

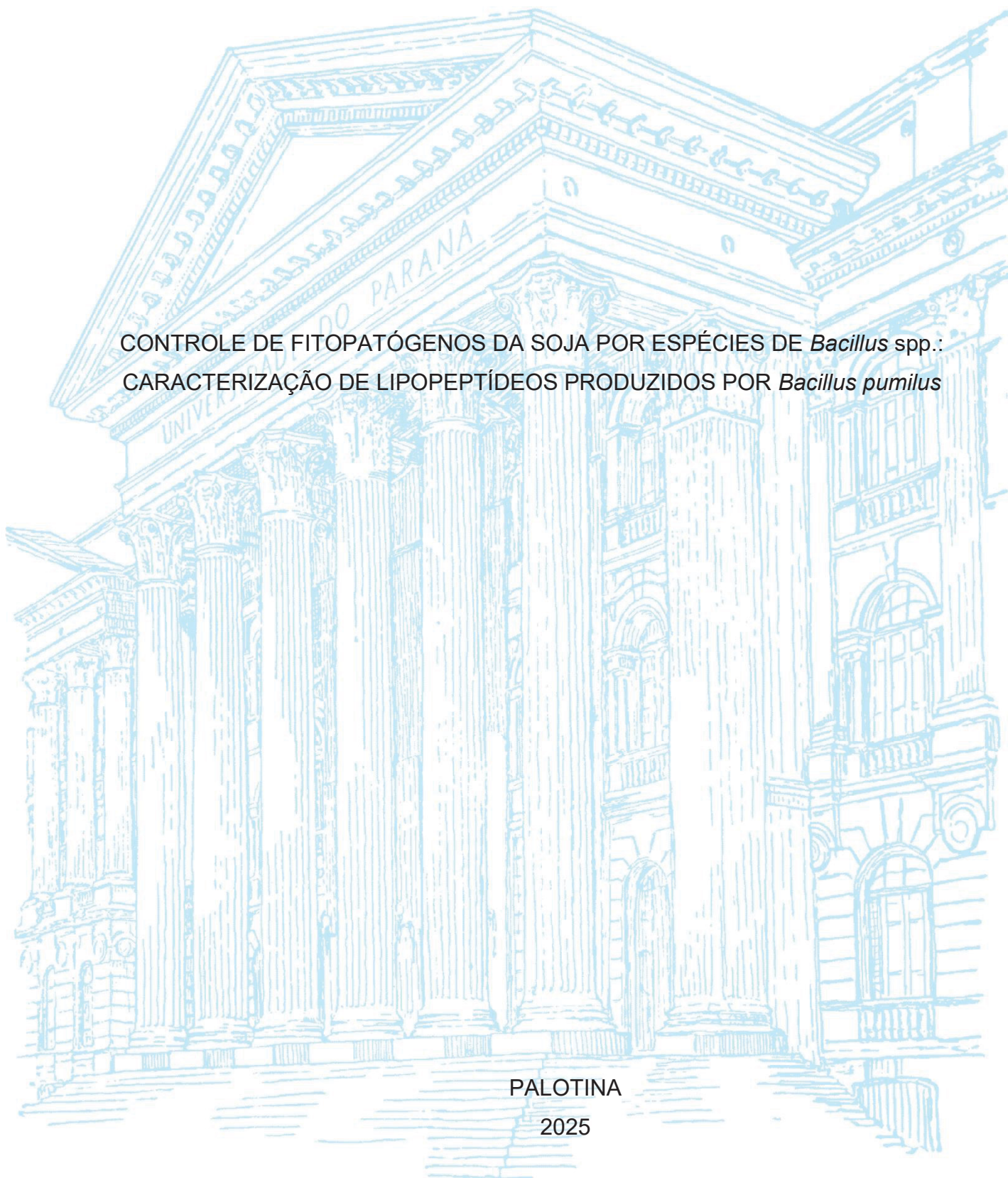
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANA APARECIDA DE CARVALHO LIMA

CONTROLE DE FITOPATÓGENOS DA SOJA POR ESPÉCIES DE *Bacillus* spp.:
CARACTERIZAÇÃO DE LIPOPEPTÍDEOS PRODUZIDOS POR *Bacillus pumilus*

PALOTINA

2025



MARIANA APARECIDA DE CARVALHO LIMA

CONTROLE DE FITOPATÓGENOS DA SOJA POR ESPÉCIES DE *Bacillus* spp.:
CARACTERIZAÇÃO DE LIPOPEPTÍDEOS PRODUZIDOS POR *Bacillus pumilus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Fiorini Rosado

PALOTINA
2025

Universidade Federal do Paraná. Sistemas de Bibliotecas.
Biblioteca UFPR Palotina.

L732 Lima, Mariana Aparecida de Carvalho
Controle de fitopatógenos da soja por espécies de
Bacillus spp.: caracterização de lipopeptídeos produzidos por
Bacillus pumilus / Mariana Aparecida de Carvalho Lima.
– Palotina, PR, 2025.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor Palotina, PR, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.
Orientadora: Profa. Dra. Adriana Fiorini Rosado.

1. *Bacillus spp.* 2. Fitopatógenos. 3. Surfactina.
I. Rosado, Adriana Fiorini. II. Universidade Federal do Paraná.
III. Título.

CDU 602

Bibliotecária: Aparecida Pereira dos Santos – CRB 9/1653



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOTECNOLOGIA -
40001016083P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **MARIANA APARECIDA DE CARVALHO LIMA**, intitulada: **Controle de fitopatógenos da soja por espécies de *Bacillus* sp.: caracterização de lipopeptídeos produzidos por *Bacillus pumilus*.**, sob orientação da Profa. Dra. ADRIANA FIORINI ROSADO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 19 de Dezembro de 2025.

Assinatura Eletrônica

19/01/2026 13:19:31.0

ADRIANA FIORINI ROSADO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

19/01/2026 19:07:47.0

FÁBIO ROGÉRIO ROSADO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

22/12/2025 15:10:47.0

RAQUEL STROHER

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

RUA PIONEIRO, 2153 - PALOTINA - Paraná - Brasil

CEP 85950-000 - Tel: (44) 3211-8500 - E-mail: posbiotecnologia@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 505210

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 505210

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de expressar minha profunda gratidão à Profa. Dra. Adriana Fiorini Rosado pela oportunidade de ser sua orientanda. Não há palavras que expressem o quanto sou grata por tudo que vivenciei ao longo desses dois anos de mestrado. Agradeço pelos ensinamentos, pelos conselhos, pela atenção e preocupação constantes, pela disponibilidade e por sempre ter me ouvido com paciência e empatia. Adri, você é simplesmente maravilhosa. Jamais me esquecerei de você e de tudo o que fez por mim. Sua dedicação, sensibilidade e generosidade foram fundamentais para o meu crescimento pessoal e profissional. Você foi (e sempre será) uma inspiração, não só para mim, mas para todos que tem o privilégio de trabalhar ao seu lado.

Gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Fábio Rogério Rosado por todo o apoio durante a pesquisa, pelos conselhos e pela atenção dedicada. Meu sincero e profundo agradecimento, bem como pela gentileza de aceitar o convite para compor a banca examinadora.

Gostaria de agradecer à Profa. Dra. Raquel Ströher por gentilmente aceitar o convite para compor a banca examinadora e por estar presente em mais uma etapa importante da minha trajetória acadêmica.

Gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva pela realização de análises fundamentais para a conclusão deste trabalho. Sua generosidade e disponibilidade foram admiráveis, e sou profundamente grata pelos valiosos ensinamentos e pela dedicação demonstrada.

Gostaria de agradecer a toda a equipe do NEMA pelo apoio, pela ajuda, pelo suporte e por tantas outras contribuições. Fazer parte desse grupo foi uma experiência incrível, que me proporcionou conhecer pessoas especiais, vivenciar momentos únicos e construir amizades que levarei comigo para o resto da vida.

Obrigada, NEMA girls, Juliana, Patrícia, Bianca, Juliet e Luisa, por tornarem os dias mais divertidos e especiais!

E, no NEMA, tive a oportunidade de conhecer pessoas incríveis, começando pela Gabrielli Huff. Gabi, Sou imensamente grata a você por tantas coisas, especialmente pela paciência em me ensinar, pelos conselhos (que ainda continuarei a pedir rsrs), pelo apoio, pelas risadas e por todos os momentos compartilhados. Sinto-me muito feliz e privilegiada por ter te conhecido, e te admiro profundamente!

Gostaria de agradecer à Juliet, que em algum momento passou a ser minha super parceira de laboratório. Só Deus sabe a luta que foi a “busca pelos lipipi”, apesar de muito trabalhoso, eu tive sorte em ter você ao meu lado! Eu tenho muito a te agradecer, com certeza, mais uma das pessoas que levarei para sempre em meu coração.

Gostaria de agradecer à Bianca Campagnolo (a oficial boleira do NEMA rsrs) por, especialmente no início, me auxiliar nos experimentos. Muito obrigada por tudo, Bia!

Gostaria de agradecer à Luisa Huguen por ser uma parceira incrível, pelas comidas compartilhadas, por me permitir brincar com seus bichinhos de estimação e, acima de tudo, pela amizade e colaboração ao longo desse tempo.

Gostaria de agradecer à Victória Martins, minha amiga desde a muito tempo, por todo apoio.

Gostaria de agradecer à Júlia Pivetta por ser uma pessoa incrível e por fazer parte da minha vida. Saiba que você será para sempre uma grande parceira minha. Obrigada por ter sido minha companhia no trabalho, no mestrado, nas viagens, na academia e em tantos outros momentos! Te admiro imensamente.

Gostaria de agradecer à minha mãe, pelas orações, e por sempre querer o melhor para mim.

Agradeço a UFPR, por todo suporte prestado ao que foi necessário para a execução do meu projeto de pesquisa.

RESUMO

A soja é uma das culturas de maior importância mundial, entretanto, doenças fúngicas representam um risco significativo à sua produtividade e qualidade, não apenas pelas perdas diretas de produção, mas também pelo potencial risco de contaminação por micotoxinas. O controle químico com fungicidas é eficiente, porém, apresenta desvantagens, tornando alternativas biológicas altamente desejáveis. Nessa perspectiva, bactérias do gênero *Bacillus* destacam-se por suas diversas aplicações biotecnológicas, especialmente devido à produção de metabólitos secundários, entre estes, os lipopeptídeos, moléculas anfipáticas com propriedades de biosurfactantes que exibem notável atividade antimicrobiana. Diante disso, este trabalho teve como objetivo verificar a atividade antifúngica, através do ensaio de cultura pareada (antagonismo) de diferentes espécies de *Bacillus* (*B. nealsonii*, *B. licheniformis*, *B. tequilensis* e *B. pumilus*) contra fungos fitopatogênicos (*Colletotrichum truncatum*, *Corynespora cassiicola*, *Diaporthe longicolla*, *Diaporthe ueckeri*, *Fusarium incarnatum-equiseti*, *Fusarium graminearum* e *Macrophomina phaseolina*), e selecionar a espécie com maior atividade, para a extração de lipopeptídeos para verificar a ação desses extratos sobre os fungos. No ensaio de dupla pareada, *B. pumilus* demonstrou o maior potencial de inibição do crescimento micelial dos fungos estudados. O extrato lipopeptídico obtido desta linhagem foi caracterizado por ESI(+)-HRMS/MS e RMN ¹H, e foi observada a presença de três isoformas de surfactina (C13, C14 e C15). Foi analisado também o efeito antifúngico dos extratos adicionados diretamente ao meio de cultivo dos fungos e foi observada uma significativa redução do crescimento micelial e alterações morfológicas, como mudança de coloração da colônia. Análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV) confirmaram danos ultraestruturais nas hifas, incluindo murchamento, torção, diminuição na produção de conídios e deformações das estruturas de reprodução. Portanto, este trabalho evidencia que o extrato de *B. pumilus* rico em surfactinas apresenta alto potencial para o controle de fungos fitopatogênicos, posicionando-se como um candidato promissor para uso em programas de manejo integrado, possivelmente em associação com fungicidas sintéticos.

Palavras-chave: *Bacillus* spp.; controle biológico; fitopatógenos; lipopeptídeos; surfactina.

ABSTRACT

Soybean is one of the most important crops worldwide; however, fungal diseases pose a significant risk to its productivity and quality, not only due to direct yield losses but also because of the potential risk of mycotoxin contamination. While chemical control with fungicides is effective, it presents drawbacks, making biological alternatives highly desirable. In this context, bacteria of the genus *Bacillus* stand out for their diverse biotechnological applications, especially due to the production of secondary metabolites, among which lipopeptides are amphipathic molecules with biosurfactant properties that exhibit remarkable antimicrobial activity. Therefore, this work aimed to verify the antifungal activity, through dual culture (antagonism) of different *Bacillus* species (*B. nealsonii*, *B. licheniformis*, *B. tequilensis*, and *B. pumilus*) against phytopathogenic fungi (*Colletotrichum truncatum*, *Corynespora cassiicola*, *Diaporthe longicolla*, *Diaporthe ueckeri*, *Fusarium incarnatum-equiseti*, *Fusarium graminearum*, and *Macrophomina phaseolina*) and selected the species with higher activity, to extract lipopeptides to verify the action of this extracts on fungi. In the dual culture assay, *B. pumilus* showed the highest potential for mycelial growth inhibition. The lipopeptide extract obtained from this strain was characterized by ESI(+)-HRMS/MS and ¹H NMR, which identified the presence of three surfactin isoforms (C13, C14, and C15). The antifungal effect of the extracts added directly to the fungal culture medium was also analyzed resulting in significant mycelial growth reduction and morphological changes, such as changes in colony coloration. Scanning electron microscopy (SEM) analyses confirmed ultrastructural damage to the hyphae, including shriveling, twisting, reduced conidia production, and deformations of reproductive structures. Thus, this work demonstrates that the surfactin-rich extract from *B. pumilus* has high potential for controlling phytopathogenic fungi, positioning it as a promising candidate for use in integrated management programs, in combination with synthetic fungicides.

