

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

MARIA EDUARDA PAVANI FERREIRA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS COM POTENCIAL PARA
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL E BIOCONTROLE**

SÃO CARLOS

2025

MARIA EDUARDA PAVANI FERREIRA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS COM POTENCIAL PARA
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL E BIOCONTROLE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como parte dos requisitos para a obtenção do
título de Bacharel em Biotecnologia pela
Universidade Federal de São Carlos.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava

SÃO CARLOS

Dezembro - 2025

À minha mãe, pelo apoio e por sempre
estar presente quando preciso,
e ao meu pai, por me estimular a crescer,
inovar e pensar no futuro.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe e ao meu pai, por sempre me apoiarem, estarem presente e fornecer o suporte que precisei para chegar aqui hoje.

Ao meu irmão, Kiko, pelo amor, carinho e por deixar a vida mais interessante.

Às minhas amigas, Taissa e Duda, pela companhia, apoio e presença que fizeram a minha graduação ser a melhor possível.

À minha família, com todos os meus primos, por me fortalecerem e darem a confiança de ser o meu melhor.

Ao meu orientador de TCC, Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava, pela orientação, suporte e estímulo de sempre buscar o melhor trabalho.

À minha orientadora de IC, Dra. Sônia Nogueira, pelo ensino e apresentação à área de fitopatógenos que busco aprender cada vez mais.

Ao analista Dr. Wilson Malagó da Embrapa Pecuária Sudeste, pelo apoio e indispensáveis ensinamentos durante a minha iniciação científica.

Aos professores da graduação em Biotecnologia da UFSCar, tudo que me ensinaram me formou como cientista e levarei durante toda minha carreira.

Aos pesquisadores Dra. Cecília Beatriz, Dr. João Paulo e Me. Guilherme, que me auxiliaram durante todo o estágio na Agrivalle e me permitiram avançar no pensamento científico. Muito obrigada.

À equipe do P&D da empresa Agrivalle, todos da equipe me acolheram, valorizaram e ensinaram mais do que podia esperar. Evolui e aprendi muito com vocês.

Agradeço, por fim, a Agrivalle, que me permitiu crescer profissionalmente e desenvolver esse trabalho com excelência, pelo fornecimento dos materiais e infraestrutura necessária e pela disponibilização do acervo de microrganismos utilizados na pesquisa.

RESUMO

O sistema de agricultura industrial utiliza produtos químicos para combater doenças e enriquecer solos empobrecidos a fim de aumentar a produtividade do campo. São necessárias maiores doses a cada safra devido a indução de resistência em fitopatógenos e insetos-pragas agrícolas e contínuo esgotamento do solo. Uma alternativa são produtos baseados em microrganismos que realizem o controle biológico de fitopatógenos e insetos-pragas ou capazes de fornecer nutrientes às plantas por meio de processos biológicos de solubilização e fixação de elementos essenciais ao desenvolvimento vegetal. A pesquisa se dedicou a isolar, identificar e avaliar o potencial *in vitro* de fungos inibirem o crescimento micelial de fungos fitopatogênicos, produzirem a auxina ácido indol-3-acético (AIA) e a capacidade de solubilizar fósforo inorgânico. Os fungos foram avaliados para antagonismo contra os fitopatógenos *Fusarium graminearum*, *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*, com inibição por pareamento de culturas e de metabólitos difusíveis. A solubilização de fósforo foi avaliada quantitativamente com a realização de cultivo líquido contendo fosfato de cálcio, de ferro e de alumínio, formas insolúveis muito recorrentes no solo brasileiro. A produção de AIA foi avaliada em cultivo contendo triptofano, estimulador da produção desse fitormônio. As cepas isoladas foram identificadas como dos gêneros *Cladosporium*, *Entomortierella*, *Fusarium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pochonia* e *Purpureocillium*. Entre os 10 isolados fúngicos obtidos, 8 foram capazes de solubilizar pelo menos um dos fosfatos testados, com 4 deles solubilizando os 3 fosfatos inorgânicos. O isolado de *Penicillium* foi o maior solubilizador, atingindo 503 µg/mL de fósforo solúvel após 14 dias. Na inibição de fitopatógenos, 7 isolados inibiram no mínimo 3 dos fitopatógenos, com 2 isolados inibindo os 5 fitopatógenos. O isolado do gênero *Purpureocillium* inibiu todos os fitopatógenos no pareamento de culturas e foi o único a inibir 2 fungos com ação de metabólitos. Capazes de produzirem AIA foram 3 isolados dos gêneros *Cladosporium*, *Entomortierella* e *Mucor*. O maior produtor foi do gênero *Mucor* com 18,59 µg/mL após 14 dias.

Palavras-chaves: Ácido indol-3-acético, controle biológico, promoção de crescimento vegetal e solubilização de fósforo inorgânico.

ABSTRACT

The industrial agriculture system utilizes chemical products to fight diseases and enrich nutrient-deficient soil to boost productivity. Bigger doses are used every cycle, given the resistant phytopathogens and agricultural pests that emerge and continual soil depletion. An alternative is microorganisms-based products that are capable of biological pest and phytopathogen control or capable of providing plant nutrition by biological solubilization and fixation of essential nutrients. This research applied itself to the isolation, identification, and evaluation of *in vitro* potential of fungi to inhibit phytopathogenic fungi mycelial growth, produce the auxin indole-3-acetic acid (IAA) and solubilize inorganic phosphorus. The fungi were evaluated for antagonistic action against the phytopathogens *Fusarium graminearum*, *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia sclerotiorum*, with inhibition by culture pairing and metabolic action. Phosphorus solubilization was assayed quantitatively in liquid media containing calcium, aluminum and iron phosphates, insoluble forms present in Brazilian soil. IAA production was evaluated in media containing tryptophan, stimulant for this phytohormone. The isolates were identified as the genera *Cladosporium*, *Entomortierella*, *Fusarium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pochonia* and *Purpureocillium*. Between the 10 fungal isolates 8 of them could solubilize at least one phosphorus source, with 4 isolates solubilizing all 3 inorganic phosphates. The *Penicillium* isolate was the biggest solubilizer, with reaching 503 µg/mL of soluble phosphorus after 14 days. For phytopathogen inhibition, 7 isolates inhibited at least 3 of the phytopathogen, with 2 antagonists inhibiting all five. The *Purpureocillium* isolate inhibited all the phytopathogen assessed in the culture pairing and inhibited two of them by metabolics action. Only 3 isolates could produce IAA, from the genera *Cladosporium*, *Entomortierella* and *Mucor*. The biggest IAA producter was the *Mucor* isolate with 18,59 µg/mL after 14 days.

Key-words: Biological control, indole-3-acetic acid, inorganic phosphate solubilization, plant growth promotion.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DA METODOLOGIA DO ENSAIO DE ANTAGONISMO POR PAREAMENTO DE CULTURAS.....	18
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO DA METODOLOGIA DO ENSAIO DE ANTAGONISMO POR METABÓLITOS DIFUSÍVEIS.....	19
FIGURA 3 - FOTOGRAFIAS DOS 10 ISOLADOS ESTUDADOS.....	24
FIGURA 4 - FOTOGRAFIAS DO TESTE DE ANTAGONISMO POR PAREAMENTO DE CULTURAS.....	26
FIGURA 5 - FOTOGRAFIAS DO TESTE DE INIBIÇÃO POR METABÓLITOS DIFUSÍVEIS CONTRA OS PATÓGENOS <i>Macrophomina phaseolina</i> E <i>Rhizoctonia solani</i>	27

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - MEIO DE CULTIVO LÍQUIDO NATIONAL BOTANICAL RESEARCH INSTITUTE PHOSPHORUS (NBRIP).....	20
TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DO REAGENTE DE TRABALHO UTILIZADO PARA QUANTIFICAR O FÓSFORO SOLUBILIZADO POR MICRORGANISMOS.....	21
TABELA 3 - COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES UTILIZADAS NO REAGENTE DE TRABALHO.....	21
TABELA 4 - COMPOSIÇÃO DAS DILUIÇÕES QUE COMPÕEM A CURVA PADRÃO...	22
TABELA 5 - IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO GÊNERO DOS ISOLADOS.....	25
TABELA 6 - DADOS OBTIDOS NO TESTE DE ANTAGONISMO POR PAREAMENTO DE CULTURAS.....	25
TABELA 7 - DADOS OBTIDOS NO TESTE DE PRODUÇÃO DE AIA.....	28
TABELA 8 - DADOS OBTIDOS NO TESTE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO.....	28

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 CONTROLE BIOLÓGICO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS	11
2.2 SOLUBILIZAÇÃO BIOLÓGICA DE FOSFATOS.....	13
2.3 PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO.....	14
3 OBJETIVOS	15
3.1 OBJETIVO GERAL.....	15
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
4 MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 ISOLAMENTO DAS CEPAS.....	16
4.2 POTENCIAL ANTAGONISTA.....	17
4.2.1 ANTAGONISMO POR PAREAMENTO DE CULTURAS	17
4.2.2 ANTAGONISMOS POR METABÓLITOS DIFUSÍVEIS	18
4.3 PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO.....	19
4.4 SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS INORGÂNICOS	20
5 RESULTADOS.....	23
5.1 ISOLAMENTO E ISOLADOS SELECIONADOS.....	23
5.2 COMPORTAMENTO ANTAGONISTA	24
5.2.1 PAREAMENTO DE CULTURAS.....	24
5.2.2 METABÓLITOS DIFUSÍVEIS	25
5.3 PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO.....	26
5.4 SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS INORGÂNICOS	27
6 DISCUSSÃO	28
6.1 GÊNEROS IDENTIFICADOS.....	28
6.2 POTENCIAL DE BIOCONTROLE	30
6.3 POTENCIAL PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL	31
7 CONCLUSÃO.....	32
8 PERSPECTIVAS FUTURAS	33
9 REFERÊNCIAS.....	34

1 INTRODUÇÃO

Os agricultores lidam com diversos desafios para aumentar a produtividade nas suas culturas, investindo contra as perdas por doenças ou devido à baixa concentração de nutrientes essenciais para o desenvolvimento vegetal. Produtos químicos são utilizados em altíssimos volumes para balancear esses dois desafios, na forma de pesticidas e fertilizantes químicos. Porém, eles podem causar desequilíbrios no meio ambiente, prejudicar a saúde humana ou causar resistências nos microrganismos que infectam as plantas (Silva e Silva, 2016).

