus NBRC 14657 AB184607
Streptomyces malaysiensis ATB-11 AF117304
Streptomyces scopuliridis RB72 EF657884
Streptomyces formicae 1H-GS9 KP784804
Streptomyces gobiensis 1 25 MZ497413

Figura 30. Fragmento de cladograma de árvore filogenética inferida por Máxima Verossimilhança. Os números de acesso das sequências (ncbi.nlm.nih.gov/genbank) são mostrados após a descrição dos nomes e linhagens das espécies bacterianas (LPSN). Os círculos pretos nos pontos de ramificação indicam valores de *bootstrap* > 70%.

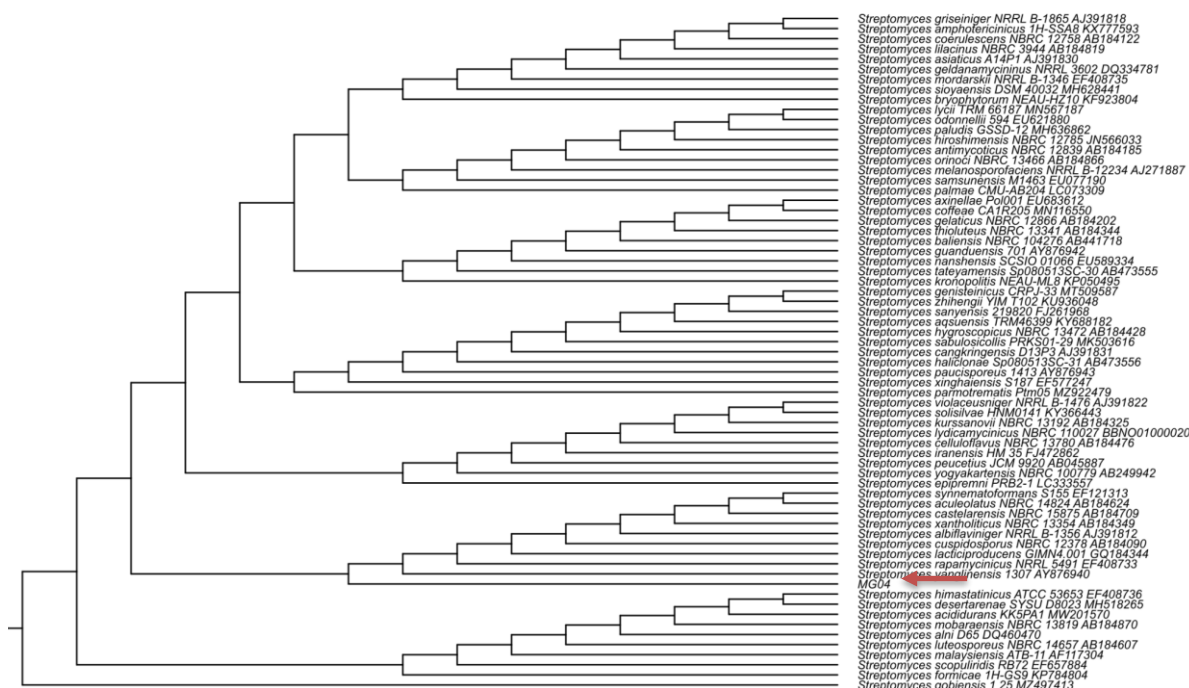


Figura 31. Cladograma de árvore filogenética inferida por Máxima Verossimilhança. Os números de acesso das sequências (ncbi.nlm.nih.gov/genbank) são mostrados após a descrição dos nomes e linhagens das espécies bacterianas (LPSN). Os círculos pretos nos pontos de ramificação indicam valores de *bootstrap* > 70%.

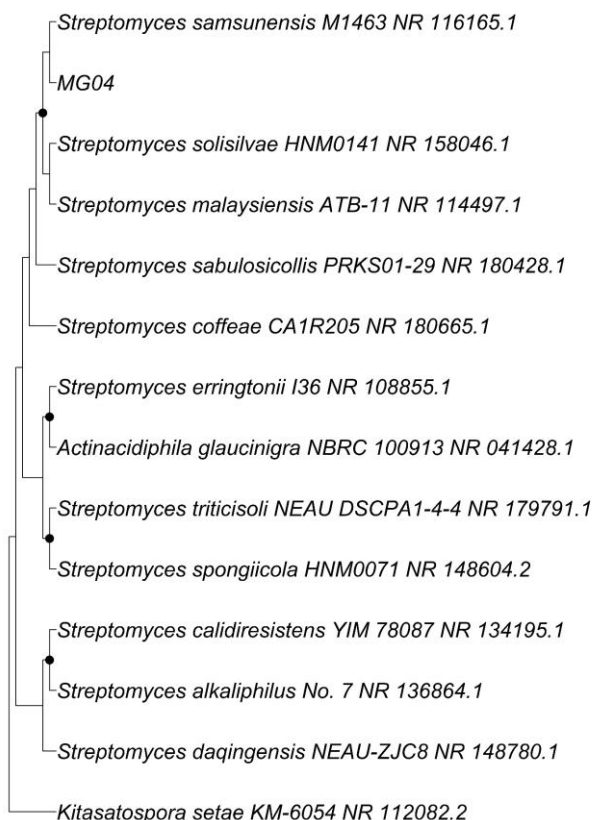


Figura 32. Árvore inferida a partir de 16S rDNA do genoma do isolado MG04. Os comprimentos dos ramos são dimensionados em termos da fórmula de distância d5 do GBDP. Os círculos pretos nos pontos de ramificação indicam valores de *pseudo-bootstrap* > 70% a partir de 100 replicações. A árvore filogenética foi enraizada no ponto médio.



3.3.3 Identificação de espécie por métricas genômicas e filogenia genômica

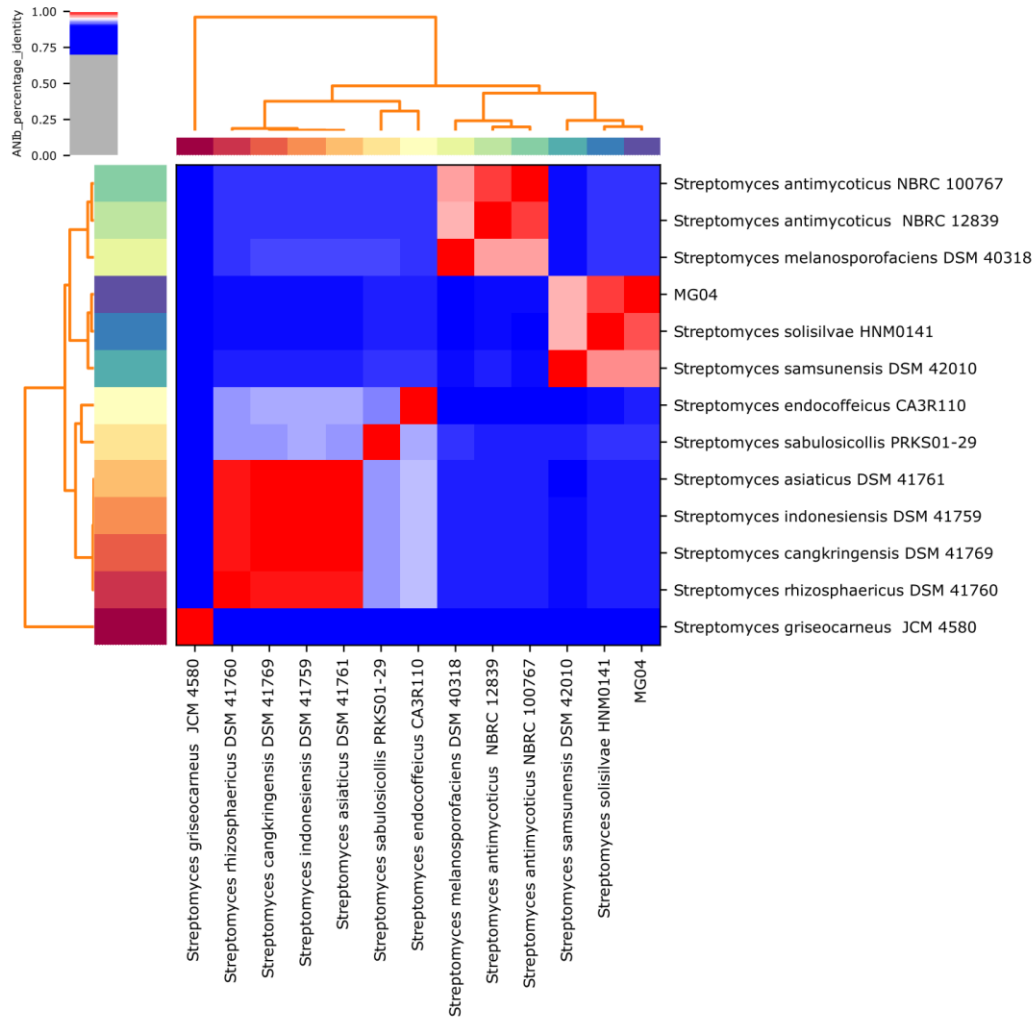
As medidas de parentesco genético (ANI, *Average Nucleotide Identity* e dDDH, *digital DNA-DNA hybridization*), a partir de comparações com espécies de *Streptomyces*, forneceram valores acima dos limiares de 95-96% para ANI (Tabela 12, Figura 33) e 70% para dDDH (Tabela 13) para *Streptomyces solisilvae* HNM0141 (T) e para *Streptomyces samsunensis* DSM 42010 (T).