Keywords: *Bacillus* spp.; biological control; phytopathogens; lipopeptides; surfactin.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESQUEMA DE OBTENÇÃO DE LIPOPEPTÍDEOS	44
FIGURA 2 - ESQUEMA DE ISOLAMENTO FÚNGICO EM SEMENTES DE SOJA..	49
FIGURA 3 - <i>Colletotrichum truncatum</i>	51
FIGURA 4 - <i>Corynespora cassicola</i>	51
FIGURA 5 - <i>Diaporthe longicolla</i>	52
FIGURA 6 - <i>Diaporthe ueckeri</i>	53
FIGURA 7 - <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>	53
FIGURA 8 - <i>Fusarium graminearum</i>	54
FIGURA 9 - <i>Macrophomina phaseolina</i>	54
FIGURA 10 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A PARTIR DE PRODUTO DE PCR DOS FUNGOS ISOLADOS	55
FIGURA 11 – ENSAIO DE ANTAGONISMO ENTRE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS FRENTE A DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>Bacillus</i> SPP.	57
FIGURA 12 - EXTRAÇÃO DOS LIPOPEPTÍDEOS.....	60
FIGURA 13 - ESPECTRO DE MASSAS OBTIDO POR ESI(+)-HRMS/MS COMPLETO DO EXTRATO DE <i>B. pumilus</i>	62
FIGURA 14 - ESPECTRO DE MASSAS OBTIDO POR ESI(+)-HRMS/MS PARA O PICO <i>m/z</i> 1022.6741 DO EXTRATO DE <i>B. pumilus</i>	63
FIGURA 15 - ESTRUTURA DAS MOLÉCULAS DE SURFACTINA C13, C14 E C15 PROPOSTA COM BASE EM DADOS DE ESI(+)-HRMS/MS E INFORMAÇÕES DISPONÍVEIS NA BASE PUBCHEM	65
FIGURA 16 - ESPECTRO RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ¹ H DE EXTRATO DE <i>B. pumilus</i>	67
FIGURA 17 - FITOPATÓGENOS DESAFIADOS COM EXTRATO DE LIPOPEPTÍDEO DE <i>B. pumilus</i>	69
FIGURA 18 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE <i>Colletotrichum truncatum</i>	71
FIGURA 19 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE <i>Corynespora cassicola</i>	72
FIGURA 20 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE <i>Diaporthe longicolla</i>	73

FIGURA 21 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE <i>Diaporthe ueckeri</i>	74
FIGURA 22 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE <i>Fusarium incarnatum equiseti</i>	75
FIGURA 23 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE <i>Fusarium graminearum</i>	76
FIGURA 24 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE <i>Macrophomina phaseolina</i>	77

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS EM ENSAIO DE ANTAGONISMO FRENTE A DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>Bacillus</i> spp.	58
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - REVISÃO DE CARACTERÍSTICAS DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS	50
TABELA 2 - IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS.....	56
TABELA 3 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA OBTIDA A PARTIR DE ESI-MS/MS DO EXTRATO DE <i>B. pumilus</i>	64

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

BDA - Batata-Dextrose Ágar
BLASTn - Basic Local Alignment Search Tool for nucleotides
CAIB - Central de Análises Químicas do Instituto de Biotecnologia
CDCl₃ - Clorofórmio Deuterado
CID - Collision-Induced Dissociation
DNA - Deoxyribonucleic acid
dNTPs - Desoxirribonucleotídeos Trifosfato
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EROs - Espécies Reativas de Oxigênio
ESI - Electrospray Ionization
ETU - Etilenotiureia
FAO - Food and Agriculture Organization
FIESC - Complexo *Fusarium incarnatum-equiseti*
FWHM - Full Width at Half Maximum
GRAS - Generally Recognized As Safe
HCl - Ácido Clorídrico
HRMS/MS - High-Resolution tandem mass spectrometry
ISR - Induced Systemic Resistance
ITS - Internal Transcribed Spacer
LB - Luria-Bertani
MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura
MS - Mass spectrometry
m/z - Razão massa/carga
NCBI - National Center for Biotechnology Information
nm - nanômetro
NRPSs - Nonribosomal Peptide Synthetases
PBS - Phosphate-buffered saline
PCA - Plate Count Agar
PCR - Polymerase Chain Reaction
PES - Polietersulfona
pH - Potencial Hidrogeniônico
ppm - Partes por Milhão

QPS - Qualified Presumption of Safety

rpm - Rotações por minuto

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

SDA - Sabouraud Dextrose Agar

SDHI - Succinate Dehydrogenase Inhibitor

TBE - Tris-Borato-EDTA

UFPR - Universidade Federal do Paraná

v/v - Volume por Volume

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Alfa
°C	Graus Celsius
δ	Deslocamento Químico (RMN)
Δ	Diferença/Variação
μ	Micro (10^{-6})
%	Porcentagem
\pm	Mais ou Menos
\times	Aumento (em microscopia)
M	Molar
m	Milli (10^{-3})
Da	Dalton
g	Grama
L	Litro
mL	Mililitro
min	Minuto
h	Hora
s	Segundo
Hz	Hertz
d	Área da colônia fúngica no grupo controle (mm^2)
d_0	Área da colônia fúngica no grupo tratado com bactéria (mm^2)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVOS	17
1.1.1 Objetivo geral	17
1.1.2 Objetivos específicos.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 USO DE FUNGICIDAS.....	19
2.1.1 Mecanismo de ação	19
2.1.2 Impactos ambientais	21
2.2 FITOPATÓGENOS	25
2.2.1 <i>Colletotrichum truncatum</i>	25
2.2.2 <i>Corynespora cassicola</i>	26
2.2.3 <i>Diaporthe</i> spp.	27
2.2.3.1 <i>Diaporthe longicolla</i>	29
2.2.3.2 <i>Diaporthe ueckeri</i>	29
2.2.4 <i>Fusarium</i> spp.....	30
2.2.4.1 <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>	32
2.2.4.2 <i>Fusarium graminearum</i>	32
2.2.5 <i>Macrophomina phaseolina</i>	33
2.3 <i>BACILLUS</i> SPP.....	35
2.4 LIPOPEPTÍDEOS.....	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 LOCAL DE DESENVOLVIMENTO	39
3.2 MICRORGANISMOS.....	39
3.2.1 Isolados <i>Bacillus</i> spp.....	39
3.2.2 Isolados fitopatogênicos	39
3.3 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS	40
3.3.1 Macroscópica e Microscópica	40
3.3.2 Identificação molecular dos fitopatógenos.....	41
3.4 CULTURA PAREADA (ANTAGONISMO)	42
3.5 EXTRAÇÃO DE LIPOPEPTÍDEOS	43
3.6 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO	45