Nesse cenário, temos a busca por microrganismos que realizem o controle biológico de fitopatógenos. Algumas doenças fúngicas se destacam pelo seu nível de dano econômico, rápida disseminação ou dificuldade de controle, como fungos dos gêneros *Fusarium*, *Macrophomina*, *Rhizoctonia* e *Sclerotinia* (Agápto *et al*, 2021). A partir da análise de microrganismos relacionados à plantas foram descobertos diversos fungos antagonistas, capazes de controlar os fungos fitopatogênicos através de mecanismos de antibiose, micoparasitismo e/ou competição (Benítez *et al*, 2004).

A promoção de crescimento vegetal por microrganismos é essencial para reduzir a aplicação de fertilizantes químicos. Para a estimulação da produção vegetal o fósforo (P) é um mineral importante, envolvido na fotossíntese, respiração e diversos processos metabólicos, sendo captado no solo pelas plantas. Porém, a baixa solubilidade e concentração do P o tornam nutriente limitante para o crescimento vegetal (Lindsay *et al*, 1989). Algumas bactérias e fungos são capazes de solubilizar os fosfatos presentes no solo e tornar uma maior parte do P presente biodisponível. Já os fitormônios, como o ácido indol-3-acético (AIA), são capazes de regular as atividades fisiológicas de plantas, influenciando diversos processos do desenvolvimento vegetal, como a diferenciação e divisão celular (Teale *et al*, 2006). O AIA pode ser produzido por microrganismos no solo e absorvido pelas raízes, estimulando o desenvolvimento de toda a planta.

A investigação da atividade de microrganismos nas competências citadas é fundamental no cenário atual, trazendo novos ingredientes ativos para o mercado de bioinsumos de base microbiana e estimulando a produção agrícola do país.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONTROLE BIOLÓGICO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Os fungos são capazes de infectar plantas e se nutrem de nutrientes disponíveis na planta hospedeira para sobrevivência e são classificados como fungos fitopatogênicos (FFs), podendo ser biotróficos – obtém nutriente de células vivas do hospedeiro ou necrotófico – causam necrose na planta para sobrevivência (Michereff *et al*, 2005). Além disso, diversos FFs são polípagos – capazes de infectar múltiplas espécies e gêneros – o que dificulta o controle através de estratégias de manejo, como rotação de culturas e podem apresentar comportamento saprotrófico – habilidade para sobreviver em matéria orgânica morta – sobrevivendo ao período entre safras.

Algumas doenças fúngicas se destacam pelo seu nível de dano econômico, rápida disseminação ou dificuldade do controle. Na revisão realizada por Agápto *et al* em 2021, as espécies de fitopatógenos *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* foram destaque como principais causadores de doenças nas maiores culturas agrícolas brasileiras, como soja, milho, café e feijão.

O *Sclerotinia sclerotiorum* é um fungo que infecta a planta através do contato de ascósporos nas flores e folhas. Com a depleção de nutrientes, o fungo produz escleródios, estruturas de resistências formadas por hifas agregadas, melanina e outros compostos, que podem sobreviver no solo por vários anos (Smolińska; Kowalska, 2018). É um FF polífago, capaz de infectar mais de 400 espécies de plantas que incluem soja, alface, batata e feijão (Boland; Hall, 1994). Os escleródios são capazes de sobreviver a entre safras no solo, e a diversidade de hospedeiros, oferecendo poucas oportunidades de rotação de culturas, dificultam o controle da doença por estratégias de manejo tradicionais. A resistência dos escleródios a degradação biológica, química e física diminuem as oportunidades de controle com químicos (Smolińska; Kowalska, 2018).

Macrophomina phaseolina é um fungo polífago, capaz de infectar mais de 500 espécies (Gupta *et al*, 2012), que sobrevive no solo por até 3 anos por meio de estruturas de resistências chamadas microesclerócios. É capaz de sobreviver ao período entre safras através dos microesclerócios ou se nutrindo de restos vegetais deixados no solo (saprotrófico). *M. phaseolina* infecta as plantas pelas raízes e tem sua infecção favorecida por solos compactados, altas temperaturas e períodos de seca, condições que já prejudicam o plantio sem considerar a doença (Embrapa, 2014).

O gênero *Fusarium* tem importância na saúde de plantas e na saúde humana. Causam diversas fusarioses em plantas de importância econômica e doenças, como micoses, em humanos. Algumas espécies, como *F. graminearum*, são capazes de produzir micotoxinas que afetam a planta e causam doenças e fatalidades se forem consumidas (Aoki *et al*, 2014), devendo ser rastreadas nos alimentos, a fim de evitar contaminar alimentos e pessoas (Leplat *et al*, 2012). Dentro do gênero existem complexos de espécies de importância agrônômica, como *F. oxysporum* e *F. solani*, com algumas espécies eleitas entre os 10 fungos patógenos de plantas mais importantes para a agricultura (Dean *et al*, 2021). São fitopatógenos de quase todas as plantas cultivadas atualmente, com complexos de espécies infectando diferentes alvos, como cereais, soja e tomate.

O patógeno *Rhizoctonia solani* tem como hospedeiro mais de 10 famílias de plantas, incluindo culturas de soja, algodão, batata e café. É um fungo de solo necrotrófico que pode causar podridão nas hastes, sementes, vagens ou raízes, entre outros sintomas de infecção (Ajayi-Oyetunde; Bradley, 2017). Apresenta dificuldade no controle ao produzir estruturas de resistências que sobrevivem no solo ou micélio que se mantém em resíduos vegetais durante entre safras (saprotrófico) e a ampla gama de hospedeiros impede o manejo da doença por meio da rotação de culturas, embora essas duas estratégias ajudem na diminuição dos inóculos. Em arroz, a infecção por *R. solani* é a segunda mais impactante para a produção, causando até 50% de perda da produção (Senapati *et al*, 2022). A agressividade do fitopatógeno, alta diversidade de hospedeiros e dificuldade de eliminar os inóculos demonstram a posição da *R. solani* como um importante agente causal.

Analisando a comunidade microbiana de plantas hospedeiras suscetíveis a fitopatógenos foram descobertos diversos fungos antagonistas, capazes de controlar os FFs por meio de mecanismos de antibiose, micoparasitismo ou competição, descritos por Benítez *et al* (2004). A antibiose ocorre com a produção de metabólitos que inibem o crescimento do FF e o micoparasitismo é a interação do antagonista e FF, em que o antagonista consegue degradar a parede celular do FF e metabolizar os restos celulares. Por fim, a competição é o resultado de dois fungos que ocupam o mesmo nicho ecológico, o que resulta no impedimento de crescimento após o nicho ser ocupado pelo antagonista (Benítez *et al*, 2004).

No presente estudo, procuramos investigar a ação antagonista dos fungos isolados em relação aos fitopatógenos mencionados, com maior investigação do método de antibiose.

2.2 SOLUBILIZAÇÃO BIOLÓGICA DE FOSFATOS

O fósforo é um mineral importante para o desenvolvimento de organismos, sendo diretamente envolvido na síntese de ácidos nucleicos e de ATP, o estoque de energia das células. Para as plantas o fósforo (P) influencia na fotossíntese, respiração e diversos processos metabólicos, além da sua importância celular, sendo necessária sua captação do solo. A baixa solubilidade e concentração do P no solo o tornam nutriente limitante para o crescimento vegetal, o que é agravado pela presença de fosfatos inorgânicos, que não podem ser acessados pelas plantas (Lindsay *et al*, 1989; Pedrino *et al*, 2025).

O cálcio é o mineral primário de diversas rochas e com o tempo forma fosfatos de cálcio no solo. Com o tempo, a lixiviação de íons de cálcio leva a formação de outros fosfatos, como de alumínio e ferro (Lindsay *et al*, 1989). Agricultores utilizam a fertilização com P para remediar esse problema, porém a alta fixação e imobilização do P no solo, devido a presença de Al, Fe e Ca solúveis presentes que irão formar fosfatos insolúveis, tornam necessário altas doses de fertilização constante (Lindsay *et al*, 1989; Lacava; Machado; de Andrade, 2021; Pedrino *et al.*, 2025).

Os microrganismos são de extrema importância para mitigar o desafio da adubação excessiva, pois eles são capazes de solubilizar os fosfatos presentes no solo e tornar uma maior parte do P presente biodisponível. Os fungos ganham destaque nesse objetivo em relação as bactérias, pois além de solubilizarem fósforo podem aumentar a captação de P já presente no solo. As hifas de fungos filamentosos se estendem além dos pelos radiculares no solo, penetrando poros menores e aumentando significativamente a área de absorção de nutrientes das plantas. As hifas são capazes de captar nutrientes e transportar eles até os pelos da raiz, auxiliando na nutrição vegetal (Zou *et al*, 2019). Conforme mostrado por Xiao *et al* (2013) e Prasad *et al* (2023), alguns fungos são capazes de solubilizar fosfato *in vitro*. A cepa de *Aspergillus niger* estudada por Xiao *et al* (2013) também foi capaz de aumentar o crescimento e absorção de fosfato de plantas quando aplicado *in vivo*, exemplificando a relação possível entre resultados *in vitro* e *in vivo*.