Tabela 12. Resultados da análise de ANI. Números de acesso dos genomas são apresentados entre parênteses

Espécie de Streptomyces	ANI (%)
<i>Streptomyces solisilvae</i> HNM0141 (GCF_015689475.1) *	98,48
<i>Streptomyces samsunensis</i> DSM 42010 (GCF_024519315.1) *	96,22
<i>Streptomyces endocoffeicus</i> CA3R110 (GCF_016741935.1)	90,51
<i>Streptomyces sabulosicollis</i> PRKS01-29 (GCF_016103465.1)	90,42
<i>Streptomyces asiaticus</i> DSM 41761 (GCF_018138715.1)	90,11
<i>Streptomyces cangkringensis</i> DSM 41769 (GCF_019059395.1)	90,09
<i>Streptomyces indonesiensis</i> DSM 41759 (GCF_018138705.1)	90,08
<i>Streptomyces rhizosphaericus</i> DSM 41760 (GCF_017942185.1)	89,96
<i>Streptomyces antimycoticus</i> NBRC 12839 (GCF_005405925.1)	89,92
<i>Streptomyces antimycoticus</i> NBRC 100767 (GCF_009936315.1)	89,85
<i>Streptomyces melanosporofaciens</i> DSM 40318 (GCF_900105695.1)	89,84
<i>Streptomyces griseocarneus</i> JCM 4580 (GCF_014655595.1)	77,72

* Valores acima do limiar de distinção de espécies (95-96%)

Figura 33. Identidade calculada entre os genomas do isolado MG04 e diferentes espécies/cepas de Streptomyces. Números de acessos dos genomas estão apresentados na Tabela 13.



3.3.4 Predição gênica e anotação genômica

Os resultados e estatísticas da anotação do genoma estão representados na tabela 14.

Tabela 14. Estatísticas da anotação do genoma

Genes	CDS	tRNA	rRNA	tmRNA	Proteínas identificadas	Proteínas hipotéticas
9.334	9.283	92	5	1	4.529	4.707

3.3.5 Identificação de genes envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários

As análises no software Pathway Tools, identificaram no genoma do isolado MG04 2430 genes que participam de vias biológicas, organizando-se em 451 sistemas diferentes. Estes sistemas são compostos por um total de 1584 reações enzimáticas e de transporte, das quais 1185 (75%) foram encontradas no genoma e 399 (25%) representam passos ausentes.

Com foco especial nas vias biológicas caracterizadas à biossíntese de metabólitos secundários, das 33 vias classificadas nesta categoria, 8 apresentaram score superior e foram inspecionadas, conforme dados sumarizados na tabela 15.

Tabela 15. Vias biológicas do isolado MG04 inspecionadas para biossíntese de metabólitos secundários obtidas a partir de análise no Pathway Tools

Via biológica	Score	Reações presentes	Reações ausentes	Descrição	Referência
<i>2-methyl isoborneol biosynthesis</i>	1.0	2	0	Terpenóide de odor terroso	Pubchem CID 16913
<i>3-Methylthiopropionate biosynthesis</i>	0.88	1	0	Éster carboxílico (usado como fragrância)	Pubchem CID 61641
<i>Geosmin biosynthesis</i>	1.0	3	0	Molécula de odor terroso	Pubchem CID 29746
<i>Ergothioneine biosynthesis I (bacteria)</i>	1.0	5	2	Aminoácido derivado de histidina (antioxidante)	(HALLIWELL; CHEAH; TANG, 2018)
<i>Methylerythritol phosphate pathway I</i>	1.0	9	0	Biossíntese de isoprenoides	(ZHAO <i>et al.</i> , 2013)
<i>Methymycin, neomethymycin and novamethymycin biosynthesis</i>	1.0	6	0	Complexo PKS associado a compostos com atividade antimicrobiana/biocida	Pubchem CID 5282034

<i>Myo-inositol biosynthesis</i>	0.84	2	0	Via de actinomicetos para biossíntese de micotiol, agente de proteção contra estresse oxidativo	MetaCyc myo-inositol biosynthesis
<i>Narbomycin, pikromycin and novapikromycin biosynthesis</i>	1.0	6	0	Complexo PKS associado a compostos com atividade antimicrobiana/biocida	Pubchem CID 5282036

A partir das análises no software antiSMASH, foram identificadas 72 regiões gênicas associadas à biossíntese de compostos do metabolismo secundário do isolado MG04 que foram inspecionadas e, as de maior valor de similaridade, posteriormente, foram manualmente classificadas em macro categorias biocidas (tabela 16) e quelantes (tabela 17).

Foram classificadas na categoria biocidas as regiões de agrupamentos gênicos que apresentam similaridade com compostos que tenham tido documentada atividade antimicrobiana, antifúngica, citotóxica e/ou antitumoral.

Tabela 16. Regiões de agrupamentos gênicos para biossíntese de compostos com potencial ação biocida

Região	Tipo	Maior valor de similaridade	Compostos produzido por agrupamentos similares	Referência
4.1	Polyketide ²	0.4	Coronofacic acid (fitotoxina)	MELOTTO; UNDERWOOD; HE (2008)
5.1	NRP ¹	0.37	Massetolide A (inibição de fitopatógenos)	DE BRUIJN <i>et al.</i> (2008)
6.1	NRP	0.82	Thalassospiramide, massetolide A (inibição de fitopatógenos)	LU <i>et al.</i> (2015)
55.1	NRP	1.2	Massetolide A, shinorine, xenortide	DE BRUIJN <i>et al.</i> (2008)
70.1	Polyketide	0.4	Coronofacic acid	TABER; SHETH; TIAN (2009)
80.1	Polyketide	0.66	Coronofacic acid, strobilurin	BARTLETT <i>et al.</i> (2002)
67.1	Polyketide	0.31	Strobilurin (fungicida)	BARTLETT <i>et al.</i> (2002)

¹ NRP, “Nonribosomal peptide”: Peptídeos não ribossomais; ² Polyketide, “Policetídeos”

Tabela 17. Regiões de agrupamentos gênicos para biossíntese de potenciais quelantes

Região	Tipo	Maior valor de similaridade	Compostos produzido por agrupamentos similares	Referência
1.1	NRP	0.65	Coelichelin	CHALLIS; RAVEL (2000)
7.2	NRP	0.63	Vicibactin	DILWORTH <i>et al.</i> (1998)
27.1	NRP	0.52	Epichloenin	JOHNSON <i>et al.</i> (2013)
31.1	NRP	0.32	Vicibactin	DILWORTH <i>et al.</i> (1998)
37.1	Outros	0.33	Vibrioferin	STANBOROUGH <i>et al.</i> (2018)
63.1	Outros	0.59	Desferrioxamine E	CHOI <i>et al.</i> (2022)

3.4 DISCUSSÃO

3.4.1 Identificação molecular

A identificação taxonômica de actinobactérias mostra-se essencial no contexto biotecnológico e agrícola, permitindo uma compreensão mais profunda de características evolutivas e funcionais deste grupo de bactérias. Além disso, a identificação taxonômica de um isolado é uma caracterização primordial para o direcionamento e proposição parâmetros de desenvolvimento de produtos biotecnológicos, orientando aplicações, estratégias de processos fermentativos, formulações e posicionamento agrônomo. Ainda, a identificação a nível de espécie é um parâmetro de biossegurança e um requisito legal para registro de bioinsumos no Brasil, presente em estudos toxicológicos, fitotoxicológicos e ecotoxicológicos de dossiês regulatórios (AGÊNCIA SENADO, 2024).

A identificação filogenética de *Streptomyces* é particularmente complexa devido a uma combinação de fatores genéticos, morfológicos e ecológicos de modo que a sobreposição fenotípica e genética entre cepas dificulta sua distinção em nível filogenético com base apenas em marcadores tradicionais como o gene 16S rRNA (NOUIOUI *et al.*, 2018). Este gênero apresenta parede celular gram positiva e alto conteúdo G+C, conforme observado no valor observado nos resultados de sequenciamento genômico (71,13%). Recentemente, tal característica foi associado a um rico repertório de genes pouco caracterizados, indicando potencial para novas aplicações biotecnológicas (BHAT *et al.*, 2024). Além disso, resultados obtidos como o tamanho do genoma e a região codificante corroboram com dados genômicos de *Streptomyces solisilvae* anotados (GCF_015689475.1).