3.6.1 Espectrometria de massas de alta resolução – ionização por eletrospray (ESI-HRMS/MS)	45
3.6.2 Ressonância magnética nuclear ¹ H.....	45
3.7 VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	46
3.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	46
4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 MICRORGANISMOS.....	48
4.1.1 Isolamento dos fitopatógenos.....	48
4.2 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS	49
4.2.1 Identificação macroscópica e microscópica	49
4.2.2 Identificação molecular dos fitopatógenos.....	55
4.3 ANTAGONISMO	56
4.4 EXTRAÇÃO DE LIPOPEPTÍDEOS	59
4.5 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO	61
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	68
4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	70
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	79
REFERÊNCIAS.....	81

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max*) é uma das *commodities* agrícolas de maior relevância mundial. Sua aplicação é ampla, abrangendo desde a formulação de rações e produção de biocombustíveis até o desenvolvimento de produtos farmacêuticos (Amjid; Üstün, 2025). No setor alimentício, diversos derivados podem ser obtidos, como farelo, óleo, isolados proteicos e farinha, devido à sua composição nutricional, que inclui elevados teores de proteínas (36%), carboidratos (35%), óleo (19%), minerais (5%) e outros compostos (Hassan, 2013).

Segundo o *United States Department of Agriculture* (USDA, 2025), o Brasil é atualmente o maior produtor mundial de soja, responsável por aproximadamente 41% da produção global, com estimativa de 175 milhões de toneladas na safra 2024/25. A cultura ocupa cerca de 48,8 milhões de hectares e apresenta produtividade média de 3,59 toneladas por hectare, destacando sua importância econômica e estratégica no cenário agrícola internacional.

A produtividade da soja pode ser afetada por diferentes fatores. Entre os estresses abióticos destacam-se temperaturas extremas, poluição, radiação, pesticidas, salinidade e escassez hídrica (Amjid; Üstün, 2025). Já os estresses bióticos incluem a ação de insetos, plantas daninhas e, principalmente, patógenos (Sana *et al.*, 2025). Dentro deste último grupo, os fungos fitopatogênicos são os principais agentes causadores de doenças em plantas, resultando em perdas expressivas na agricultura mundial (Romero; Costa, 2025).

O controle de doenças fúngicas baseia-se, em grande parte, no uso de fungicidas químicos. Entretanto, esse método apresenta limitações, como o desenvolvimento de resistência, que ocorre quando os patógenos se adaptam e continuam a proliferar mesmo na presença de compostos anteriormente eficazes. Esse fenômeno compromete a eficiência do controle e exige o emprego de estratégias complementares, como a rotação de culturas e o uso de fungicidas com diferentes mecanismos de ação (Romero; Costa, 2025).

Adicionalmente, crescem as preocupações relacionadas aos riscos associados ao uso indiscriminado de pesticidas, tanto pela presença de resíduos em alimentos quanto pelos impactos ambientais. Nesse contexto, o uso de microrganismos como agentes de controle biológico surge como uma alternativa promissora para a supressão de patógenos, além de estar alinhado aos princípios de

sustentabilidade agrícola (Bakr *et al.*, 2025). Dessa forma, os produtos formulados à base de microrganismos podem atuar de maneira complementar aos fungicidas químicos, os quais ainda constituem um componente relevante no manejo de pragas.

Entre os microrganismos utilizados para o controle de fungos fitopatogênicos, destacam-se as bactérias do gênero *Bacillus*. Além de atuarem no controle de patógenos, essas bactérias têm sido amplamente estudadas pelo seu potencial como promotoras de crescimento vegetal. A proteção das plantas pode ocorrer por diferentes vias, incluindo a indução de resistência sistêmica (*Induced Systemic Resistance*, ISR), formação de biofilmes, produção de sideróforos e exopolissacarídeos, além da atuação como desnitrificantes, contribuindo para a saúde do solo (Mahapatra; Yadav; Ramakrishna, 2022). Ademais, *Bacillus* é capaz de sintetizar uma ampla gama de compostos com atividade antimicrobiana, entre os quais se destacam os biossurfactantes. Dentre estes, os lipopeptídeos (LPs) exercem papel crucial na supressão de patógenos de plantas (Bai *et al.*, 2025).

Os estudos envolvendo LPs vêm crescendo não apenas na área agrícola, mas também em setores como o farmacêutico, químico e alimentício. Isso se deve à sua estrutura anfipática, que confere ampla importância biotecnológica, refletida em um espectro de bioatividade diversificado, incluindo propriedades antibacterianas, antivirais, antifúngicas e anticancerígenas (Saiyam *et al.*, 2024).

Nesse contexto, o estudo dos LPs produzidos por bactérias do gênero *Bacillus* se apresentam como uma estratégia promissora para o controle de fungos fitopatogênicos. Esses compostos, pela sua versatilidade estrutural e amplo espectro de bioatividade, oferecem não apenas eficiência na supressão de patógenos, mas também potencial para reduzir a dependência de fungicidas químicos. Assim, a exploração de tais metabólitos representa um caminho relevante para o desenvolvimento de alternativas sustentáveis e eficazes no manejo de doenças que afetam culturas de grande importância agrícola, como a soja.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo identificar, entre diferentes espécies de *Bacillus*, aquela com maior potencial de biocontrole, realizar a extração e

identificação dos LPs produzidos e comprovar a atividade antifúngica do extrato frente a fungos fitopatogênicos de soja.

1.1.2 Objetivos específicos

- Identificar os fungos fitopatogênicos presentes em sementes de soja;
- Avaliar, por meio de ensaios de antagonismo, a atividade antifúngica de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus nealsonii*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus tequilensis* frente a fungos fitopatogênicos;
- Realizar a extração de LPs da cepa de *Bacillus* com melhor desempenho nos ensaios de antagonismo;
- Identificar e caracterizar os LPs presentes no extrato obtido;
- Comprovar a atividade antifúngica dos extratos obtidos;
- Avaliar as alterações morfológicas induzidas pelo extrato obtido sobre os fungos tratados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 USO DE FUNGICIDAS

2.1.1 Mecanismo de ação

Os fitopatógenos representam uma grande ameaça às culturas de importância econômica, provocando doenças que comprometem tanto a quantidade quanto a qualidade dos produtos agrícolas. Entre os principais causadores de doenças estão bactérias, vírus, nematoides e fungos. Atualmente, o controle das doenças vegetais inclui abordagens como o uso de pesticidas químicos, práticas de manejo eficazes e o cultivo de variedades resistentes (Islam *et al.*, 2024).