Fungos solubilizadores podem, como citado acima, aumentar a porcentagem de fósforo disponível e a captação de fósforo pela planta por área, levando a investigação dessa aptidão nesse estudo.

2.3 PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO

As atividades fisiológicas de plantas são, na grande maioria, reguladas por fitormônios, que incluem, mas não limitado, o ácido abscísico, etileno, auxinas, citocininas e giberelinas (Duca; Glick, 2020). As auxinas, descobertas em 1935 por Frits Warmolt Went, são uma importante classe capaz de induzir a diferenciação, crescimento e divisão celular, além de influenciar o ciclo e funcionamento vegetal. A principal molécula dessa classe é o ácido indol-3-acético (AIA), auxina predominante nas plantas e capaz de influenciar diversos processos do desenvolvimento vegetal. As auxinas também podem levar ao declínio de plantas, um exemplo sendo a auxina sintética 2,4D, um dos herbicidas mais utilizados no mundo (Teale *et al*, 2006).

Os fungos são importantes promotores de crescimento, produtores de metabólitos secundários e outros compostos que podem estimular o desenvolvimento vegetal (Silva, 2024). O AIA produzido por fungos pode induzir raízes laterais e pelos radiculares, aumentando a área superficial necessária para a absorção de nutrientes, resultando em crescimento de biomassa (Fu *et al*, 2015).

Assim, é de extrema importância investigarmos novos produtores de AIA, sendo um dos objetivos da atual pesquisa.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Esse estudo procurou isolar microrganismos do solo brasileiro e estabelecer as aptidões desses isolados fúngicos com potencial para produção de bioinsumos, avaliando as habilidades de promoção de crescimento vegetal e controle biológico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar fungos presentes no solo brasileiro;
- Avaliar a ação antagonista dos isolados contra *Fusarium graminearum*, *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*, fungos fitopatogênicos de solo das principais culturas agrícolas;
- Investigar possíveis modos de ação da atividade antagonista, como atividade de metabólitos difusíveis;
- Determinar a capacidade de solubilização dos fosfatos inorgânicos $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 e AlPO_4 , os três principais fosfatos presentes em solo brasileiro;
- Analisar a produção de ácido indol-3-acético *in vitro*, a principal auxina de plantas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS

O trabalho foi realizado em parceria com a empresa Agrivalle (<https://agrivalle.com.br/>), que disponibilizou a infraestrutura, treinamento técnico e agentes biológicos necessários para a realização desta pesquisa.

Os fungos investigados nesse trabalho foram obtidos de um isolamento de solo de plantações de hortifruti em Minas Gerais, localização 21,1364° S , 43,72098° O, em regiões com infestações por nematoides. Foram obtidas 10 amostras de solo em locais de plantações de hortifruti, como tomate e morango, trazidas para análise no laboratório da Agrivalle, Indaiatuba, SP. O isolamento foi realizado baseado na metodologia de Silva (2024), com modificações. Cada amostra foi diluída em 100 mL de solução salina Tween (10 g NaCl, 5 g Tween 80 em 1L de água destilada), em erlenmeyer, sendo agitada por 1 hora a 150 rpm no shaker. Em seguida, dentro do fluxo laminar, foram realizadas diluições seriadas de cada amostra, até a diluição n^{-5} . Todas as diluições foram plaqueadas em placas de Petri com meio de cultura não seletivo NA (Ágar Nutriente).

As placas foram incubadas em BOD (demanda biológica de oxigênio) a 28°C por 5 dias. Após o crescimento de microrganismos, foram selecionados aleatoriamente de todas as diluições e transferidos para novas placas de Petri, nomeado o repique R0, em meio BDA (Batata Dextrose Ágar). Seguiu-se com repiques R1 até R4, conforme necessidade e no meio adequado, para purificação dos isolados.

Após verificação da pureza, foi realizada a preservação. A preservação foi feita com discos de micélio obtidos de placas de BDA de cada isolado produzida após a purificação, sendo preservado 5 discos de micélio em um criotubo com 500 µL de glicerina 20%, em triplicata (Borges *et al*, 2023).

Os isolados foram nomeados seguindo um código padrão, em que a letra inicial é o tipo de microrganismo (F para fungos), a segunda letra é determinada para cada isolamento (nesse isolamento, foi escolhida a letra G) e o número identificador segue a sequência em que foram isolados.

Após a preservação dos fungos, eles foram enviados para sequenciamento da região altamente conservada ITS com a empresa ByMyCell (<https://bymycell.com.br/>), que realizou a extração de DNA, amplificação do segmento ITS, sequenciamento do amplificado e

identificação do gênero das amostras com a comparação em banco de dados. A amplificação da região ITS por PCR é uma técnica muito utilizada para identificação de fungos e por isso foi escolhida pela empresa para ser utilizada. As regiões dos espaçadores ITS apresentam alta variabilidade intraespécie e intragênero, que permite a diferenciação de gêneros e espécies próximos filogeneticamente, e são flanqueadas por genes ribossomais altamente conservados que possibilitam o desenho de primers reconhecidos pela maioria dos fungos. Existem grandes bancos de dados com sequências ITS da maior parte dos fungos conhecidos, favorecendo o uso dessa região para reconhecimento (Ekwomadu; Mwanza, 2023).

4.2 POTENCIAL ANTAGONISTA

4.2.1 ANTAGONISMO POR PAREAMENTO DE CULTURAS

Foram selecionados 5 fitopatógenos de solo da coleção de culturas microbianas da Agrivalle para avaliação de potencial antagonista dos fungos, escolhidos considerando a sua predominância nas culturas em campo e seu potencial de dano econômico. Os fungos fitopatogênicos são *Fusarium graminearum*, *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*.

O ensaio foi realizado com a metodologia de pareamento de culturas (De Paula; Paiva; Lacava, 2021; Pedrino, 2023). Os fungos antagonistas e fitopatógenos foram crescidos previamente, repicados em placa com meio BDA e incubados por 7 dias em BOD.

Em placas de meio BDA colocamos um disco de micélio, em torno de 8mm de diâmetro, de um antagonista e um disco (8mm) de FFs em pontos diametralmente opostos, cerca de 0,5 cm da borda. As placas foram, então, incubadas a 25°C por 7 dias ou até o patógeno crescer por toda a superfície da placa controle, composta somente pelo disco do fitopatógeno a 0,5 cm da borda da placa. Na figura 1 temos a representação das placas do ensaio. Os tratamentos são compostos do confronto de todos os fitopatógenos com todos os antagonistas, somado de um controle para cada fitopatógeno, totalizando 55 tratamentos, todos em triplicata.

Após o tempo de incubação, medimos o diâmetro de crescimento dos FFs em todos os tratamentos utilizando um paquímetro e calculamos a porcentagem de inibição, de acordo com a equação, obtida da metodologia de De Paula, Paiva, Lacava (2021):

$$\%inibição = \frac{Rc - Rt}{Rc} * 100$$

Em que R_c é o raio de crescimento da placa controle e R_t é o raio de crescimento do FFs no tratamento.

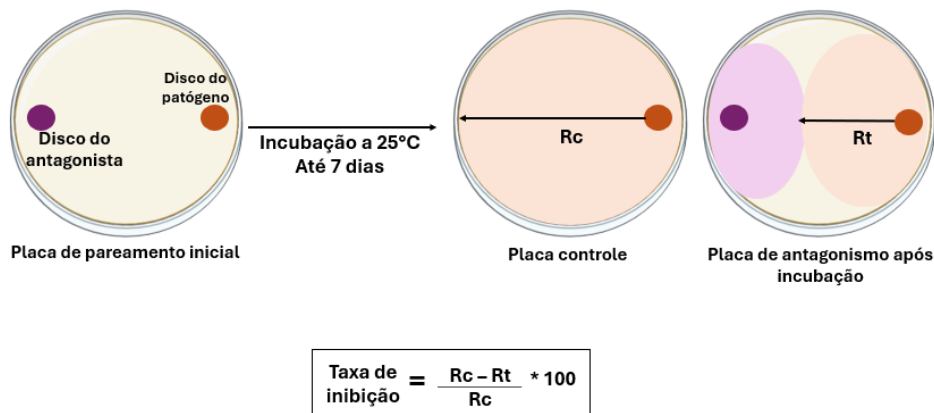


Figura 1 - Representação da metodologia do ensaio de antagonismo por pareamento de culturas.

Fonte: Feito pela autora, modificado de De Paula, Paiva, Lacava (2021).

4.2.2 ANTAGONISMOS POR METABÓLITOS DIFUSÍVEIS

Além do método de pareamento de culturas, investigamos um possível modo de ação da atividade antagonista apresentada pelos fungos. Para avaliarmos a produção de metabólitos modificamos a metodologia realizada por Quiroga, Sampietro, Vattuone (2001), substituindo o extrato alcoólico pelo sobrenadante do cultivo líquido fúngico. Cultivamos os fungos em 100 mL de meio líquido Batata-Dextrose (BD), utilizando como inóculo 1 mL de uma suspensão de esporos padronizada para 10^5 esporos/mL, produzida a partir de placas com micélio crescidas anteriormente e determinando a concentração em uma câmara de Neubauer. Os cultivos foram inoculados e incubados por 7 dias em shaker a 150rpm e 25°C.