Os métodos tradicionais de classificação dependiam também fortemente de características fenotípicas, levando à classificação incorreta devido à filogenia complexa do gênero *Streptomyces* (KOMAKI, 2023). Embora o gene 16S rRNA seja amplamente utilizado, ele não tem resolução suficiente para diferenciar espécies estreitamente relacionadas dentro do gênero, o que levou à sugestão de marcadores alternativos para análises filogenéticas mais precisas (LAW *et al.*, 2018). Estudos

recentes defendem abordagens baseadas no genoma, como a Identidade Média de Nucleotídeos (ANI) e a hibridização digital DNA-DNA (dDDH), que fornecem posicionamentos taxonômicos mais precisos (BHAT *et al.*, 2024; KIEPAS; HOSKISSON; PRITCHARD, 2023). Neste sentido, tais técnicas genômicas utilizadas foram eficazes em classificar o isolado MG04 a nível de espécie como *Streptomyces solisilvae*.

A investigação de potenciais mecanismos de ação de agentes de controle biológico é uma etapa de extrema relevância e, neste sentido, técnicas de genômica e bioinformática foram empregadas no estudo de mineração genômica do isolado MG04. A mineração genômica (*genome mining*) tem se mostrado uma ferramenta valiosa na identificação de clusters de genes biossintéticos (BGCs), predição de produção de metabólitos secundários e elementos funcionais responsáveis por atividades antimicrobianas e de promoção do crescimento de plantas, possibilitando a descoberta e o desenvolvimento de novos bioinsumos (MONTROYA-MARTÍNEZ *et al.*, 2024).

A caracterização de vias biológicas relacionadas à biossíntese de metabólitos secundários no isolado MG04 através do Pathway Tools revelou 8 vias com score superior. Destaca-se vias biológicas de *Streptomyces* relacionadas à metabólitos antimicrobianos produzidos pelo complexo PKSs (*polyketide synthases* – policetídeo sintases), que são enzimas são responsáveis pela produção de uma diversidade estrutural de policetídeos como, por exemplo, rapamicina e actinorrodina (RISDIAN; MOZEF; WINK, 2019). A análise identificou vias com semelhança às vias biossintéticas de metimicina, neometimicina e novametimicina e também de narbomicina, picromicina e novapicromicina, antibióticos macrolídeos que possuem atividade antibacteriana e antifúngica reportada (SINGHAL *et al.*, 2023). Embora ainda não haja relatos destes compostos apresentando atividade antifúngica para fitopatógenos, existem relatos na literatura de policetídeos produzidos por *Streptomyces* com potencial para inibição de fitopatógenos. Por exemplo, a bactéria *Streptomyces caelestis* foi reportada capaz de produzir xantonas como a citreamicina com atividade antifúngica contra fitopatógenos, apresentando valores de mínima concentração inibitória (MIC) de 1,56 a 12,5 μ M (LIU *et al.*, 2019c).

A análise de vias biológicas relacionadas à biossíntese de metabólitos secundários no isolado MG04 através do antiSMASH direcionou à inspeção de 14 vias de maior score de similaridade. Nesta análise, também se identificou policetídeos

produzidos por agrupamentos similares às vias de alguns compostos como, por exemplo, o grupo das estrubirulinas, compostos atífúngicos amplamente utilizados na agricultura (BAO *et al.*, 2020). Ainda, também foram identificadas regiões de agrupamentos gênicos similares a vias de biossíntese de peptídeos não ribossomais (NRP - *Nonribosomal peptide*) como massetolida A, talassospiramida, shinorina e xenortida. O lipopeptídeo massetolide A demonstrou atividade antimicrobiana significativa no controle biológico do fitopatógeno *Phytophthora infestans*, prevenindo a expansão de lesões na folha de tomateiros e contribuindo para o aumento da colonização de raízes por *Pseudomonas fluorescens* (TRAN *et al.*, 2007).

Neste sentido, é importante enfatizar a importância da análise genômica de *Streptomyces*, revelando a presença de peptídeos não-ribossomais e policetídeos sintetases, importantes marcadores da biossíntese de metabólitos bioativos com aplicação em biocontrole (RANJAN *et al.*, 2023; TRAN *et al.*, 2007). Entretanto, embora a mineração genômica tenha se mostrado significativamente promissora na identificação de agentes de biocontrole, ainda há desafios na tradução dessas descobertas em aplicações práticas. Fatores como condições ambientais, interações microbianas e obstáculos regulatórios podem impactar a eficácia dos agentes de biocontrole em cenários realísticos de aplicação prática.

3.4.2 Proposição de rotas tecnológicas para desenvolvimento de um bioinsumo a baseado em *Streptomyces solisilvae* MG04

3.4.2.1 Caracterização e modo de ação

A caracterização do ingrediente ativo no processo de desenvolvimento um novo bioinsumo é de extrema relevância pois esta etapa geralmente determina qual será o alvo biotecnológico a ser otimizado ou preservado ao longo de todas as etapas de desenvolvimento. Neste sentido, o ativo biotecnológico ou ingrediente ativo do produto pode ser estabelecido como a biomassa celular do microrganismo agente de controle biológico, metabólitos secundários produzidos durante o processo fermentativo ou um conjunto de ambos. Grande parte dos bioinsumos de mercado possuem em sua composição, além das células do microrganismo, subprodutos do processo fermentativo e, usualmente, a determinação dos mecanismos de ação envolvidos ainda é limitada. Além de um entendimento do modo de ação, tal determinação é importante pois células e metabólitos apresentam estratégias de

desenvolvimento, estabilidade e nuances regulatórios distintos.

O cultivo de *Streptomyces solisilvae* MG04 apresentou potencial para controle de *C. asiicola* *in vivo*, evidenciando potencial de atividade biológica de controle das células e/ou de subprodutos do processo fermentativo. Uma próxima etapa experimental sugerida seria a investigação da atividade biológica *in vivo* do filtrado obtido do cultivo bacteriano conduzido nas mesmas condições fermentativas comparado ao cultivo inicialmente avaliado. Esta investigação pode viabilizar o entendimento do papel de subprodutos fermentativos, caso este apresente atividade biológica semelhante ao cultivo. Entretanto, é possível que o filtrado não apresente o mesmo desempenho, direcionando a investigação para estudos de interação patógeno-planta-agente de controle e para a caracterização química detalhada de subprodutos microbianos.

Diversos estudos têm trabalhado a investigação de metabólitos secundários produzidos por espécies de *Streptomyces* com atividade biológica contra fitopatógenos (WANG *et al.*, 2024). A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, rotas de investigação poderiam ser propostas para *Streptomyces solisilvae* MG04 focando na purificação, quantificação e avaliação de atividade biológica de enzimas líticas conforme realizado em diversos estudos (GOMES *et al.*, 2001; SANJIVKUMAR *et al.*, 2020; SWIONTEK BRZEZINSKA *et al.*, 2019). Além das enzimas líticas, resultados de mineração genômica obtidos no presente estudo fomentam a sugestão de etapas de caracterizações mais profundas de metabólitos secundários usualmente reportados como antimicrobianos como peptídeos não-ribossomais e policetídeos (WANG *et al.*, 2024). Além disso, mecanismos de indução de resistência sistêmica em plantas mediada por metabólitos de *Streptomyces* podem ser investigados, aprofundando-se em possíveis interações “agente de controle biológico-planta-fitopatógeno”, um mecanismo amplamente reportado (ABO-ZAID; MATAR; ABDELKHALEK, 2020; EMANNUEL OLIVEIRA VIEIRA *et al.*, 2024; HATA; YUSOF; ZULPERI, 2021; LI *et al.*, 2023; TAHA *et al.*, 2021).

A caracterização de metabólitos secundários e associação com sua atividade biológica de biocontrole é uma etapa desafiadora, multidisciplinar e multifatorial, de modo que alguns mecanismos não são desvendados em sua completude. Algumas rotas propostas dependem de técnicas avançadas, cada uma com vantagens particulares. A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) permite a análise multiplexada e quantitativa de diversos metabólitos (TURTOI *et al.*,

2023). Técnicas avançadas de espectrometria de massas (MS), como cromatografia gasosa acoplada à MS e eletroforese capilar acoplada à MS, possibilitam obter o perfil metabólico de alta resolução e o mapeamento espacial metabólico(WANG; ZHU; XIONG, 2023). O imageamento por espectrometria de massas (MSI) acrescenta localização espacial, essencial para investigação da dinâmica de alguns mecanismos e interações envolvidas(YANG *et al.*, 2023). A espectroscopia por ressonância magnética nuclear (NMR), aprimorada por métodos de deslocamento puro, garante uma quantificação precisa em amostras complexas(CHEN *et al.*, 2022b). Ferramentas de aprendizado de máquina, como Pyxis™, simplificam ainda mais a metabolômica não direcionada ao converter dados brutos de MS em concentrações absolutas de forma eficiente (FERRO *et al.*, 2024). Juntas, essas metodologias avançam a metabolômica com soluções abrangentes, precisas e escaláveis. Neste sentido, mesmo que não elucidadas em sua completude, tais metodologias permitiriam direcionar estratégias de bioprocessos associados, escalonamento, estabilização, aspectos regulatórios, quantificação e garantia de qualidade do ativo biotecnológico.