De acordo com a *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2023) o uso de pesticidas na agricultura tem aumentado significativamente nas últimas décadas. Em 2022, o total aplicado atingiu 3,70 milhões de toneladas (Mt) de ingredientes ativos, representando um crescimento de 4% em relação a 2021, 13% na última década e o dobro do registrado em 1990. Além do volume total aplicado, a intensidade do uso de pesticidas também aumentou. A quantidade utilizada por área cultivada cresceu 94%, enquanto o uso por valor da produção agrícola teve um acréscimo de 5% e o uso *per capita* aumentou 35%. Esse crescimento foi particularmente expressivo nas Américas, onde o uso agrícola de pesticidas subiu 10% entre 2021 e 2022, passando de 1,71 Mt para 1,89 Mt.

Os primeiros fungicidas utilizados eram compostos por moléculas inorgânicas, como cobre, estanho, cádmio e mercúrio, conhecidos por sua elevada toxicidade contra fungos. Contudo, o avanço tecnológico levou ao desenvolvimento e maior adoção de fungicidas sintéticos orgânicos, que dominam o mercado atual (Baibakova *et al.*, 2019).

Os fungicidas podem ser classificados em dois grupos principais: não sistêmicos e sistêmicos, com base na sua translocação dentro da planta.

Os fungicidas não sistêmicos (de contato) são aplicados externamente às plantas e atuam de forma preventiva, funcionando como uma barreira protetora. Os fungos podem infectar as plantas por meio de feridas, pela penetração direta nos estômatos ou através das camadas superficiais dos tecidos vegetais. Nas folhas, esses fungicidas controlam a doença eliminando apenas o micélio superficial, sem

capacidade de penetração nos tecidos. Por isso, são eficazes apenas contra patógenos presentes nas superfícies, sendo necessárias novas aplicações à medida que a planta se desenvolve (Oliver; Hewitt, 2014; Baibakova *et al.*, 2019).

Os fungicidas não sistêmicos geralmente são inibidores multissítio, afetando diferentes processos bioquímicos essenciais para o fungo. Essa atividade ocorre, em grande parte, devido à sua capacidade de ligação com grupos químicos, como frações tiol, presentes em diversas enzimas. Um exemplo notável são os derivados do ácido ditiocarbamato, que não possuem capacidade curativa para plantas já infectadas (Baibakova *et al.*, 2019).

Já os fungicidas sistêmicos podem ser protetores, curativos ou erradicantes. Eles são absorvidos pela planta e transportados até o local da infecção fúngica, apresentando mobilidade apoplástica ou simplástica. A mobilidade apoplástica ocorre pelo movimento através dos espaços intercelulares, paredes celulares e elementos do xilema, sendo influenciada por processos como difusão e transpiração. Já a mobilidade simplástica ocorre através dos plasmodesmos, envolvendo absorção e distribuição via floema (Oliver; Hewitt, 2014).

Os fungicidas sistêmicos são altamente específicos e atuam em alvos bioquímicos determinados. Entretanto, essa especificidade aumenta o risco de resistência fúngica, especialmente quando utilizados de forma excessiva. Para mitigar esse risco, os fungicidas são organizados em classes químicas (Baibakova *et al.*, 2019). Exemplos de fungicidas sistêmicos de sítio único incluem benzimidazóis, fenilamidas e estrobilurinas (Deising; Reimann; Pascholati, 2008).

O mecanismo de ação do fungicida influencia diretamente na resistência genética. Fungicidas de sítio específico apresentam maior potencial de resistência, pois basta uma única mutação na proteína alvo para gerar uma mudança qualitativa. Isso resulta em duas populações distintas, com uma distribuição bimodal de sensibilidade (Lucas; Hawkins; Fraaije, 2015). Por outro lado, os fungicidas inibidores multissítio, ou os de sítio específico com mais de um gene ou alelo alvo, geralmente apresentam uma distribuição unimodal, permitindo mudanças graduais em direção à resistência ao longo do tempo (Lucas; Hawkins; Fraaije, 2015).

2.1.2 Impactos ambientais

O uso de fungicidas para proteger, controlar ou erradicar pragas agrícolas pode gerar impactos ambientais adversos, devido à sua persistência e mobilidade no solo e nos ambientes aquáticos, processos frequentemente potencializados pelo transporte externo de contaminantes associado à erosão provocada pelo vento e pela água (Deb *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2019). Esses impactos estão diretamente relacionados à hidrologia local, às características do solo e dos corpos d'água, fatores que podem variar e aumentar o risco de contaminação de organismos não-alvo. Além disso, fatores antropogênicos, como as práticas de manejo, a taxa de aplicação e o tempo de exposição, também influenciam o transporte desses produtos (Deb *et al.*, 2010).

Além dos impactos ambientais, o contato humano com água contaminada ou com animais aquáticos que sofreram bioacumulação, em concentrações superiores aos limites seguros, pode afetar diretamente a saúde dos organismos expostos. Doses subletais também podem causar instabilidade genômica nos patógenos fúngicos, acelerando o desenvolvimento de resistência aos fungicidas ou o aparecimento de outras adaptações, como é o caso do surgimento de novas raças de patógenos resistentes (Heydari; Misaghi, 1999; Deb *et al.*, 2010; Gambhir *et al.*, 2021).

O uso de fungicidas pode interferir direta ou indiretamente nos organismos do solo, que são essenciais para a manutenção das propriedades físico-químicas e biológicas do solo. Consequentemente, essas alterações podem impactar negativamente a produtividade das culturas agrícolas e diminuir a biodiversidade edáfica. Por exemplo, fungicidas que atuam na membrana dos fungos podem gerar efeitos adversos ao modificar a estrutura e a função das comunidades microbianas do solo (Silva *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2011; Baćmaga; Wyszowska; Kucharski, 2024).

Além disso, fungicidas têm o potencial de alterar a atividade enzimática do solo, um aspecto crucial para o equilíbrio microbiano. As enzimas presentes no solo são originadas principalmente de microrganismos, mas também de restos culturais e da decomposição de organismos maiores, acumulando-se de forma livre ou estabilizadas na matéria orgânica. Essas enzimas desempenham papéis fundamentais nas funções microbianas e bioquímicas, facilitando a liberação de nutrientes essenciais no ambiente edáfico (Silva *et al.*, 2019).