Após os 7 dias, os cultivos foram centrifugados a 15.000g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi filtrado com filtros microbiológicos de poro 0.22 μm para eliminar quaisquer células e esporos.

Em placas de meio BDA retiramos discos de ágar em quatro posições equidistantes na placa para agirem como poços onde foram pipetados os sobrenadantes filtrados, posicionando no centro da placa um disco de micélio do fungo fitopatogênico. Pipetamos 50 μL do filtrado nos poços, sendo que em cada um dos 4 poços era de um antagonista diferente, conforme a figura 2 demonstra.

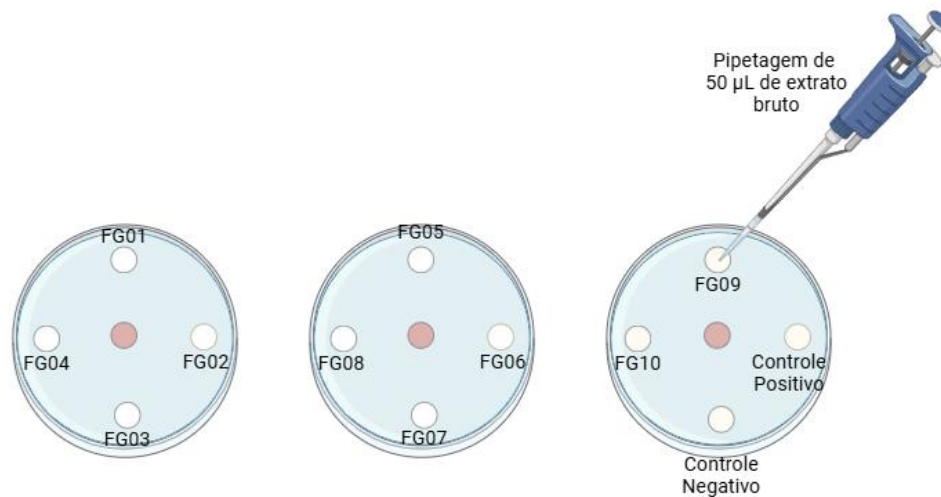


Figura 2 - Representação da metodologia do ensaio de antagonismo por metabólitos difusíveis.

Fonte: Feito pela autora.

O experimento foi realizado em triplicata, com um controle positivo feito com Nistatina, um antifúngico difusível altamente eficaz pipetado no poço de uma das placas, e um controle negativo em um dos poços, em que não foi pipetado nenhum composto.

Após 7 dias, foi analisado o crescimento dos FFs em torno dos poços dos metabólitos em relação aos controles, avaliando qualitativamente casos de inibição do crescimento micelial pelos tratamentos. Para avaliar a inibição foi considerado halos de inibição em torno dos poços e crescimento micelial desacelerado, comparando com os controles positivo e negativo.

4.3 PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO

A quantidade de ácido indol-3-acético (AIA) produzida pelos fungos foi avaliada após crescimento em meio BD 10% acrescido de 1mg/mL de L-triptofano, estimulante da produção dessa auxina, de acordo com o método realizado por Silva (2024), modificando o método de inóculo dos cultivos. Erlenmeyers com 50 mL do meio foram inoculados com 500µL de uma suspensão de esporos padrão de 10^5 esporos/mL, padronizada utilizando a câmara de Neubauer. O cultivo foi realizado em triplicata para cada fungo testado.

Os cultivos foram incubados por 14 dias em shaker a 150rpm e 25°C, sendo realizadas leituras da produção de AIA após 7, 12 e 14 dias de crescimento. Em cada um dos

dias foi retirado uma amostra de 1 mL dos cultivos em fluxo laminar, que foram centrifugados por 10 minutos a 10.000g.

Foi montada então uma reação colorimétrica em uma placa de 96 poços com o reagente de Salkowski, preparado de acordo com a metodologia de Gordon e Weber (1951). Foi acrescentado 50 µL do sobrenadante dos tratamentos e 100 µL do reagente de Salkowski. Na placa também foi adicionado um branco, em que foi pipetado 50 µL de água ao invés do sobrenadante dos tratamentos, e uma curva padrão, produzida com diferentes diluições da solução inicial de 1mg/ml de AIA comercial em etanol 100%, para correlação das absorbâncias obtidas com uma concentração de AIA produzido. A placa foi incubada por 30 minutos no escuro após a adição do reagente e lida em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 530nm.

As absorbâncias obtidas para os tratamentos foram subtraídas do valor do branco e comparadas contra a curva padrão, para obtenção da concentração de AIA produzida.

4.4 SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS INORGÂNICOS

Avaliamos quantitativamente a capacidade dos fungos solubilizarem o fósforo ligado a três metais diferentes: ferro, alumínio e cálcio. Para isso, realizamos um cultivo com o meio National Botanical Research Institute Phosphorus (NBRIP) (Nautiyal, 1999) com diferentes fontes de fosfatos para cada uma das avaliações, conforme Tabela 1. Foram utilizados fosfato de ferro diidratado, fosfato de alumínio ou fosfato de cálcio, usando a mesma quantidade de cada um no seu respectivo teste.

Reagentes	Quantidade (g/L)
Cerelose	10
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ / $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ / AlPO_4	5
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5
KCl	0,2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,1
Água MilliQ	1 L

Tabela 1 - Meio de cultivo NBRIP líquido, pH = 7,0.
Fonte: Elaborada pela autora com base em Nautiyal, 1999.

O ensaio foi montado em triplicata, com 50 mL do meio NBRIP em cada Erlenmeyer, inoculados com 100 μ L de uma suspensão de esporos padronizada com auxílio da câmara de Neubauer para 10^5 esporos/mL. Os cultivos foram incubados por 14 dias em um shaker a 150 rpm e 25°C. Junto dos tratamentos, 3 erlenmeyers sem inóculo foram incubados e utilizados como controle.

Para avaliação da solubilização de fósforo, foi utilizado um reagente de trabalho descrito na Tabela 2 abaixo. Para composição desse reagente, as soluções tiveram que ser preparadas previamente, de acordo com a Tabela 3. A solução de ácido ascórbico e o reagente de trabalho tem que ser preparados no momento de uso, sem poder serem armazenados.

Reagentes	Volume a ser adicionado
Ácido sulfúrico 5M	12,5 mL
Solução de molibdato de amônio	3,75 mL
Solução de ácido ascórbico	7,5 mL
KCl	0,2
Solução de tartarato de potássio e antimônio	1,25 mL

Tabela 2 - Composição do reagente de trabalho utilizado para quantificar o fósforo solubilizado por microrganismos. O reagente foi produzido no momento de leitura da amostra e deve ser mantido por no máximo 24 horas em frasco de cor âmbar ou protegido da luz.

Fonte: Elaborada pela autora com base em Murphy e Riley, 1962.

Reagente	Quantidade	Volume de água MiliQ	Validade
Ácido sulfúrico concentrado	70 mL	500 mL	1 ano
Molibdato de amônio	4 g	100 mL	30 dias
Ácido ascórbico	0,132 g	7,5 mL	24 horas
Tartarato de antimônio e potássio	0,273 g	100 mL	90 dias

Tabela 3 - Composição das soluções utilizadas no reagente de trabalho. O ácido sulfúrico foi produzido dentro de capela de exaustão, adicionando lentamente o volume do ácido em um volume menor de água, com agitação e resfriamento, sendo completado o volume de água após a adição de todo o ácido.

Fonte: Elaborada pela autora com base em Murphy e Riley, 1962.

No dia da inoculação foi realizada a leitura da absorbância do meio de cultivo, que será subtraído das leituras seguintes, já que a agitação do shaker pode solubilizar uma porcentagem do fosfato. A reação é feita com 100 μ L do reagente de trabalho, 100 μ L do meio de cultivo e

1,8mL de água miliQ; após uma incubação de 40 minutos, pode ser realizada a medição da absorvância no espectrofotômetro a 725nm.

Para poder relacionar a absorvância das amostras e a concentração de fósforo em $\mu\text{g/mL}$ foi feita uma curva padrão, que deve ser realizada antes de todas as leituras, devido a produção de um novo reagente de trabalho. Foi realizada uma diluição de uma solução estoque de fósforo, diluindo 0,1757 g de fosfato de potássio monobásico em 1L de água miliQ. Os pontos da curva padrão estão descritos na Tabela 4. Após a diluição dos pontos da curva, em microtubos de 2mL, adicionei 100 μL da diluição, 100 μL do reagente de trabalho e 1,8mL de água miliQ. Foram incubados por 40 minutos antes de realizar a leitura da absorvância no espectrofotômetro a 725 nm.

Volume solução estoque de P (em μL)	Volume Água MilliQ (em μL)	Concentração final ($\mu\text{g/mL}$)
100	900	4
200	800	8
300	700	12
400	600	16
500	500	20
600	400	24
700	300	28
800	200	32
900	100	36
1000	-	40

Tabela 4 - Composição das diluições que compõem a curva padrão.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para avaliação dos tratamentos, realizei amostragem no 7^o, 12^o e 14^o dias de cultivo, retirando 1 mL do cultivo em um microtubo de 1,5mL. Centrifuguei as amostras a 10.000 rpm por 10 minutos. Foi montado, para cada réplica em um microtubo de 2mL, a reação contendo 100 μL do reagente de trabalho, 100 μL do sobrenadante da amostra e 1,8 mL de água miliQ. O controle, incubado no shaker junto com os tratamentos, porém sem ser inoculado, foi medido junto das amostras.