3.4.2.2 Bioprocessos de produção do ingrediente ativo e formulação de produto

Uma vez que o ingrediente ativo é determinado e o modo de ação do produto a ser desenvolvido é minimamente desvendado, a próxima etapa de desenvolvimento são os bioprocessos associados à sua produção desde a escala de bancada até a escala industrial. Até o presente momento, o modo de ação de *Streptomyces solisilvae* MG04 não foi completamente desvendado, portanto, múltiplas estratégias de processos fermentativos e de operações de *downstream* (pós processo fermentativo) podem ser propostas e discutidas. Neste sentido, as estratégias podem ser direcionadas para maximizar a produção de biomassa do microrganismo, de um ou mais metabólitos secundários ou de ambos, visto que alguns bioinsumos comerciais consideram o ingrediente ativo do produto como uma combinação de células e metabólitos.

Apesar da recente atualização no cenário regulatório dos bioinsumos(AGÊNCIA SENADO, 2024), produtos comerciais desta classe usualmente possuem como garantia legal quantificações microbiológicas (conídios, unidades formadoras de colônias-UFC) por quilograma (kg) ou litro de produto(L). Por este fato, o desenvolvimento de bioprocessos de bioinsumos usualmente é

direcionado para a produção de estruturas de resistência (esporos ou endósporos) ou estruturas reprodutivas mais resistentes (conídios), visando a estabilização do produto, conferindo maior tempo de prateleira (*shelf-life*), viabilidade e competitividade. Alguns gêneros pertencentes ao filo das actinobactérias são capazes de produzir esporos (*Amycolatopsis* e *Streptomyces*), desta forma, fomentando estratégias fermentativas para o isolado *Streptomyces solisilvae* MG04 que possam maximizar a produção de esporos.

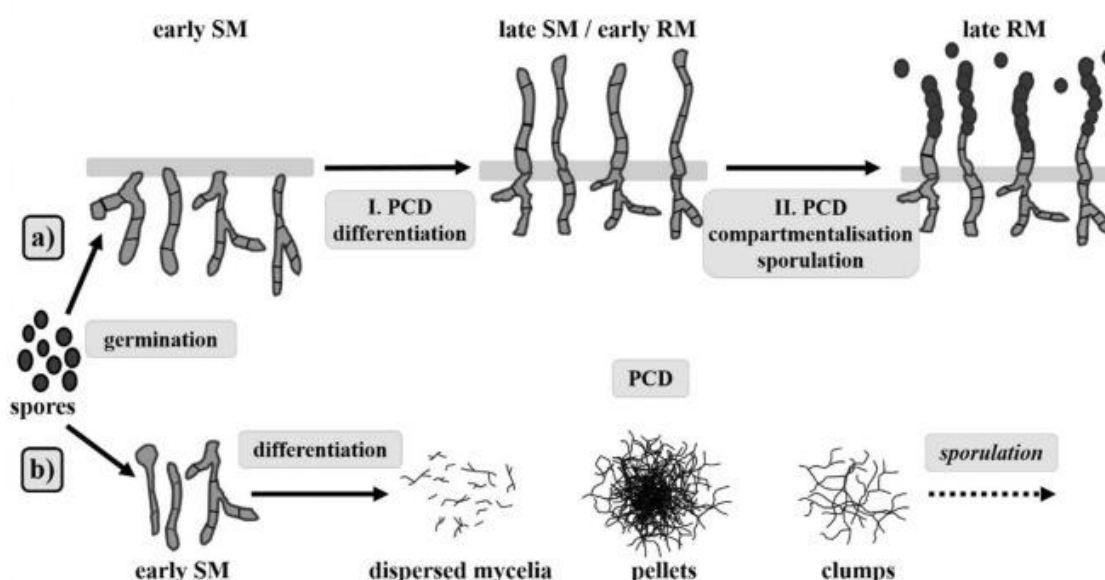
O ambiente influencia significativamente o momento e a frequência da esporulação em *Streptomyces* por meio de vários mecanismos, incluindo disponibilidade de nutrientes, fatores genéticos e sinais químicos. O ciclo de vida clássico de *Streptomyces* culmina na formação de esporos dormentes em um processo que pode ocorrer paralelamente ao crescimento vegetativo, consistindo em uma rápida expansão do micélio vegetativo e é influenciado por sinais nutricionais específicos (SHEPHERDSON; ELLIOT, 2023a). Um elemento-chave na esporulação é a proteína de divisão celular SepX, essencial tanto para a formação de paredes transversais em hifas de crescimento quanto para a septação que leva à liberação dos esporos. Esta proteína estabiliza o divisomo, um complexo necessário para a divisão celular, e sua ausência resulta em redução da aptidão das colônias e no comprometimento do desenvolvimento (BUSH *et al.*, 2022; LASKER, 2022).

A esporulação de *Streptomyces* pode ser induzida por metabólitos secundários, como as lidicamicinas, que podem ser produzidas através de co-cultivos, desencadeando a diferenciação morfológica e a esporulação, destacando o papel dos compostos bioativos nas interações e no desenvolvimento de *Streptomyces* (JARMUSCH *et al.*, 2024). Fatores ambientais também desempenham um papel muito importante na esporulação (CHAE *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2020) como, por exemplo, a adição de fontes de nitrogênio, como ácido L-glutâmico e L-cisteína (KIM; KWAK, 2023). A integração da esporulação com o crescimento vegetativo, juntamente com a participação de proteínas e metabólitos específicos, reflete as estratégias adaptativas de *Streptomyces* em ambientes dinâmicos, permitindo que equilibrem colonização e sobrevivência por meio de um ciclo de desenvolvimento coordenado (BUSH *et al.*, 2022; JARMUSCH *et al.*, 2024; SHEPHERDSON; ELLIOT, 2023).

O processo fermentativo de espécies de *Streptomyces*, especialmente em ambientes industriais, é significativamente influenciado pela formação e dinâmica dos *pellets* miceliais. Estas estruturas são agregados complexos de hifas, podendo impor

limitações ao transporte de massa e alterar as propriedades reológicas do ambiente fermentativos, aumentando a heterogeneidade do cultivo e influenciando a transferência de oxigênio e nutrientes, afetando assim a produção de esporos e de metabólitos secundários(JUNKER *et al.*, 2004; KUMAR *et al.*, 2023; ZACCHETTI; SMITS; CLAESSEN, 2018). As particularidades morfológicas de *Streptomyces* via cultivo submerso e em estado sólido estão representadas na figura 35, enfatizando a relevância e desafios encontrados em cada uma das estratégias fermentativas.

Figura 35. Ciclo de vida geral de *Streptomyces* em culturas sólidas (a) e líquidas (b). ('SM' e 'RM' são as abreviações para *substrate mycelium* - micélio de substrato e *reproductive mycelium* - micélio reprodutivo, respectivamente. A linha cinza horizontal no painel superior indica a superfície sólida. Os esporos são representados por círculos pretos.



Retirado de LAJTAI-SZABÓ *et al* (2022)

Além do uso de polímeros e tensoativos que afetam a formação de pellets(JUNKER *et al.*, 2004), técnicas avançadas de classificação, como o *Complex Object Parametric Analyzer and Sorter* (COPAS), foram desenvolvidas para analisar e classificar esses *pellets* heterogêneos, facilitando pesquisas adicionais sobre suas dinâmicas de crescimento e implicações na produtividade(PETRUS *et al.*, 2014). Além disso, devido à relevância do papel do suporte físico para características morfológicas e comportamento fermentativo de *Streptomyces*, novas técnicas têm sido propostas para otimizar a produção e metabólitos secundários e de biomassa deste grupo de bactérias como Cultivo Melhorado com Micropartículas (MPEC), Imobilização Celular, a própria Fermentação em Estado Sólido (SSF) ou Reator Gradostat de Membrana

(MGR)(LAJTAI-SZABÓ *et al.*, 2022). Neste sentido, tais técnicas poderiam ser empregadas para mitigar os desafios fermentativos intrínsecos do cultivo de *Streptomyces* tanto em escala de bancada como durante as fases de escalonamento.

Portanto, tais particularidades morfológicas de *Streptomyces* também podem direcionar se a estratégia fermentativa a ser otimizada será baseada em uma SSF ou fermentação submersa (SF) e, conseqüentemente, o tipo de biorreator e variáveis nutricionais, de transferência de massa e energia(OLMOS *et al.*, 2013). Uma grande diversidade de estudos tem focado na otimização de condições de cultivo que maximizem a formação de esporos em *Streptomyces* especialmente via SSF(LEE *et al.*, 2020b; LEE; SHI, 2018; SAKDAPETSIRI *et al.*, 2019; VANDENBERGHE *et al.*, 2021), uma característica incomum em cultivos submersos(VAN DISSEL; CLAESSEN; VAN WEZEL, 2014). Ainda, as estratégias podem ser combinadas para maximizar a produção de compostos antifúngicos relacionados à atividade de bioncontrole, conforme trabalhos de CHEN *et al* (2022a), PAN *et al* (2024); YANG *et al.*, 2025).