Um estudo realizado por Monkiedje, Ilori e Spiteller (2002) demonstrou que o metalaxil (grupo químico acilalaninato) apresenta toxicidade para bactérias, especialmente aquelas envolvidas na fixação biológica de nitrogênio, como as responsáveis pela nitrificação. Além disso, o metalaxil foi capaz de inibir a atividade da enzima desidrogenase, que é um indicador-chave da saúde microbiana do solo. De forma similar, o tebuconazol (grupo químico triazol) mostrou reduzir a população de bactérias oxidantes de amônio e enxofre, essenciais para o ciclo do nitrogênio e enxofre no solo (Karas *et al.*, 2018).

Outro estudo, realizado por Vozniuk *et al.* (2016), avaliou um produto comercial contendo ciproconazol (grupo químico triazol) e fludioxonil (grupo químico fenilpirrol), onde os resultados indicaram que esse produto reduz a população de microrganismos envolvidos na fixação de nitrogênio, impactando a microbiota do solo.

Além disso, alguns fungicidas também afetam animais invertebrados e artrópodes do solo, como minhocas e milípedes. Por exemplo, o carbendazim (grupo químico benzimidazol) possui capacidade de reduzir minhocas *Pontoscolex corethrurus* e *Andiorrhinus amazonius*, bem como para o milípede *Trigoniulus corallinus* (Förster *et al.*, 2006). Esses efeitos reforçam a necessidade de cautela no uso de fungicidas, considerando seus impactos de longo prazo sobre a saúde do solo e a sustentabilidade dos agroecossistemas.

Em uma revisão sistemática sobre fungicidas benzimidazóis, Gomes (2022) conduziu uma pesquisa detalhada e constatou que, apesar de algumas divergências experimentais, diversos estudos *in vitro* e *in vivo*, tanto em animais quanto em culturas de células humanas, evidenciaram a genotoxicidade desse grupo químico. Os resultados indicaram seu potencial para causar aberrações cromossômicas, aneuploidia, poliploidia, danos ao ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*, DNA) e formação de micronúcleos.

Além disso, o tiabendazol, um fungicida benzimidazólico, foi associado a efeitos tóxicos em peixes, induzindo apoptose, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e respostas inflamatórias (Park *et al.*, 2023). Já o carbendazim apresenta alta persistência no solo, com degradação lenta devido às interações com coloides, o que prolonga sua permanência no ambiente em estado imobilizado (Berglöf *et al.*, 2002).

Os fungicidas que possuem como mecanismo de ação a inibição da síntese de esteróis, que incluem os grupos químicos dos triazóis/triazolintiona apresentam

riscos associados, por exemplo, os triazóis, apresentam alta persistência no solo e em ambientes aquáticos, além de atingir organismos não alvo (Roman *et al.*, 2022). Embora as bactérias não possuam esteróis em sua composição, fungicidas com este mecanismo de ação têm sido associados a efeitos colaterais indiretos sobre esses organismos (Yang *et al.*, 2011).

Os fungicidas do grupo dos ditiocarbamatos, em especial maneb, zineb e mancozeb, produzem um metabólito chamado etilenotiourea (ETU), amplamente reconhecido como o principal responsável por sua toxicidade. Estudos indicam uma possível carcinogenicidade associada a esse composto (Houeto; Bindoula; Hoffman, 1995). Além disso, um estudo conduzido por Gao *et al.* (2025) demonstrou que o mancozeb desencadeia hepatotoxicidade em camundongos, reforçando preocupações sobre seus impactos na saúde. Em outra pesquisa, Lori *et al.* (2021) avaliaram o potencial do mancozeb em causar danos em células de carcinoma hepatocelular e linhagens epiteliais de carcinoma humano, investigando sua citotoxicidade, indução de apoptose, necrose e produção de espécies reativas de oxigênio. Os resultados mostraram que o mancozeb induziu danos oxidativos ao DNA devido ao estresse oxidativo, levando à morte celular por apoptose, com fenótipos de necrose secundária precoce. Além disso, o fungicida demonstrou potencial clastogênico e aneugênico, confirmando sua genotoxicidade. Essas evidências sustentam as restrições impostas ao seu uso em diversos países nos últimos anos.

Outro grupo de fungicidas que possui mecanismo de ação multissítio, assim como os ditiocarbamatos, é o das isoftalonitrilas, com destaque para o clorotalonil. Organismos aquáticos e anfíbios estão entre os mais vulneráveis à exposição a esse composto. Em anfíbios, o clorotalonil pode causar alterações bioquímicas relacionadas à biotransformação e ao desenvolvimento, impactando seu ciclo de vida (Tao *et al.*, 2024; Méndez *et al.*, 2016). Além disso, estudos associam esse fungicida a efeitos disruptores endócrinos em peixes, como observado na espécie peixe-zebra (*Danio rerio*), em que a exposição reduz o sucesso reprodutivo e provoca alterações cerebrais (Guillante *et al.*, 2024).

Assim como ocorre com o clorotalonil, estudos indicam que a exposição do peixe-zebra à dimoxistrobina, um composto pertencente ao grupo das estrobilurinas, pode causar distúrbios no desenvolvimento, incluindo deformidades morfológicas graves. Além disso, em doses subletais, a dimoxistrobina compromete a inflação da bexiga natatória, afetando o desempenho da natação (Ahmed *et al.*, 2024).

Pesquisas sugerem que os fungicidas estrobilurínicos são mais persistentes em solos aeróbicos, com uma degradação dependente do pH, o que resulta em impactos tóxicos tanto para organismos edáficos quanto para aqueles em ambientes aquáticos. Os efeitos adversos incluem imunomodulação, apoptose celular, desregulação endócrina, estresse oxidativo e genotoxicidade (Rodrigues; Lopes; Pardal, 2013; Pandey; Rathore, 2023).

Além das estrobilurinas, os fungicidas da classe das carboxamidas, que compartilham um mecanismo de ação semelhante (atuando na cadeia respiratória mitocondrial e inibindo a produção de energia nas células dos fungos), também representam riscos ecológicos significativos para a fauna terrestre não alvo e para os ecossistemas aquáticos próximos a áreas agrícolas (Zhang *et al.*, 2024). Evidências experimentais indicam que inibidores da succinato desidrogenase (*Succinate Dehydrogenase Inhibitor*, SDHI) podem provocar mortalidade, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e atrasos no desenvolvimento em organismos não alvo (Dwivedi; Gaur; Gupta, 2025).

Os efeitos negativos desses fungicidas também foram evidenciados em experimentos com anfíbios. Um estudo conduzido por Assis *et al.* (2022) testou diferentes concentrações de um produto à base de estrobilurina e carboxamida em girinos das espécies *Rana catesbeiana* e *Leptodactylus latrans*, revelando efeitos mutagênicos. Para *R. catesbeiana*, observou-se um aumento na frequência de micronúcleos, enquanto para *L. latrans*, foram registradas anormalidades nos eritrócitos.