Os resultados obtidos de todos os dias foram comparados e analisados para determinar os fungos capazes de solubilizar fósforo ligado aos três metais escolhidos, avaliando também a taxa de solubilização em razão do tempo de incubação.

5 RESULTADOS

5.1 ISOLAMENTO E ISOLADOS SELECIONADOS

Após o isolamento inicial obtivemos 17 fungos. Porém, algumas amostras não cresceram em repiques seguintes o que resultou em 10 fungos finais.

Os fungos obtidos e utilizados nesse trabalho seguiram a nomenclatura FG01, FG02, FG03, FG04, FG05, FG06, FG07, FG08, FG09 e FG10. Durante a realização dos ensaios, os fungos foram enviados a empresa ByMyCell para identificação molecular por sequenciamento da região ITS. O relatório enviado pela empresa identificou os isolados como pertencentes à gêneros detalhados na Tabela 5. A imagem 3 contém fotografias de todos os isolados.

Código isolados	Gênero identificado
FG01	<i>Penicillium</i>
FG02	<i>Purpureocillium</i>
FG03	<i>Pochonia</i>
FG04	<i>Paecilomyces</i>
FG05	<i>Entomortierella</i>
FG06	<i>Cladosporium</i>
FG07	<i>Fusarium</i>
FG08	<i>Mucor</i>
FG09	<i>Fusarium</i>
FG10	<i>Mucor</i>

Tabela 5 - Identificação molecular do gênero dos 10 isolados.

Fonte: Elaborada pela autora.

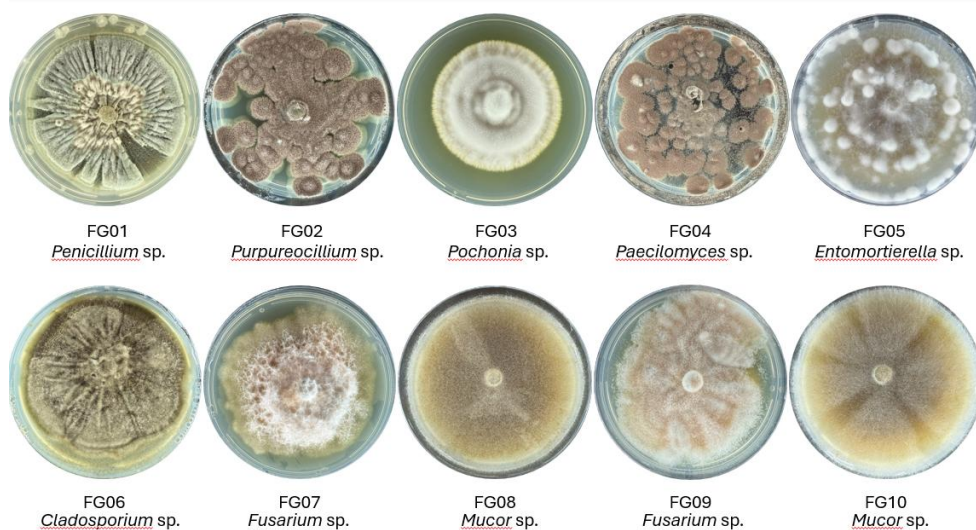


Figura 3 - Fotografias dos 10 isolados estudados. Na imagem temos fotografias de cada um dos isolados, identificados com sua codificação e com o gênero que foi identificado.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2 COMPORTAMENTO ANTAGONISTA

5.2.1 PAREAMENTO DE CULTURAS

Em relação ao pareamento de culturas, calculamos a taxa de inibição de cada um dos antagonistas contra os 5 FFs. Foi considerado como taxa mínima de controle eficiente do patógeno uma inibição de 40%. Os dados obtidos estão resumidos na Tabela 6.

Amostras	Antagonismo por pareamento (% de inibição)				
	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Macrophomina phaseolina</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
FG01	7,33	41,19	39,19	43,19	50,75
FG02	43,13	46,94	48,69	42,50	44,75
FG03	0,00	30,38	36,81	31,31	0,00
FG04	39,13	44,44	42,88	32,69	43,75
FG05	0,00	46,19	51,50	51,56	49,63
FG06	0,00	27,25	26,94	0,00	27,81
FG07	26,56	34,75	39,06	31,75	29,38
FG08	52,50	44,44	57,38	49,75	50,31
FG09	37,50	28,50	46,56	38,75	40,50
FG10	38,69	47,85	32,00	53,69	52,69

Tabela 6 - Dados obtidos no teste de antagonismo por pareamento de culturas. A média da taxa de inibição de cada tratamento está representada com os isolados nas fileiras e os fitopatógenos nas colunas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Alguns fungos foram considerados destaques. As cepas FG02 e FG08 foram capazes de controlar todos os fitopatógenos testados, além de serem as duas capazes de controlar a *Sclerotinia sclerotiorum* (considerando uma eficiência de 40%, com as FG04, FG09 e FG10 atingindo valores próximos ao corte). A cepa FG05 controlou 4 dos fitopatógenos e teve crescimento micelial por cima do *Fusarium graminearum*, *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani*. Algumas cepas também apresentaram halos de inibição significativos contra os tratamentos, porém com controle abaixo de 40%.

Como resultados negativos, tivemos as cepas FG03, FG06 e FG07 que não inibiram acima de 40% nenhum dos FFs testados. A figura 4 contém fotografias de alguns dos tratamentos realizados.

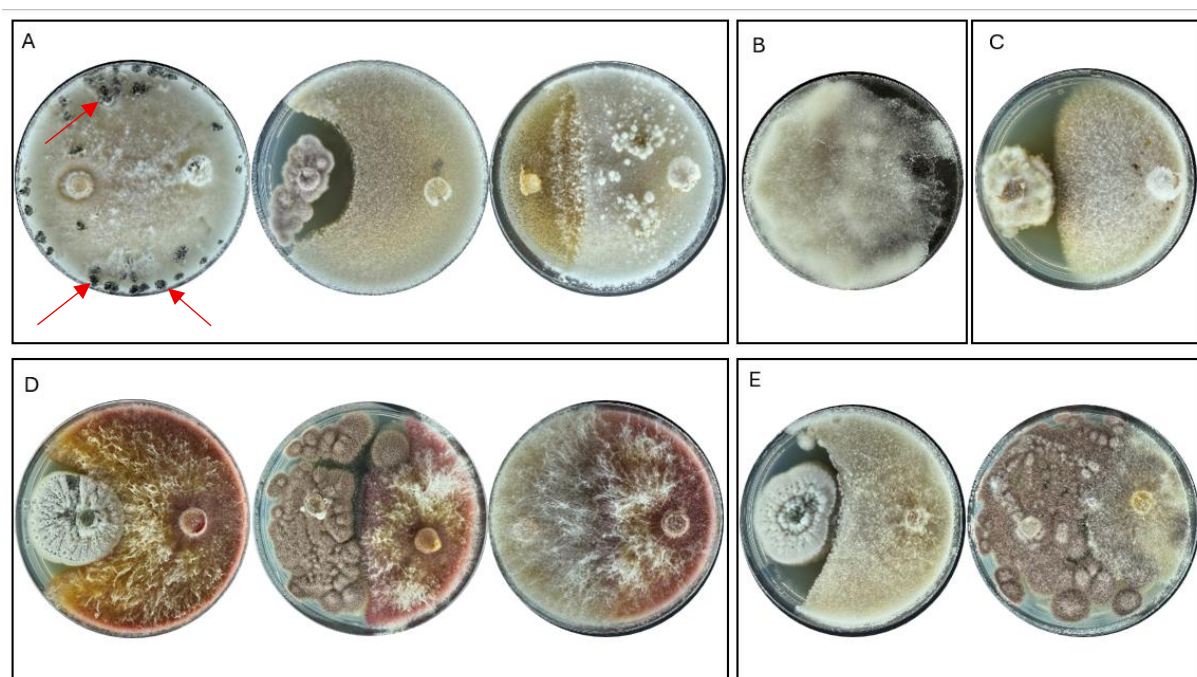


Figura 4 - Fotografias do teste de antagonismo por pareamento de culturas. A figura 4. A mostra a interação da *Sclerotinia sclerotiorum* contra os fungos FG03, FG04 e FG05, respectivamente. Notamos com o FG03 a inibição completa do antagonista e a formação de escleródios pelo patógeno, com alguns escleródios indicados pelas setas vermelhas na imagem. Na segunda placa, temos a formação de um halo de inibição e a produção de escleródios completamente inibida pelo FG04. O FG08, na última placa, obteve 40% de controle e não vemos escleródios. Na figura 4.B temos o FG05 contra a *Macrophomina phaseolina*, com crescimento do micélio do antagonista por cima do patógeno, indicando uma competição ou micoparasitismo. A figura 4.C mostra o *Fusarium solani* com o FG09 e uma formação de halo inibitório impedindo o avanço do FF. O conjunto 4.D nos mostra a *F. graminearum* interagindo com FG01, FG04 e FG08, da esquerda para a direita. Podemos observar inibição micelial do FF no centro da placa e alteração da coloração do seu micélio próximo ao antagonista, indicando uma relação de competição e possível resposta metabólica a presença do outro fungo. A imagem 4.E mostra a *Rhizoctonia solani* com os fungos FG01 e FG02, nessa ordem, com a formação de halo de inibição pelo FG01 e grande inibição micelial pelo FG02, com micélio do antagonista crescendo sobre e interagindo com a região de desenvolvimento inicial do FF.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.2 METABÓLITOS DIFUSÍVEIS

O teste de avaliação da ação de metabólitos difusíveis foi pensado devido a presença de halos no teste de pareamento de culturas. Tivemos como resultados positivos somente o fungo FG02 conseguindo inibir o crescimento dos fitopatógenos *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani*, possível visualizar na Figura 5.