Considerando todos os fatores supracitados, a proposição de rotas de desenvolvimento de bioprocessos para *Streptomyces solisilvae* MG04 pode ser multifacetada e complexa, entretanto, é possível indicar que, de modo geral, a SSF seria a rota mais indicada para a produção de esporos e a SF para estratégias de produção de metabólitos secundários antifúngicos. Diante de tal cenário multivariado, metodologias de *design* de experimentos (*design of experiments* – DOE) são amplamente recomendadas para desenvolvimento de bioprocessos, visando otimizar condições de cultivo e maximizar a produção do produto de interesse (MANDENIUS; BRUNDIN, 2008). Variáveis e estratégias abordadas nos trabalhos de CHEN *et al* (2022), LATHA; SIVARANJANI; DHANASEKARAN (2017), LIU *et al* (2020), YANG *et al* (2025) e ZHU *et al* (2023) podem ser um importante ponto de partida para a otimização do processo desta linhagem para produção de esporos ou metabólitos secundários antifúngicos.

No que tange ao escalonamento de bioprocessos, além de todos os desafios atribuídos às particularidades morfológicas do cultivo de bactérias filamentosas, existem desafios e variáveis gerais do escalonamento que precisam ser cautelosamente planejados para sugestão de rotas de desenvolvimento. Um dos principais desafios é manter respostas metabólicas consistentes das células durante o aumento de escala da fermentação, o que muitas vezes é dificultado por métodos tradicionais, como análise adimensional e escalonamento por fatores constantes,

como kLa (coeficiente de transferência de oxigênio) ou velocidade na ponta do impelidor. Esses métodos podem ser ineficientes para bioprocessos recém-desenhados e organismos com particularidades morfológicas, tornando necessárias técnicas avançadas, como otimizações baseadas em dinâmica de fluidos computacional e inteligência artificial(CHEN; XIA, 2024; MITCHELL; BEROVIČ; KRIEGER, 2006). Especificamente para SSF, as complexidades dos biorreatores agravam esses desafios, já que é difícil alcançar condições uniformes em operações de grande escala devido às limitações dos fenômenos de transporte (MITCHELL; BEROVIČ; KRIEGER, 2006). Por fim, a sugestão de rotas de escalonamento exige planejamento e execução meticulosos tratando-se de uma etapa de alto custo, fundamental para as etapas seguintes e usualmente protegidas por patentes de processos ou segredos industriais.

A depender das condições fermentativas e do ativo biotecnológico final, torna-se necessário incluir uma etapa pós fermentativa (*downstream*) para recuperação deste ativo (metabólito ou esporos). Se a necessidade for de remoção ou recuperação de células, técnicas de separação sólido-líquido como centrifugação, filtração ou floculação podem ser empregadas. Caso seja necessário concentrar algum produto presente no sobrenadante, etapas de ultracentrifugação, evaporação ou precipitação podem ser sugeridas. Ainda, o ativo pode demandar uma purificação mais fina, demandando técnicas cromatográficas, extração líquido-líquido ou diafiltração. Por fim, técnicas de secagem (liofilização, *spray drying* ou leito fluidizado) ou cristalização podem ser necessárias para também garantir estabilidade do ativo e otimizar desafios de formulação final (KULOTHUNGAN, 2024; ZYDNEY, 2016).

A etapa de desenvolvimento formulação é um dos maiores gargalos atuais no desenvolvimento de bioinsumos, principalmente devido à estabilidade e sensibilidade do ingrediente ativo à fatores ambientais e incompatibilidade química com componentes da formulação e à desafios de praticabilidade agrônômica e viabilidade técnico-financeira. Formulações líquidas e sem necessidade de refrigeração são preferenciais no mercado, entretanto, envolvem uma maior complexidade de desenvolvimento e estabilização do ativo, de modo que ainda haja alta adoção de formulações sólidas em bioinsumos. *Streptomyces solisilvae* MG04 é um organismo capaz de produzir esporos e, portanto, a estabilização de esporos pode ser um ponto de partida para direcionar estratégias de formulação de um produto baseado neste ativo, viabilizando possibilidades de formulações líquidas e sólidas. Para o ativo em

questão, cabe uma recomendação de etapas de *downstream* robustas como etapas de secagem, por exemplo, a fim de otimizar e demandar menos esforços, espaço e componentes de formulação para este fim. Entretanto, esporos de *Streptomyces* não apresentam alta tolerância térmica como endósporos de *Bacillus*, onde a secagem é amplamente empregada, demandando assim estudo de otimização de parâmetros de secagem.

Um produto formulado é usualmente composto pelo ingrediente ativo, por carreadores, geralmente formados por materiais inertes que suportam e entregam o ingrediente ativo no local-alvo e, por fim, são adicionados adjuvantes, como protetores, estabilizadores, aderentes, surfactantes e nutrientes adicionais, que têm a função de proteger o ingrediente ativo contra altas temperaturas, dessecação e radiação UV, além de promover a dispersão, adesividade e performance na aplicação do produto.

Objetivando uma formulação líquida, para o ativo deste estudo, a principal estratégia proposta pode basear na escolha de carreadores de baixa atividade de água (a_w) ou que possam ser misturados com água e formar um sistema com tal característica. Os principais componentes aplicáveis são óleos vegetais e minerais, glicóis (glicerol, propilenoglicol, etc.), açúcares (sorbitol, sacarose, trealose) e polímeros biológicos (goma xantana, goma guar, etc). Similarmente, para formulações sólidas, carreadores minerais como talco ou caulim podem ser empregados, pois já são sistemas com baixa atividade de água. É importante considerar na estratégia de uso destes e outros componentes como estabilizantes e protetores para processos de desidratação, reidratação e desequilíbrios osmóticos (TEIXIDÓ; USALL; TORRES, 2022). Por fim, especialmente em formulações líquidas, é importante considerar o uso de preservantes biocidas compatíveis com o ingrediente ativo que, aliados à estratégia de redução de a_w , irão garantir que não haja proliferação microbológica na formulação.

Juntamente à estabilização do ingrediente ativo, os aspectos físico-químicos da formulação demandam estratégias de desenvolvimento multifacetadas. Formulações agroquímicas precisam apresentar baixo tamanho médio de partícula ($< 150\mu\text{M}$), alta dispersibilidade, suspensibilidade, estabilidade de emulsão e, principalmente, compatibilidade química com produtos utilizados em associação no tanque de aplicação. Neste sentido, é pertinente considerar também no desenvolvimento o uso de tensoativos que maximizem a dispersão, suspensibilidade e sejam compatíveis com o ingrediente ativo como, por exemplo, dispersantes poliméricos ou co-polímeros de blocos. Além disso, recomenda-se durante o

desenvolvimento e escalonamento da formulação que sejam empregados processos de redução do tamanho de partículas utilizando, por exemplo, sistemas de micronização ou moagem líquidas com moinhos de esferas (*bead mill*).

Diversas técnicas de encapsulamento têm sido reportadas e empregadas visando aumentar a estabilidade e compatibilidade do ativo biológico com componentes da formulação, aumentando a estabilidade térmica e osmótica, provendo maior estabilidade à fatores ambientais e atuando com liberação controlada. O encapsulamento consiste na inclusão do ativo biológico em uma matriz específica (cápsula), que pode ser biodegradável se composta por quitosana, goma guar, goma arábica, alginato de sódio e outros biocompostos ou poliacrilamidas (MANCERA-LÓPEZ; BARRERA-CORTÉS, 2024; TEIXIDÓ; USALL; TORRES, 2022). Diversos estudos já têm aplicado técnicas de encapsulamento para aumentar a viabilidade e eficácia de actinobactérias como agentes de biocontrole e podem ser tecnologias empregadas para o desenvolvimento de formulações para *Streptomyces solisilvae* MG04 (MANCERA-LÓPEZ *et al.*, 2022b; SABERI RISEH; MORADI POUR; AIT BARKA, 2022; SABERI - RISEH; MORADI - POUR, 2021b).

3.4.2.3 Validação e posicionamento agrônômico

A validação da atividade biológica do agente de controle biológico em todas as etapas de desenvolvimento tecnológico do bioinsumo é primordial. Na etapa de caracterização, validações de investigações permitem confirmar *in planta* mecanismos moleculares e modos de ação associados à atividade biológica. Durante a etapa de bioprocessos, a validação agrônômica permite certificar que possíveis alterações morfológicas ou do perfil de metabólitos produzidos não estão impactando negativamente a atividade biológica no decorrer do avanço das escalas e alterações de processos. A etapa de formulação é multivariada e envolve também certificar agronomicamente a manutenção da atividade biológica das estratégias de formulações, bem como eventuais incrementos associados às tecnologias empregadas. Neste sentido, recomenda-se que cada uma das etapas de desenvolvimento tenha pontos de checagem com ensaios agrônômicos, visando avaliar a manutenção ou incremento da atividade biológica em cada fase do desenvolvimento.