Além dos impactos em anfíbios, efeitos sobre insetos também foram relatados. Em um estudo realizado por Saifullah *et al.* (2022), o fungicida fluazinam (grupo químico fenilpiridinilamina), um inibidor da fosforilação, foi testado em *Leptinotarsa decemlineata*. Os resultados indicaram que a exposição repetida ao composto causou alterações na expressão gênica, afetando genes envolvidos na desintoxicação metabólica, resistência a inseticidas e tolerância ao estresse. Esses achados sugerem um potencial para resistência cruzada com outros pesticidas e indicam que, por meio da modulação da expressão gênica, efeitos a longo prazo podem surgir.

De modo geral, a resistência a fungicidas é um fator crítico na produção agrícola, pois leva ao aumento do número de aplicações para manter a eficácia no controle de doenças, elevando os custos de produção e intensificando os impactos

ambientais (Ceresini *et al.*, 2024). Para contornar esse problema, é comum a adoção de misturas e alternâncias de fungicidas, que, embora possam melhorar o controle, frequentemente exigem o uso de produtos mais caros, aumentando ainda mais os custos (Corkley; Fraaije; Hawkins, 2022). Além disso, à medida que a resistência se torna mais prevalente, a resposta da doença às doses de fungicida se altera, levando à necessidade de maiores quantidades de produto, o que, apesar de reduzir a severidade da doença, também encarece o manejo fitossanitário (Van Den Bosch *et al.*, 2020).

A transição de uma dependência excessiva de fungicidas para uma abordagem integrada de manejo de doenças é essencial para reduzir a pressão de seleção para resistência. A combinação de estratégias de controle cultural, biológico e químico, aliada à boas práticas agrícolas, como rotação de culturas, diversificação de materiais de plantio e uso de cultivares resistentes, pode minimizar a necessidade de aplicações frequentes de fungicidas. Essas medidas não apenas reduzem os riscos associados à resistência, mas também promovem um manejo mais sustentável das doenças (Ceresini *et al.*, 2024).

2.2 FITOPATÓGENOS

2.2.1 *Colletotrichum truncatum*

O gênero *Colletotrichum* é amplamente reconhecido por sua significativa importância econômica na agricultura global, devido à sua capacidade de infectar diversas culturas. Essa relevância o posiciona na oitava posição no *ranking* global de fungos fitopatogênicos mais importantes, tanto do ponto de vista científico quanto econômico (Dean *et al.*, 2012). Na soja, *C. truncatum* é o agente causal da antracnose, doença que afeta tanto a fase de pré-emergência quanto a pós-emergência (Bouffleur *et al.*, 2021).

Um estudo de Dias, Pinheiro e Café-Filho (2016) revelou que, no Cerrado da região norte-centro-oeste do Brasil, a cada 1% de aumento na incidência de vagens doentes, há uma perda média de 90 kg/ha de soja. Esses dados não apenas destacam a gravidade da antracnose na soja, mas também seu impacto econômico, que ameaça a rentabilidade das lavouras em regiões tropicais. Nos Estados Unidos, a antracnose também representa um problema expressivo, como foi observado entre os anos de

1996 e 2023, as perdas acumuladas atribuídas à doença foram estimadas em 189 milhões de alqueires, gerando um prejuízo econômico aproximado de 1,5 bilhões de dólares (Crop Protection Network, 2024).

Os sintomas incluem manchas deprimidas, escuras e irregulares em cotilédones, pecíolos e caules, além de podridão nas vagens, que pode provocar sua abertura prematura e a germinação precoce dos grãos. A doença também causa necrose nas nervuras das folhas, levando à desfolha precoce (Bouffleur *et al.*, 2021). Sendo uma doença cosmopolita, a antracnose está presente em todas as regiões produtoras de soja no Brasil. O patógeno sobrevive em restos de cultura e sementes, sendo disseminado a longas distâncias por sementes infectadas ou contaminadas com conídios. A dispersão dentro dos campos ocorre por meio de restos vegetais e respingos de chuva ou irrigação (Agrofit, 2024).

Os fungos do gênero *Colletotrichum* se destacam pelo estilo de vida hemibiotrófico intracelular, que combina fases biotrófica e necrotrófica durante o ciclo de infecção. Na fase biotrófica, a infecção começa com hifas primárias intracelulares de grande diâmetro, que posteriormente se estreitam, ramificam-se e se espalham por todo o tecido do hospedeiro, uma característica da fase necrotrófica (Dean *et al.*, 2012).

Entre os metabólitos secundários do gênero, destacam-se a coletoclorina E, a coletopirona e a 6-hidroximelleína, compostos com notável toxicidade que contribuem para os danos às plantas hospedeiras (Reveglia *et al.*, 2023).

2.2.2 *Corynespora cassiicola*

C. cassiicola é um fitopatógeno com a capacidade de infectar mais de 500 espécies de plantas, incluindo culturas de grande importância econômica, como a soja (Mackenzie *et al.*, 2018). Esse fungo é causador da doença mancha-alvo em soja (Smith; Kelly; Lamour, 2021).

A primeira descrição de *C. cassiicola* como causador de doença na soja ocorreu em 1954, no estado de Nebraska (EUA). Na ocasião, foram observadas lesões no hipocótilo e nas raízes, que, à medida que a doença avançava, provocavam atrofiamento nas plântulas de soja (Boosalis; Hamilton, 1957, p. 696–698). Os sintomas causados por *C. cassiicola* nas plantas de soja são variados e podem comprometer significativamente o desenvolvimento da cultura. Nas folhas, observa-

se intensa desfolhação, geralmente iniciada nas folhas basais. As manchas foliares são circulares, com até 2 cm de diâmetro, e apresentam anéis concêntricos com o centro escuro, características típicas da infecção. Em hastes e vagens, as lesões também são frequentes, enquanto nas raízes a infecção se manifesta inicialmente por uma coloração castanho-clara. Com o avanço da doença, as plantas podem morrer, e as raízes apresentam-se recobertas por uma camada escurecida, formada por conídios e conidióforos do fungo. Embora menos comum, a infecção em sementes também pode ocorrer, resultando em uma coloração castanho-escura (Agrofit, 2024).

Além disso, *C. cassiicola* pode sobreviver em estado de hibernação em raízes e caules infectados, ou até mesmo em solo infestado, por pelo menos dois anos (Boosalis; Hamilton, 1957, p. 696–698). A disseminação pode ocorrer por meio de sementes infectadas ou contaminadas. No campo, ela é facilitada pelos trabalhos de preparação do solo, pela água de precipitações pluviais ou pela irrigação. A disseminação secundária acontece também pelo vento. Além disso, precipitações prolongadas durante o período de maturação da cultura favorecem o desenvolvimento da doença (Agrofit, 2024).

Dentre os fatores que influenciam a patogênese, a cassiicolina se destaca como uma toxina determinante para a infecção primária, sendo relatada como um metabólito produzido por *C. cassiicola* (Breton; Sanier; D'Auzac, 2000). Essa substância atua como uma toxina seletiva do hospedeiro, resultando em danos severos à estrutura celular das folhas (Barthe *et al.*, 2007).