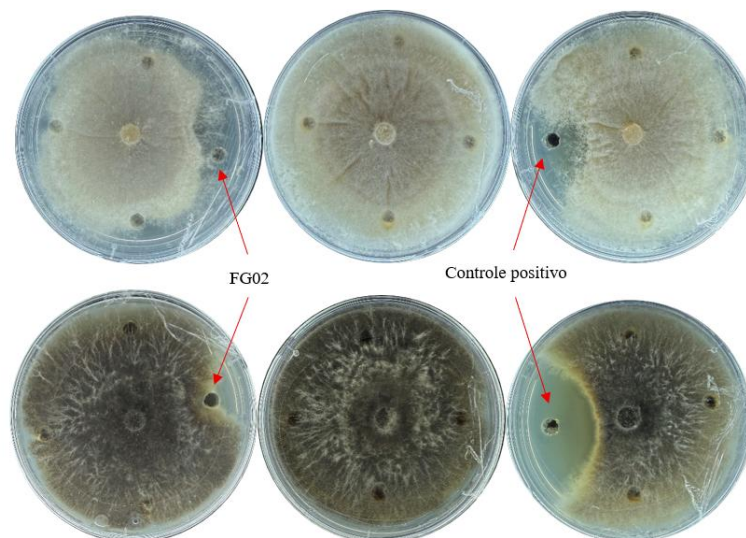


Figura 5 - Fotografias do teste de inibição por metabólitos difusíveis contra os patógenos *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani*. Na fileira de cima temos os tratamentos contra o fungo *R. solani*, e na fileira de baixo com a *M. phaseolina*. Da esquerda para direita, temos as placas com tratamento dos fungos FG01 a FG04, FG05 a FG08 e por fim FG09, FG10 e os controles positivo e negativo. Está destacado com setas vermelhas os tratamentos de FG02, que apresentaram resultado positivo, e os poços com o controle positivo para comparação.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.3 PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO

Das 10 cepas testadas, somente os isolados FG05, FG07 e FG10 apresentaram produção de AIA em valores significativos dentro desse estudo, conforme dados na Tabela 7. Os isolados FG01, FG08 e FG09 tiveram leitura em alguns dias do teste, porém com valores próximos ao mínimo da curva padrão e não constantes, considerado um resultado não significativo.

Amostras	Produção de AIA (ug/ml)		
	7 dias	12 dias	14 dias
FG01	-	4,08	4,08
FG02	-	-	-
FG03	-	-	-
FG04	-	-	-
FG05	4,44	14,27	13,79
FG06	-	-	-
FG07	-	12,76	11,66
FG08	6,56	-	-
FG09	-	4,11	-
FG10	-	14,77	18,59

Tabela 7 - Dados obtidos no teste de produção de AIA. Média da concentração de AIA produzido em $\mu\text{g/mL}$ por cada isolado após 7, 12 e 14 dias de cultivo. Células com traço (-) obtiveram absorvância abaixo do valor mínimo da curva padrão, sem produção de AIA.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.4 SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS INORGÂNICOS

A capacidade de solubilização de fosfatos inorgânicos foi avaliada durante 14 dias para 3 tipos de fosfatos. Os resultados estão agrupados na Tabela 8. A interação com o fosfato de cálcio obteve os melhores resultados, apresentando maior número de cepas capazes de solubilizá-lo e maiores concentrações de fósforo solúvel. O isolado FG01 foi o destaque do experimento, alcançando 503 μg de fósforo solúvel por mL. O FG05 teve um bom desempenho, com valor final de 58 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Como resultado negativo tivemos somente os fungos FG03 e FG10, que não demonstraram capacidade de solubilizar o fosfato de cálcio, e nem as outras duas fontes de fosfato.

Amostras	Solubilização de Fosfatos ($\mu\text{g}/\text{mL}$ de fósforo solúvel)								
	Cálcio			Ferro			Alumínio		
	7 dias	12 dias	14 dias	7 dias	12 dias	14 dias	7 dias	12 dias	14 dias
FG01	45,41	462,82	503,82	-	-	-	18,83	19,87	19,76
FG02	18,52	23,36	23,61	17,15	9,18	9,62	15,79	17,99	17,11
FG03	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FG04	9,73	15,30	18,17	11,64	6,56	5,51	16,45	17,68	17,84
FG05	28,56	57,91	58,34	-	-	-	-	-	-
FG06	12,86	17,56	19,58	-	-	-	15,99	17,57	17,70
FG07	14,41	16,06	17,33	19,72	21,15	28,10	16,25	14,91	16,50
FG08	-	24,27	27,98	-	-	-	-	-	4,74
FG09	14,90	10,97	13,48	18,85	19,34	23,90	18,52	16,09	16,29
FG10	-	-	-	-	-	-	-	-	3,67
Controle	-	-	-	19,62	13,77	15,13	5,48	3,66	5,76

Tabela 8 - Dados obtidos no teste de solubilização de fosfato. Média da concentração de fósforo solubilizado em $\mu\text{g}/\text{mL}$ por cada isolado após 7, 12 e 14 dias de cultivo, dividido nas fontes de fosfato (cálcio, ferro e alumínio) avaliadas. Células com traço (-) obtiveram absorvância abaixo do valor mínimo da curva padrão, sem P solúvel.

Fonte: Elaborada pela autora.

O meio realizado com alumínio teve resultados medianos, com 6 isolados fúngicos obtendo níveis significativos de solubilização de fósforo, entre 15 e 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O fosfato de ferro foi o mais difícil de ser solubilizado, a grande maioria das amostras apresentou baixa ou nenhuma concentração de fósforo. Além disso, o meio realizado para controle, sem inoculante, reagiu e teve concentração considerável de P solúvel. Assim, somente os isolados FG07 e FG09 foram capazes de solubilizar o fosfato de ferro, com concentrações de 13 e 8,77 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente, subtraindo o valor medido no controle.

6 DISCUSSÃO

6.1 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

A análise da região ITS identificou os gêneros dos fungos que estão sendo estudados. Foram identificados 8 gêneros distintos, alguns fungos cosmopolitas comumente presentes em amostras de solo, como *Cladosporium*, *Fusarium* e *Penicillium*.

O gênero *Penicillium* é um fungo muito conhecido pela sua produção de metabólitos secundários, a partir do qual foi descoberto o primeiro antibiótico, a penicilina, em 1929 por Alexander Fleming. O isolado FG01, pertencente a esse gênero, teve resultados consolidados pela literatura, já sendo observada a capacidade de espécies de *Penicillium* em promoção de crescimento vegetal e biocontrole, especialmente ligado ao modo de antibiose (Toghueo e Boyom, 2020). Algumas espécies desse gênero também são capazes de realizar biorremediação no solo, reduzindo o número de metais pesados livres, e tem ação inseticida (Toghueo e Boyom, 2020). É importante notar que esse gênero é capaz de infectar plantas e animais, principalmente relacionado a infecções oportunistas, como crescimento de mofo em frutos armazenados em condições favoráveis ao seu desenvolvimento ou associado a micoses em pacientes imunossuprimidos (Agrolink, 2025; Paterson *et al*, 2017). Não existem produtos no mercado brasileiro com espécies de *Penicillium* como um ingrediente ativo (Agrolink, 2025).

O gênero *Paecilomyces* é muito estudado, com diversas aptidões de diferentes cepas relacionadas, como ação inseticida e fungicida e estimulação de crescimento e produção de sideróforos (Moreno-Gavira *et al*, 2020). Uma espécie importante no mercado de bioinsumos é a *Purpleocillium lilacinus*, que pertencia ao gênero *Paecilomyces* até sua redesignação para o novo gênero nomeado *Purpleocillium* por Luangsa-ard *et al* (2011). Assim, pesquisas com essa espécie podem ser encontradas com ambos os gêneros dependendo da data de publicação. A espécie *P. lilacinus* é muito utilizada como ingrediente ativo em bioinsumos devido a sua ação nematocida, registrada até o momento em 20 produtos biológicos no Brasil, de acordo com o site Agrolink (<https://www.agrolink.com.br/>). Essa espécie é capaz de penetrar os ovos de nematóides do solo e produzir proteases que degradam a cutícula dos juvenis e adultos. Analisando a morfologia e resultados dos isolados FG02 e FG04, é provável que ambas pertençam ao gênero *Purpleocillium*, sendo necessário investigação do genoma desses dois isolados para confirmação da hipótese. A identificação por ITS pode ter resultado nos gêneros distintos devido a comparação com amostras nomeadas antes de 2011, anterior a criação do novo gênero.

O isolado FG03 pertence ao gênero *Pochonia*, muito estudado em relação a sua ação nematocida. Está presente em 7 produtos registrados no mercado brasileiro, de acordo com o site Agrolink (<https://www.agrolink.com.br/>). O isolado FG05 foi identificado como *Entomortierella*, um gênero pertencente à família Mortierellaceae. É um fungo presente em diversos habitats terrestres, capaz de se desenvolver em regiões alpinas e glaciais com baixa disponibilidade de nutrientes (Szedlacsek *et al*, 2025). Não foram encontrados estudos descrevendo aptidões relacionadas a agricultura para esse gênero.