Um fator importante a ser considerado também é a diferença do

comportamento e eficiência de um bioinsumo nas diferentes escalas agrícolas, desde o laboratório, casa de vegetação e os campos de produção, em suas diversidades edafoclimáticas. É evidente que diferentes eficiências são observadas para a atividade biológica *in vitro* e *in planta* (DOW *et al.*, 2023), entretanto, a maior lacuna e necessidade de investigação está entre a casa de vegetação, o campo e a pluralidade de condições e manejos agronômicos as quais o bioinsumo será submetido. Desta forma, é pertinente recomendar uma etapa de desenvolvimento do posicionamento agronômico, onde o produto desenvolvido e registrado passará por etapas de investigação para determinação da melhor recomendação de manejo para cada realidade de campo. Nesta etapa deverá ser determinado a dose do produto, número de aplicações, momento de aplicação de acordo com o estágio fenológico da cultura e, principalmente, quais outras moléculas e produtos serão recomendados no manejo para controle do fitopatógeno alvo.

A mancha alvo é uma doença policíclica, causada por um fungo necrotrófico que sobrevive em debris vegetais, infecta a planta em estágios iniciais de desenvolvimento e, atualmente, é majoritariamente controlada por defensivos químicos. Neste sentido, estudos de posicionamento para tal bioinsumo, devem considerar investigações de sua capacidade de reduzir a quantidade de inóculo inicial da doença ou atuar de forma preventiva nos estádios fenológicos iniciais da cultura. Além disso, o manejo mais eficiente atualmente utilizado é baseado no uso de fungicidas protetores (macozebe) associados a protioconazol e azoxistrobina (GODOY *et al.*, 2023) e, neste sentido, ensaios de posicionamento devem considerar como um bioinsumo pode ser associado a estes produtos considerando o sistema agrícola inserido, a eficiência de controle e a viabilidade financeira deste manejo. MEYER *et al.* (2024) destacam a importância da construção de um posicionamento assertivo da associação de bioinsumos e agroquímicos para um controle efetivo de doenças foliares na cultura da soja. Ainda, torna-se importante avaliar o posicionamento do bioinsumo em outras culturas suscetíveis à mancha-alvo, considerando o cenário brasileiro de rotação e sucessão de culturas, além de oportunidades de aplicação em culturas de alta relevância como cultura do algodão e do tomate.

3.5 CONCLUSÕES

- A análise do gene 16S rDNA permite considerar o isolado MG04 como pertencente ao gênero *Streptomyces*;
- Análises por métricas genômicas demonstram que o genoma do isolado MG04 forma um clado com suporte estatístico na análise filogenômica junto a *Streptomyces solisilvae* HNM014;
- A estratégia de *genome mining* permite identificar *clusters* gênicos para biocidas e quelantes, com compostos já reportados com atividade biológica para o controle de fitopatógenos.
- A caracterização do ingrediente ativo é essencial no desenvolvimento de bioinsumos para entender mecanismos de ação e garantir estabilidade e qualidade. Estudos com *Streptomyces solisilvae* MG04 demonstram potencial de controle biológico, sugerindo investigações futuras sobre subprodutos fermentativos e interações planta-patógeno. Técnicas avançadas como LC-MS e aprendizado de máquina são cruciais para análises metabólicas e otimização de processos.
- O desenvolvimento de bioprocessos para a produção e formulação de bioinsumos baseados em *Streptomyces solisilvae* MG04 envolve estratégias que maximizem a produção de esporos e/ou metabólitos secundários, considerando condições fermentativas e desafios de escalonamento. Formulações líquidas e sólidas demandam estratégias específicas, incluindo a escolha de carreadores, estabilizantes e adjuvantes para proteção do ativo, garantindo viabilidade técnico-financeira e estabilidade do produto.
- A validação agronômica da atividade biológica de bioinsumos é essencial em todas as etapas do desenvolvimento, desde a caracterização inicial até o posicionamento agronômico, garantir que alterações no processo ou formulação não comprometam a eficácia. Além disso, recomenda-se avaliar o comportamento do bioinsumo em diferentes escalas agrícolas e condições edafoclimáticas, definindo a dose, número e momento de aplicação, bem como sua integração com defensivos químicos e aplicação em outras culturas e sistemas agrícolas.

REFERÊNCIAS

ABO-ZAID, G. A.; MATAR, S. M.; ABDELKHALEK, A. Induction of Plant Resistance against Tobacco Mosaic Virus Using the Biocontrol Agent *Streptomyces cellulosa* Isolate Actino 48. **Agronomy**, v. 10, n. 11, p. 1620, 22 out. 2020.

AGÊNCIA SENADO. Sancionada regulamentação dos bioinsumos. Disponível em: < <https://www12.senado.leg.br/noticias/materias/2024/12/26/sancionada-regulamentacao-dos-bioinsumos>. Acesso em: 20/01/2025

AHSAN, T. *et al.* Screening, identification, optimization of fermentation conditions, and extraction of secondary metabolites for the biocontrol of *Rhizoctonia Solani* AG-3. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 31, n. 1, p. 91–98, 2 jan. 2017.

AHSAN, T. *et al.* Screening, and Optimization of Fermentation Medium to Produce Secondary Metabolites from *Bacillus amyloliquefaciens*, for the Biocontrol of Early Leaf Spot Disease, and Growth Promoting Effects on Peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Journal of Fungi**, v. 8, n. 11, p. 1223, 20 nov. 2022.

BAO, L. *et al.* Novel Strobilurin Derivatives Containing Carboxylate Unit as Potential Antifungal Agents. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 17, n. 3, p. 300–311, 27 mar. 2020.

BARTLETT, D. W. *et al.* The strobilurin fungicides. **Pest Management Science**, v. 58, n. 7, p. 649–662, 23 jul. 2002.

BEJARANO, A.; PUOPOLO, G. Bioformulation of Microbial Biocontrol Agents for sustainable Agriculture. Em: [s.l: s.n.]. p. 275–293.

BERTÊ, R. *et al.* Genome Mining Reveals High Biosynthetic Potential of Biocontrol Agent *Bacillus velezensis* B.BV10. **Genes**, v. 13, n. 11, p. 1984, 30 out. 2022.

Bhat, A. M. *et al.* (2024). Comparative genomics studies provide insights into the taxonomic classification and secondary metabolic potential of five bioactive *Streptomyces* species isolated from the North-Western Himalaya. **bioRxiv**, 2024-05.

BULGARI, D. *et al.* Genome mining approaches reveal secondary metabolites in *Streptomyces* sp. related to biocontrol activity. 2023.

BULLOCK, J. Challenging the Formulator: Biocontrol and Conventional Crop Protection. **Outlooks on Pest Management**, v. 31, n. 3, p. 132–136, 1 jun. 2020.

BUSH, M. J. *et al.* Hyphal compartmentalization and sporulation in *Streptomyces* require the conserved cell division protein SepX. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 71, 10 jan. 2022a

CAMACHO, C. *et al.* BLAST+: architecture and applications. **BMC Bioinformatics**, v. 10, n. 1, p. 421, 15 dez. 2009.

CASTRO, R. A. *et al.* Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 382, 28 dez. 2014.

CHAE, W.-B. *et al.* Enhancing the sporulation of *Streptomyces kasugaensis* by culture optimization. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 26, n. 2, p. 438–443, 12 mar. 2009.

CHALLIS, G. L.; RAVEL, J. Coelichelin, a new peptide siderophore encoded by the *Streptomyces coelicolor* genome: structure prediction from the sequence of its non-ribosomal peptide synthetase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 187, n. 2, p. 111–114, jun. 2000.

CHEN, J. *et al.* Response Surface Methodology (RSM) Mediated Optimization of Medium Components for Mycelial Growth and Metabolites Production of *Streptomyces alfaiae* XN-04. **Microorganisms**, v. 10, n. 9, p. 1854, 16 set. 2022a.

CHEN, X. *et al.* Absolute Metabolite Quantification Using Pure Shift NMR: Toward Quantitative Metabolic Profiling of Aqueous Biological Samples. **Analytical Chemistry**, v. 94, n. 43, p. 14974–14984, 1 nov. 2022b.

CHEN, M.; XIA, J. Optimization parameters for efficient scale-up of fermentation process. Em: **Scale-up and Chemical Process for Microbial Production of Plant-Derived Bioactive Compounds**. [s.l.] Elsevier, 2024. p. 29–42.

CHOI, O. *et al.* Negatively Regulated Aerobactin and Desferrioxamine E by Fur in *Pantoea ananatis* Are Required for Full Siderophore Production and Antibacterial Activity, but Not for Virulence. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 88, n. 6, 22 mar. 2022.

DE BRUIJN, I. *et al.* Massetolide A Biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 8, p. 2777–2789, 15 abr. 2008.

DILWORTH, M. J. *et al.* *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae produces a novel cyclic trihydroxamate siderophore, vicibactin. **Microbiology**, v. 144, n. 3, p. 781–791, 1 mar. 1998.

DOW, L. *et al.* *Streptomyces* and their specialised metabolites for phytopathogen control – comparative in vitro and in planta metabolic approaches. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, 14 jun. 2023.

EMANNUEL OLIVEIRA VIEIRA, M. *et al.* Unlocking plant defenses: Harnessing the power of beneficial microorganisms for induced systemic resistance in vegetables – A systematic review. **Biological Control**, v. 188, p. 105428, jan. 2024.

FERRO, L. S. *et al.* A scalable approach to absolute quantitation in metabolomics., 13 set. 2024.

GOMES, R. C. *et al.* Purification of a thermostable endochitinase from *Streptomyces* RC1071 isolated from a cerrado soil and its antagonism against phytopathogenic fungi.

Journal of Applied Microbiology, v. 90, n. 4, p. 653–661, abr. 2001.

GODOY, C. V. *et al.* Eficiência de fungicidas para o controle da mancha-alvo, *Corynespora cassiicola*, na cultura da soja, na safra 2022/2023: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. **Circular técnica 194**, 2023.

GORIS, J. *et al.* DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 81–91, 1 jan. 2007.

GUINOSSI, H. DAS M. *et al.* Spatial dispersal of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soybean fields. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, n. 1, p. 44–49, fev. 2012.

HAGGAG, W. M.; ABO EL SOUD, M. Production and Optimization of *Pseudomonas fluorescens*; Biomass and Metabolites for Biocontrol of Strawberry Grey Mould. **American Journal of Plant Sciences**, v. 03, n. 07, p. 836–845, 2012.

HALLIWELL, B.; CHEAH, I. K.; TANG, R. M. Y. Ergothioneine – a diet-derived antioxidant with therapeutic potential. **FEBS Letters**, v. 592, n. 20, p. 3357–3366, 15 out. 2018.

HATA, E. M.; YUSOF, M. T.; ZULPERI, D. Induction of Systemic Resistance against Bacterial Leaf Streak Disease and Growth Promotion in Rice Plant by *Streptomyces shenzhenesis* TKSC3 and *Streptomyces* sp. SS8. **The Plant Pathology Journal**, v. 37, n. 2, p. 173–181, 1 abr. 2021.

IQBAL, S.; ULLAH, N.; JANJUA, H. A. In Vitro Evaluation and Genome Mining of *Bacillus subtilis* Strain RS10 Reveals Its Biocontrol and Plant Growth-Promoting Potential. **Agriculture**, v. 11, n. 12, p. 1273, 15 dez. 2021.

JALAL, M. A. F.; LOVE, S. K.; HELM, D. N. ?-Dimethylcoprogens Three novel trihydroxamate siderophores from pathogenic fungi. **Biology of Metals**, v. 1, n. 1, p. 4–8, 1988.

JARMUSCH, S. A. *et al.* Secondary metabolites shape *Streptomyces* - *Streptomyces* interaction: Mass Spectrometry Imaging reveals lydicamycins broadly induce sporulation., 2 jul. 2024.

JUNKER, B. H. *et al.* Early phase process scale-up challenges for fungal and filamentous bacterial cultures. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 119, n. 3, p. 241–277, dez. 2004.

KESWANI, C. *et al.* Formulation Technology of Biocontrol Agents: Present Status and Future Prospects. Em: **Bioformulations: for Sustainable Agriculture**. New Delhi: Springer India, 2016. p. 35–52.

KIEPAS, A. B.; HOSKISSON, P. A.; PRITCHARD, L. **16S rRNA phylogeny and clustering is not a reliable proxy for genome-based taxonomy in *Streptomyces*.**, 15 ago. 2023.

KIM, D.-R.; KWAK, Y.-S. Optimization of Culture and Sporulation for Two Plant Beneficial Streptomyces Strains. **Research in Plant Disease**, v. 29, n. 2, p. 174–183, 30 jun. 2023.

KLENK, H.-P.; GÖKER, M. En route to a genome-based classification of Archaea and Bacteria? **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 175–182, jun. 2010.

KOMAKI, H. Recent Progress of Reclassification of the Genus Streptomyces. **Microorganisms**, v. 11, n. 4, p. 831, 24 mar. 2023.

KULOTHUNGAN, G. An overview of downstream processing in biologics. Em: **Bioreactor Design Concepts for Viral Vaccine Production**. [s.l.] Elsevier, 2024. p. 181–201.

KUMAR, P. *et al.* Insights into the mechanism of mycelium transformation of *Streptomyces toxytricini* into pellet., 1 fev. 2023.

LAJTAI-SZABÓ, P. *et al.* The role of physical support in secondary metabolite production by Streptomyces species. **Biochemical Engineering Journal**, v. 185, p. 108495, jul. 2022.

LASKER, K. Preprint Highlight: Hyphal compartmentalization and sporulation in Streptomyces require the conserved cell division protein SepX. **Molecular Biology of the Cell**, v. 33, n. 5, 1 maio 2022.

LATHA, S.; SIVARANJANI, G.; DHANASEKARAN, D. Response surface methodology: A non-conventional statistical tool to maximize the throughput of Streptomyces species biomass and their bioactive metabolites. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 567–582, 3 set. 2017.

LAW, J. W.-F. *et al.* Taxonomic and Characterization Methods of Streptomyces: A Review. **Progress In Microbes & Molecular Biology**, v. 1, n. 1, 14 dez. 2018.

LEE, I. *et al.* ContEst16S: an algorithm that identifies contaminated prokaryotic genomes using 16S RNA gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2053–2057, 1 jun. 2017.

LEE, G. Y.; SHI, J. Effect of Substrate Characteristics on Bacterial Growth and Sporulation of Two Biocontrol Microorganisms during Solid State Cultivation; 2018 Detroit, Michigan July 29 - August 1, 2018. Anais...St. Joseph, MI: **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, 2018.

LEE, G. Y. *et al.* Effect of Substrate Characteristics on the Growth and Sporulation of Two Biocontrol Microorganisms during Solid State Cultivation. **Fermentation**, v. 6, n. 3, p. 69, 17 jul. 2020.

LIU, L.-L. *et al.* Genome-based analysis of the type II PKS biosynthesis pathway of xanthones in *Streptomyces caelestis* and their antifungal activity. **RSC Advances**, v. 9, n. 64, p. 37376–37383, 2019c.

LEGGETT, M. *et al.* Formulation of microbial biocontrol agents – an industrial perspective. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 33, n. 2, p. 101–107, 11 abr. 2011.

LI, Y. *et al.* New metabolites from *Streptomyces pseudovenezuelae* NA07424 and their potential activity of inducing resistance in plants against *Phytophthora capsici*. **Pest Management Science**, v. 79, n. 1, p. 349–356, 13 jan. 2023.

LIU, D. *et al.* Antifungal, Plant Growth-Promoting, and Genomic Properties of an Endophytic Actinobacterium *Streptomyces* sp. NEAU-S7GS2. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 10 set. 2019.

LIU, H. *et al.* Medium Optimization for Spore Production of a Straw-Cellulose Degrading Actinomyces Strain under Solid-State Fermentation Using Response Surface Method. **Sustainability**, v. 12, n. 21, p. 8893, 27 out. 2020.

MANCERA-LÓPEZ, M. E. *et al.* Polymeric Encapsulate of *Streptomyces* Mycelium Resistant to Dehydration with Air Flow at Room Temperature. **Polymers**, v. 15, n. 1, p. 207, 31 dez. 2022.

MANCERA-LÓPEZ, M. E.; BARRERA-CORTÉS, J. Influence of Chitosan on the Viability of Encapsulated and Dehydrated Formulations of Vegetative Cells of Actinomycetes. **Polymers**, v. 16, n. 19, p. 2691, 24 set. 2024.

MANDENIUS, C.; BRUNDIN, A. Bioprocess optimization using design - of - experiments methodology. **Biotechnology Progress**, v. 24, n. 6, p. 1191 – 1203, 24 nov. 2008.

MEIER-KOLTHOFF, J. P. *et al.* TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. D1, p. D801–D807, 7 jan. 2022.

MELIN, P.; SCHNÜRER, J.; HÅKANSSON, S. Formulation and stabilisation of the biocontrol yeast *Pichia anomala*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 1, p. 107–112, 28 jan. 2011.

MELOTTO, M.; UNDERWOOD, W.; HE, S. Y. Role of Stomata in Plant Innate Immunity and Foliar Bacterial Diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v. 46, n. 1, p. 101–122, 1 set. 2008.

MEYER, M. C. *et al.* Avaliação da associação de fungicidas químicos e biológicos no controle de doenças foliares da soja, safra 2023/2024: resultados sumarizados da rede de experimentos cooperativos. 2024.

MITCHELL, D. A.; BEROVIČ, M.; KRIEGER, N. (EDS.). Solid-State Fermentation Bioreactors. Berlin, Heidelberg: **Springer Berlin Heidelberg**, 2006.

MITROVIĆ, I. *et al.* Production of plant protection agents in medium containing waste glycerol by *Streptomyces hygroscopicus*: Bioprocess analysis. **Acta Alimentaria**, v.

49, n. 3, p. 270–277, 27 set. 2020.

MITROVIĆ, I. *et al.* Utilization of waste glycerol for the production of biocontrol agents nigericin and niphimycin by *Streptomyces hygroscopicus*: bioprocess development. **Environmental Technology**, v. 43, n. 19, p. 3000–3013, 24 ago. 2022.