Os três gêneros *Cladosporium*, *Fusarium* e *Mucor*, identificados nos isolados FG06 a FG10, impossibilitam o uso dessas cepas em bioinsumos, devido ao potencial patogênico de suas espécies. O gênero *Cladosporium* é composto por fungos sapotróficos com relatos de patogenicidade associados principalmente ao armazenamento de produtos e infecções secundárias em plantas (Agrolink, 2025; El-Dawy *et al*, 2021). Foram realizados estudos em outros países sobre seu potencial para biocontrole e indução de resistência em plantas (Chiabub *et al*, 2025), porém no Brasil o risco fitopatogênico impede o avanço do trabalho com espécies do gênero.

Espécies de *Fusarium* são muito estudadas em relação a sua fitopatogenicidade, incluindo um dos fitopatógenos mais importantes para a agricultura, e a sua produção de micotoxinas que causam danos à saúde humana. Devido a esse potencial, a presença de *Fusarium* é monitorada em alimentos constantemente, o que reduz o risco de contaminação (Paterson *et al*, 2017).

O gênero *Mucor*, dos isolados FG08 e FG10, é um importante patógeno humano. Infecções fúngicas costumam não serem danosas em indivíduos imunocompetentes, porém podem ser perigosas em pessoas com imunidade comprometida. A mucormicose, nome da doença associada a esse patógeno, quando desenvolvida em pessoas imunossuprimidas, pode alcançar 68% de mortalidade (Paterson *et al*, 2021). Durante a pandemia da COVID-19 ocorreram aumentos significativos de casos de mucormicose, relacionado ao aumento de pessoas com imunidade comprometida (Cánovas-Marquez *et al*, 2023). Porém, algumas espécies do gênero não têm potencial patogênico e podem ser trabalhadas, com relatos de grande potencial na produção de biodiesel e biorrefinária na produção de lipídeos e enzimas (Reis *et al*, 2019).

6.2 POTENCIAL DE BIOCONTROLE

Os isolados de *Entomortierella*, *Paecilomyces*, *Penicillium* e *Purpureocillium* demonstraram nessa pesquisa alto potencial para biocontrole de fungos fitopatogênicos. Os quatro isolados foram capazes de inibir o crescimento de no mínimo 4 dos 5 fitopatógenos testados com alta taxa de inibição, apresentando características de competição. Deve ser analisado ainda o potencial de micoparasitismo desses fungos sobre os FFs e se existe uma diminuição da esporulação dos FFs.

Embora os isolados FG08 e FG10 tiveram resultados interessantes no pareamento de culturas, pertencem ao gênero *Mucor* e o potencial de patogenicidade impedem a sua composição em um bioinsumos e restringem o trabalho *in vitro* que pode ser realizado, eliminando-as do trabalho.

Em relação a inibição micelial por metabólitos difusíveis em ágar, tivemos como resultado positivo o isolado FG02 identificado como pertencente ao gênero *Purpureocillium*. Esse teste foi realizado após a visualização de halos de inibição no teste de antagonismo de pareamento de cultura, envolvendo os isolados FG01, FG02, FG04, FG06 e FG09. Na literatura, encontramos relatos que citam a produção de metabólitos e antibióticos com ação inibitória por cepas de *Penicillium* (Fleming, 1929; Toghueo *et al*, 2020) e antagonismo por antibiose por cepas de *Paecilomyces* (Moreno-Gavía *et al*, 2020).

O extrato bruto não ter inibido os fitopatógenos no nosso teste pode ter ocorrido devido à baixa concentração dos metabólitos específicos nas condições do cultivo líquido, como tempo de incubação, meio de cultura, presença de luz, temperatura ou agitação. Ainda, o teste de pareamento pode ter modificado o metabolismo ou concentração dos metabólitos produzidos pelo fungo em meio sólido em relação ao meio líquido e a presença do patógeno no pareamento pôde estimular rotas metabólicas específicas. Yang *et al* (2015) descreveu uma metodologia similar a realizada para análise de inibição por metabólitos, porém ao invés de pipetar o extrato bruto em poços na placa de ágar, foi misturado o extrato bruto na proporção de 1:9 no meio de cultura BDA morno, que foi então vertido em placas de Petri. Com esse método, aumenta-se a concentração de metabólitos no meio e consegue uma maior interação desses com o micélio do patógeno, que foi repicado no centro dessas placas. Essa metodologia pode ser uma possibilidade para testar novamente as cepas que apresentaram halos de inibição.

6.3 POTENCIAL PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL

Embora existam relatos de indivíduos do gênero *Pochonia* com aptidões para solubilização de fósforo e produção de hormônios vegetais (Godoy, 2018), o isolado FG03 não apresentou aptidão para promoção de crescimento vegetal nos ensaios realizados. O isolado FG05 apresentou concentração média de produção de AIA nas condições do estudo e foi o segundo maior solubilizador de fosfato de cálcio, junto com o bom desempenho como antagonista o tornam um ótimo candidato para um produto de inoculação no solo. Dos isolados selecionadas para avançarem em teste *in vivo*, o FG05 foi o único com potencial *in vitro* para as três atividades biológicas estudadas.

Os isolados FG02 e FG04 (*Purpureocillium* e *Paecilomyces*) solubilizaram todas as fontes de fosfato. O isolado FG02 solubilizou maiores concentrações de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, seguido por AlPO_4 e por último o FePO_4 , conforme o encontrado na literatura em relação a facilidade de solubilizar essas três fontes de fósforo insolúvel (Suraby *et al*, 2023). O FG04, no entanto, obteve concentrações semelhantes para as três fontes de fosfato, destacável devido à dificuldade mencionada para solubilizar alguns elementos.

O isolado FG01, do gênero *Penicillium*, foi um ótimo solubilizador de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ nessa pesquisa, alcançando 500 $\mu\text{g/mL}$. Ao compararmos com relatos de *Penicillium* solubilizadores de alta eficiência, essa concentração é mediana. Suraby *et al* (2023), descreve uma cepa capaz de atingir 2950 $\mu\text{g/mL}$ em meio com $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e atingiu valores semelhantes à nossa amostra com o FePO_4 , de maior complexidade para ser solubilizado. Mesmo com níveis teóricos mais altos, essa concentração foi a maior obtida até o momento na empresa que o projeto foi desenvolvido e indica o grande potencial da cepa para compor um produto biológico.

Os outros cinco isolados, conforme discutido anteriormente, serão excluídas do processo de desenvolvimento, embora as amostras de *Fusarium* tenham sido capazes de solubilizar as três fontes de ferro em concentrações significativas.

7 CONCLUSÃO

Os dados expostos acima nos permitiram selecionar cepas para seguirem no *pipeline* de desenvolvimento de novos produtos para o agronegócio.

A identificação dos isolados é uma etapa essencial para eliminação de cepas com potencial patogênico para os seres vivos e prevenir custos de desenvolvimento em cepas que não podem compor bioinsumos.

Os isolados FG01, FG02, FG04 e FG05 tiveram desempenhos excelentes nos testes *in vitro* realizados, com alta inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos responsáveis por perdas anuais no agronegócio e aptidão para promoção de crescimento vegetal por meio do fornecimento de nutrientes essenciais e hormônios estimulantes ao desenvolvimento de plantas.

É essencial seguir com as caracterizações dos 4 fungos selecionados para novos potenciais, como produção de sideróforos ou ação nematicida, e a realização de testes *in vivo* para confirmar o potencial notado neste trabalho.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Os fungos analisados no trabalho fazem parte de uma pesquisa para selecionar ingredientes ativos para composição de bioinsumos, buscando aumentar a produtividade agrícola e atender as necessidades dos produtores do país.

É necessário desenvolver etapas de avaliação de patogenicidade eficientes anteriormente a manipulação de microrganismos potencialmente danosos a saúde humana e vegetal. No solo temos diversos patógenos humanos, perigosos desde a avaliação *in vitro*, e fitopatógenos, que devem ser excluídos antes de quaisquer testes *in vivo*.

Seguindo o desenvolvimento de produtos, as cepas com resultados positivo e que podem ser trabalhadas participarão de avaliações *in vivo* para confirmar o potencial notado *in vitro*. Em paralelo, devem ser avaliadas para outras aptidões, como efeito inseticida e nematicida, produção de sideróforos, resposta a estresses abióticos, entre outros. Ainda, outras cepas presentes no acervo da empresa devem ser avaliadas para as mesmas características deste trabalho.

Deve ser investigado o potencial observado no teste de pareamento de culturas de alguns isolados inibirem a produção de escleródios da *Sclerotinia sclerotiorum*, como o isolado FG04, e a característica do isolado FG05 de crescer micélio por cima dos fitopatógenos. Essas duas características podem reduzir a quantidade de inóculo dos fitopatógenos, diminuindo ou eliminando estruturas de resistência e diminuindo ou impedindo a disseminação de esporos. Ensaio devem ser pensados *in vitro* para confirmar se existe a diminuição da produção estruturas de resistências ou de esporos nos fitopatógenos na presença dos antagonistas. Ainda, podem ser realizados ensaios para avaliar a taxa de germinação de esporos ou escleródios na presença dos antagonistas, que caso reduzida pode auxiliar na diminuição da disseminação desses fungos no campo.

Por último, é importante manter o trabalho de isolamento de novos microrganismos, com otimização de técnicas de isolamento, como escolha do material ou dos meios seletivos utilizados, a fim de obter o maior número de microrganismos de interesse agrônomo, destacando microrganismos não tradicionais e inovadores para o mercado de bioinsumos.

9 REFERÊNCIAS

AGÁPTO, J. P. *et al.* Fungos Fitopatogênicos de Solo em Sistemas Agroflorestais: revisão de literatura. **Diversitas Journal**, v. 6, n. 3, p. 3052-3079, ago. 2021.

AGROLINK, 2000 – 2025. Informações e soluções para o setor do Agronegócio. Disponível em: <https://www.agrolink.com.br/>. Acesso em: 14 de novembro de 2025.