MONTOYA-MARTÍNEZ, A. C. *et al.* Genomic mining for the identification of promising mechanisms of bioactivity in biological control agents. Em: **Biocontrol Agents for Improved Agriculture**. [s.l.] Elsevier, 2024. p. 143–163.

MOORE, W. E. C. *et al.* Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 463–464, 1 out. 1987.

NOUIOUI, I. *et al.* (2018). Genome-based taxonomic classification of the phylum Actinobacteria. **Frontiers in microbiology**, 9, 2007.

OLMOS, E. *et al.* Effects of bioreactor hydrodynamics on the physiology of *Streptomyces*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 3, p. 259–272, 25 mar. 2013.

PAN, J. *et al.* Identification, fermentation optimization, and biocontrol efficacy of actinomycete YG-5 for the prevention of *Alternaria* leaf spot disease in star anise. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 18621, 10 ago. 2024.

PETRUS, M. L. C. *et al.* Sorting of *Streptomyces* Cell Pellets Using a Complex Object Parametric Analyzer and Sorter. **Journal of Visualized Experiments**, n. 84, 13 fev. 2014.

RANJAN, A. *et al.* Nature's Antimicrobial Arsenal: Non-Ribosomal Peptides from PGPB for Plant Pathogen Biocontrol. **Fermentation**, v. 9, n. 7, p. 597, 26 jun. 2023.

RAO, Y. K. *et al.* Medium optimization of carbon and nitrogen sources for the production of spores from *Bacillus amyloliquefaciens* B128 using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 4, p. 535–541, abr. 2007.

REHAN, M. *et al.* In Silico Prediction of Secondary Metabolites and Biosynthetic Gene Clusters Analysis of *Streptomyces thinghirensis* HM3 Isolated from Arid Soil. **Fermentation**, v. 9, n. 1, p. 65, 12 jan. 2023.

RICHTER, M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 45, p. 19126–19131, 10 nov. 2009.

RISDIAN, C.; MOZEF, T.; WINK, J. Biosynthesis of Polyketides in *Streptomyces*. **Microorganisms**, v. 7, n. 5, p. 124, 6 maio 2019.

RUSSI, A.; GRANADA, C. E.; SCHWAMBACH, J. Optimization of *Bacillus velezensis* S26 sporulation for enhanced biocontrol of gray mold and anthracnose in postharvest

strawberries. **Postharvest Biology and Technology**, v. 210, p. 112737, abr. 2024.

SABERI - RISEH, R.; MORADI - POUR, M. A novel encapsulation of *Streptomyces fulvissimus* Uts22 by spray drying and its biocontrol efficiency against *Gaeumannomyces graminis*, the causal agent of take - all disease in wheat. **Pest Management Science**, v. 77, n. 10, p. 4357–4364, 19 out. 2021.

SABERI RISEH, R.; MORADI POUR, M.; AIT BARKA, E. A Novel Route for Double-Layered Encapsulation of *Streptomyces fulvissimus* Uts22 by Alginate–Arabic Gum for Controlling of *Pythium aphanidermatum* in Cucumber. **Agronomy**, v. 12, n. 3, p. 655, 8 mar. 2022.

SAKDAPETSIRI, C. *et al.* Solid-state fermentation, storage and viability of *Streptomyces similanensis* 9X166 using agro-industrial substrates against *Phytophthora palmivora* -induced black rot disease in orchids. **Biocontrol Science and Technology**, v. 29, n. 3, p. 276–292, 4 mar. 2019.

SANJIVKUMAR, M. *et al.* Biosynthesis, statistical optimization and molecular modeling of chitinase from crab shell wastes by a mangrove associated actinobacterium *Streptomyces olivaceus* (MSU3) using Box-Behnken design and its antifungal effects. **Bioresource Technology Reports**, v. 11, p. 100493, set. 2020.

SARETHY, I. P.; SAHARAN, A. Genomics, proteomics and transcriptomics in the biological control of plant pathogens: a review. **Indian Phytopathology**, v. 74, n. 1, p. 3–12, 4 mar. 2021.

SHEPHERDSON, E. M. F.; ELLIOT, M. A. Redefining development in *Streptomyces* bacteria: integrating exploration into the classical sporulating life cycle., 23 ago. 2023.

SINGHAL, M. *et al.* Macrolide antibiotics. Em: **Antibiotics - Therapeutic Spectrum and Limitations**. [s.l.] Elsevier, 2023. p. 167–181.

SPENCE, E. L. *et al.* A standardised bioassay method using a bench-top spray tower to evaluate entomopathogenic fungi for control of the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*. **Pest Management Science**, v. 76, n. 7, p. 2513–2524, 12 jul. 2020.

STACKEBRANDT, E. *et al.* Authors Need to be Prudent When Assigning Names to Microbial Isolates. **Current Microbiology**, v. 78, n. 12, p. 4005–4008, 10 dez. 2021.

STANBOROUGH, T. *et al.* Vibrio ferrin production by the food spoilage bacterium *Pseudomonas fragi*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 365, n. 6, 1 mar. 2018.

SWIONTEK BRZEZINSKA, M. *et al.* Characterization of chitinase from *Streptomyces luridiscabiei* U05 and its antagonist potential against fungal plant pathogens. **Journal of Phytopathology**, v. 167, n. 7–8, p. 404–412, 24 ago. 2019.

TABER, D. F.; SHETH, R. B.; TIAN, W. Synthesis of (+)-Coronafacic Acid. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 74, n. 6, p. 2433–2437, 20 mar. 2009.

TAHA, M. *et al.* Evaluation of the Effectiveness of Soil *Streptomyces* Isolates for Induction of Plant Resistance Against Tomato mosaic virus (ToMV). **Current Microbiology**, v. 78, n. 8, p. 3032–3043, 14 ago. 2021.

TEIXIDÓ, N.; USALL, J.; TORRES, R. Insight into a Successful Development of Biocontrol Agents: Production, Formulation, Packaging, and Shelf Life as Key Aspects. **Horticulturae**, v. 8, n. 4, p. 305, 4 abr. 2022.

TORRES-RODRIGUEZ, J. A. *et al.* Actinomycete Potential as Biocontrol Agent of Phytopathogenic Fungi: Mechanisms, Source, and Applications. **Plants**, v. 11, n. 23, p. 3201, 23 nov. 2022.

TRAN, H. *et al.* Role of the cyclic lipopeptide massetolide A in biological control of *Phytophthora infestans* and in colonization of tomato plants by *Pseudomonas fluorescens*. **New Phytologist**, v. 175, n. 4, p. 731–742, 25 set. 2007.

TURTOI, E. *et al.* Analysis of polar primary metabolites in biological samples using targeted metabolomics and LC-MS. **STAR Protocols**, v. 4, n. 3, p. 102400, set. 2023.

VANDENBERGHE, L. P. S. *et al.* Solid-state fermentation technology and innovation for the production of agricultural and animal feed bioproducts. **Systems Microbiology and Biomanufacturing**, v. 1, n. 2, p. 142–165, 14 abr. 2021.

VAN DISSEL, D.; CLAESSEN, D.; VAN WEZEL, G. P. Morphogenesis of *Streptomyces* in Submerged Cultures. Em: [s.l: s.n.]. p. 1–45.

WANG, M. *et al.* *Streptomyces* Strains and Their Metabolites for Biocontrol of Phytopathogens in Agriculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 72, n. 4, p. 2077–2088, 31 jan. 2024.

WANG, Z.; ZHU, H.; XIONG, W. Advances in mass spectrometry-based multi-scale metabolomic methodologies and their applications in biological and clinical investigations. **Science Bulletin**, v. 68, n. 19, p. 2268–2284, out. 2023.

YÁÑEZ-MENDIZÁBAL, V.; FALCONÍ, C. E.; KANALEY, K. Production optimization of antifungal lipopeptides by *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 using low-cost optimized medium. **Biological Control**, v. 185, p. 105306, out. 2023.

YANG, Q. *et al.* Localization analysis of metabolites from complex biological samples—recent analytical technique of mass spectrometry imaging. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 10, 21 abr. 2023.

YANG, X. *et al.* Optimization of fermentation conditions to increase the production of antifungal metabolites from *Streptomyces* sp. KN37. **Microbial Cell Factories**, v. 24, n. 1, p. 26, 20 jan. 2025.

YARZA, P. *et al.* Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n.

9, p. 635–645, 14 set. 2014.

ZACCHETTI, B.; SMITS, P.; CLAESSEN, D. Dynamics of Pellet Fragmentation and Aggregation in Liquid-Grown Cultures of *Streptomyces lividans*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 11 maio 2018.

ZHU, H. *et al.* Spectrophotometric analysis of bioactive metabolites and fermentation optimization of *Streptomyces* sp. HU2014 with antifungal potential against *Rhizoctonia solani*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, v. 37, n. 1, p. 231–242, 10 mar. 2023.

ZIEMERT, N.; ALANJARY, M.; WEBER, T. The evolution of genome mining in microbes – a review. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 8, p. 988–1005, 2016.

ZYDNEY, A. L. Continuous downstream processing for high value biological products: A Review. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 113, n. 3, p. 465–475, 27 mar. 2016.