AJAYI-OYETUNDE, O. O.; BRADLEY, C. A. *Rhizoctonia solani*: taxonomy, population biology and management of *Rhizoctonia* seedling disease of soybean. **Plant Pathology**, v. 67, n. 1, p. 3–17, ago. 2017.

ALMEIDA, A. M. R. *et al.* **Macrophomina phaseolina em soja**. 1ª edição. Londrina, PR: Embrapa Soja, 2014.

AOKI, T.; O'DONNELL, K.; GEISER, D. M. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: status and future challenges. **Journal of General Plant Pathology**, v. 80, n. 3, p. 189–201, mar. 2014.

BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M.C.; CODÓN, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, Barcelona, v. 7, n. 4, p. 249-260, dez. 2004.

BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 16, n. 2, p. 93–108, jun. 1994.

BORGES, K. M. *et al.* Manutenção da coleção de macrofungos e triagem de potenciais produtores de biopigmentos. **Encontro de pesquisa e inovação da Embrapa agroenergia**, 7, 2023, Brasília, Anais, p.148.

CÁNOVAS-MÁRQUEZ, J.T. *et al.* Advances in understanding infections caused by the basal fungus *Mucor*. **PLoS Pathogens**, v. 19, n. 6, a. 1011394, jun. 2023.

CHAIBUB, A. A.; GUNDIM, J. A. B.; DE ARAÚJO, L. G.; DE FILIPPI, M. C. *Cladosporium cladosporioides* for disease control and defense response induction in upland rice grown under an agroecological system. **Agroecology and Sustainable Food Systems**, v. 49, n. 5, p. 773–791, jan. 2025.

DE PAULA, N. C. F.; DE SOUSA, C. P.; LACAVA, P. T. Pipelines for Characterization of Microbial-Producing Drugs. In: Rezaei, Nima, **Encyclopedia of Infection and Immunity**. vol. 4, pp. 342-360. Oxford: Elsevier. 2022.

DEAN, R. *et al.* The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, v. 13, n. 4, p. 414-430, mai. 2012.

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, out. 2020.

EKWOMADU, T. I., & MWANZA, M. *Fusarium* Fungi Pathogens, Identification, Adverse Effects, Disease Management, and Global Food Security: A Review of the Latest Research. ***Agriculture***, v. 13, n. 9, p. 1810, set. 2023.

EL-DAWY, E.G.A.E.M.; GHERBAWY, Y.A.; HUSSEIN, M.A. Morphological, molecular characterization, plant pathogenicity, and biocontrol of *Cladosporium* complex groups associated with faba beans. ***Scientific Reports***, v. 11, a. 14183, jul. 2021.

FLEMING, A. On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. ***British Journal of Experimental Pathology***, v. 10, n. 3, p. 226-236, mai. 1929.

FU, S.F. *et al.* Indole-3-acetic acid: A widespread physiological code in interactions of fungi with other organisms. ***Plant Signaling and Behaviour***, v. 10, n. 8, abr. 2015. Revisão.

GODOY, Victor Hugo Silva. ***Pochonia spp. como promotor de crescimento vegetal***. Orientador: Aloisio Freitas Chagas Junior. 2018. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 2018.

GORDON, S.A.; WEBER, R.P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. ***Plant Physiology***, v. 26, n. 1, p. 192-195, jan. 1951.

GUPTA, G.K.; SHARMA, S.K.; RAMTEKE, R. Biology, epidemiology and management of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with special reference to Charcoal rot of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. ***Journal of Phytopathology***, v. 160, p. 167–180, fev. 2012.

KHAN, A.; WILLIAMS, K. L.; NEVALAINEN, H. K. M. Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles. ***Biological Control***, v. 31, n. 3, p. 346–352, nov. 2004.

KHAN, M.; TANAKA, K. *Purpureocillium lilacinum* for plant growth promotion and biocontrol against root-knot nematodes infecting eggplant. **PLoS ONE**, v. 18, n. 3, e0283550, mar. 2023.

LACAVAL, P.T.; MACHADO, P.C.; de Andrade, P.H.M. Phosphate Solubilization by Endophytes from the Tropical Plants. In: Maheshwari D.K.; Dheeman S. (Org.). **Sustainable Development and Biodiversity**. 26ed. Springer Nature Switzerland AG: Springer International Publishing, v. 3, p. 207-226, 2021.

LEPLAT, J. *et al.* Survival of *Fusarium graminearum*, the causal agent of *Fusarium* head blight. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 33, n. 1, p. 97–111, jun. 2012.

LINDSAY, W. L.; VLEK, P. L. G.; CHIEN, S. H. Phosphate minerals, p. 1089–1130. **Minerals in Soil Environment**, 2ª edição. Madison, WI, USA: Soil Science Society of America, 1989.

LUANGSA-ARD, J. *et al.* *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 321, n. 2, p. 141–149, ago. 2011.

MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife, PE: Imprensa Universitária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005, p. 1-18.

MONTEIRO, T. S. A. *et al.* **Beneficial Microbes in Agro-Ecology**. India: Academic Press, 2020, p. 669-682.

MORENO-GAVÍRA, A. *et al.* *Paecilomyces* and Its Importance in the Biological Control of Agricultural Pests and Diseases. **Plants**, v. 9, n. 12, p. 1746, dez. 2020.

MURPHY, J.; RILEY, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica chimica acta**, v. 27, p. 31-36, 1962.

NAUTIYAL, C. Shekhar. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS microbiology Letters**, v. 170, n. 1, p. 265-270, jan. 1999.

PATERSON, R. R. M.; LIMA, N. Filamentous Fungal Human Pathogens from Food Emphasizing *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucor*. **Microorganisms**, v. 5, n. 3, a. 44, ago. 2017.

PEDRINO, Isadora Camargo. **Isolamento e caracterização de fungos endofíticos associados a *Paspalum atratum* Swallen e *Paspalum notatum* Fluggé com potencial biotecnológico e agrícola para promoção de crescimento vegetal e biocontrole.** Orientador: Paulo Teixeira Lacava. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2023.

PEDRINO, I.C.; FERNANDES, A.C.V.; FÁVERO, A.P.; LACAVAL, P.T. Plant Growth Promotion Induced by Phosphate Solubilizing Endophytes from the Tropics. In: Olubukola Oluranti Babalola; Ayansina Segun Ayangbenro. (Org.). **Microbial Allies**. 1ed.: Springer Nature Switzerland, v. , p. 177-201, 2025.

PRASAD, A. *et al.* Qualitative and quantitative estimation for phosphate solubilizing ability of *Trichoderma* isolates: A natural soil health enhancer. **Materials Today: Proceedings**, v. 81, n. 2, p. 360-366, mai. 2023.

QUIROGA, E. N.; SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. A. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 1, p. 89–96, 2001.

REIS, C. E. R. *et al.* Critical applications of *Mucor circinelloides* within a biorefinery context. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, n. 4, p. 555-570, mar. 2019.

SENAPATI, M. *et al.* *Rhizoctonia solani* Kühn Pathophysiology: Status and Prospects of Sheath Blight Disease Management in Rice. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, mai. 2022.

SILVA, Á. T. DA; SILVA, S. T. DA. Panorama da agricultura orgânica no Brasil. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 23, p. 1031, dez. 2016.

SILVA, Renato Boreli. **Caracterização de *Trichoderma* spp. produtores de ácido indolacético e solubilizadores de fósforo: efeitos no crescimento inicial de plantas.** Orientador: André Rodrigues dos Reis. 2024. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2024.

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, mar. 2018.

SURABY, E.J *et al.* Plant growth promotion under phosphate deficiency and improved phosphate acquisition by new fungal strain, *Penicillium olsonii* TLL1. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, out. 2023.

SVEDESE, V. M. *et al.* Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and production of cuticle-degrading enzymes in the presence of *Diatraea saccharalis* cuticle. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 46, p. 6491–6497, dez. 2013.

SZEDLACSEK, S.; MANDOLINI, E.; STAYKOVA, A.; PEINTNER, U. *Mortierellaceae* diversity at earliest soil developmental stages of four calcareous glacier forefields—An isolation-based approach. **Arctic, Antarctic, and Alpine Research**, v. 57, n. 1, a. 2555628, out. 2025.

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, 847–859, set. 2006.

TOGHUEO, R.M.K.; BOYOM, F.F. Endophytic *Penicillium* species and their agricultural, biotechnological, and pharmaceutical applications. **3 Biotech**, v. 10, n. 107, fev. 2020.

WANG, X.L. *et al.* Phosphate-Solubilizing Capacity of *Paecilomyces lilacinus* PSF7 and Optimization Using Response Surface Methodology. **Microorganisms**, v. 11, n. 2, p. 454, fev. 2023.

WENT, F.W. Auxin, the plant growth-hormone. **The Botanical Review**, v. 1, p. 162–182, mai. 1935.

XIAO, C. *et al.* Evaluation for Rock Phosphate Solubilization in Fermentation and Soil–Plant System Using a Stress-Tolerant Phosphate-Solubilizing *Aspergillus niger* WHAK1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, n. 123–133, nov. 2012.

YANG, F.; ABDELNABBY, H.; XIAO, Y. A mutant of the nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus* (Thom) is a novel biocontrol agent for *Sclerotinia sclerotiorum*. **Microbial Pathogenesis**, v. 89, p. 169-176, dez. 2015.

ZOU, Y-N. *et al.* Relationships between mycorrhizae and root hairs. **Pakistan Journal of Botany**, v. 51, n. 2, p. 727-733, 2019.