2.2.3 *Diaporthe* spp.

Diaporthe representa a forma sexuada (teleomorfo) do fungo, enquanto a forma assexuada (anamorfo) é conhecida como *Phomopsis*. Contudo, recomenda-se o uso exclusivo de *Diaporthe* para nomear o gênero, considerando dois fatores principais: (1) cerca de 1.000 nomes foram descritos para ambos os gêneros, muitos dos quais correspondem a morfos sexuais e assexuais da mesma espécie; (2) *Diaporthe* foi introduzido anteriormente a *Phomopsis* (*Diaporthe* 1870 versus *Phomopsis* 1905) e representa a maioria das espécies descritas. A formalização dessa nomenclatura foi sugerida por Rossman *et al.* (2015), corroborando estudos prévios (Udayanga *et al.*, 2011).

As espécies de *Diaporthe* atuam como fitopatógenos e endófitos em uma ampla gama de hospedeiros. Trata-se de um gênero cosmopolita, entre cujas espécies destacam-se algumas de importância econômica significativa, como na cultura da soja (Santos *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2013). Fungos desse gênero estão associados ao desenvolvimento do cancro do caule em soja (Backman; Weaver; Morgan-Jones, 1985). Recentemente, Petrović *et al.* (2021) propuseram renomear essa doença como podridão de sementes de *Diaporthe*.

No Brasil, espécies como *D. longicolla* e *D. ueckeri* têm sido relatadas como agentes causadores de uma doença endêmica, afetando principalmente os produtores do estado do Mato Grosso (MT). A incidência da doença varia entre 10% e 40%, gerando impactos econômicos significativos no país (Nascimento *et al.*, 2024). Nos Estados Unidos, o cancro da haste também tem relevância econômica expressiva. Entre os anos de 1996 e 2023, as perdas acumuladas foram estimadas em 180 milhões de alqueires, o que resultou em um prejuízo econômico de aproximadamente 1,6 bilhões de dólares (Crop Protection Network, 2024). Na China, constatou-se que, nos últimos anos, houve um aumento na frequência de *Diaporthe* sp., provocando perdas no rendimento na soja de 10% a 30%. Esse cenário tem sido atribuído à ausência de tratamentos de sementes adequados e ao uso limitado de cultivares resistentes (Zhao *et al.*, 2022b).

Diaporthe spp. causa deterioração em sementes de soja, especialmente em condições quentes e úmidas, afetando principalmente os estágios de reprodução (R5 e R6) e maturação (R7 e R8). Os danos são mais severos na pré-colheita, particularmente em caso de atrasos, impactando diretamente a qualidade das sementes (Petrović *et al.*, 2021; Hosseini, 2023). Cultivares de maturação precoce apresentam maior suscetibilidade à infecção em comparação às de maturação tardia (Batzler; Mueller, 2020).

Sementes infectadas podem não exibir sintomas visuais em casos de infecção menos severa. Entretanto, infecções mais graves resultam em sementes menores, opacas, enrugadas e alongadas (Haafke, 2021). Além disso, essas sementes representam uma fonte de disseminação do patógeno para áreas previamente livres de *Diaporthe* (Hosseini, 2023). *Diaporthe* pode ser disseminado através de corpos de frutificação formados em restos culturais, na forma de picnídios e peritécios, além da disseminação através da liberação de esporos, que podem ser na forma de conídios e ascósporos, disseminando-se através da chuva e vento (Hosseini, 2023).

Apesar de sua importância, os mecanismos de infecção e colonização de *Diaporthe* em tecidos de soja ainda não são totalmente compreendidos. Estudos adicionais são necessários para identificar fatores de virulência, como fitotoxinas e efetores. Embora promissor, o diagnóstico molecular ainda enfrenta limitações na diferenciação de espécies em diferentes tecidos vegetais, além de haver poucas pesquisas sobre a patogenicidade e diversidade desses fitopatógenos (Hosseini, 2023; Zhao *et al.*, 2022b). Como *Diaporthe* possui ampla distribuição geográfica e variedade de hospedeiros, a diversificação ambiental pode levar ao surgimento de novas espécies, contribuindo para a resistência ao uso de fungicidas (Zhao *et al.*, 2022b).

2.2.3.1 *Diaporthe longicolla*

Estudos conduzidos por Sureshbabu *et al.* (2024) tiveram como objetivo analisar a relação entre a infecção de caule e sementes de soja causada por *D. longicolla*. Os autores concluíram que o desenvolvimento de cultivares geneticamente resistentes pode representar uma alternativa promissora para o manejo dessa doença, desde que seja economicamente viável. No entanto, destacaram que, até a data da publicação do estudo, havia uma carência significativa de informações disponíveis sobre cultivares resistentes nos Estados Unidos. Essa limitação é especialmente preocupante, considerando que no país, *D. longicolla* é apontado como o principal agente causal de podridão de caule e vagens, além de contribuir para a deterioração de sementes de soja, impactando negativamente a produtividade e a qualidade do cultivo.

2.2.3.2 *Diaporthe ueckeri*

D. ueckeri foi descrito pela primeira vez por Udayanga *et al.* (2015), sendo isolado de melão (*Cucumis melo* L.). Os autores destacaram o potencial patogênico dessa espécie em diversos hospedeiros, incluindo a soja, devido ao seu caráter oportunista. Posteriormente, Thompson *et al.* (2015) introduziram *D. miriciae* como patógeno que pode ser encontrado na soja. No entanto, o clado de *D. ueckeri* inclui nove isolados, entre eles *D. miriciae*, mas devido à precedência na data de publicação,

D. ueckeri é a nomenclatura prioritária conforme estabelecido por Gao, Liu e Cai (2016).

Na América do Sul, *D. ueckeri* foi relatado pela primeira vez na Colômbia, em 2018, causando lesões alongadas de cor preta a marrom-avermelhada nos caules, com uma incidência de 20% de plantas de soja doentes (López-Cardona *et al.*, 2021).

Posteriormente, Mena *et al.* (2024) registraram pela primeira vez *D. ueckeri* como causador de cancro da haste em soja no Uruguai.

Mais recentemente, *D. ueckeri* foi relatado pela primeira vez no Brasil como causador de doenças em soja (Santos *et al.*, 2024).

2.2.4 *Fusarium* spp.

O gênero *Fusarium* pleomórfico apresenta estados teleomorfos, como *Gibberella*, *Nectria*, *Haematonectria* e *Neocosmospora*. Contudo, o uso da forma anamorfa (*Fusarium*) é amplamente recomendado devido à sua relevância científica e prática (Geiser *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2013; Tupaki-Sreepurna; Kindo, 2018). *Fusarium* compreende pelo menos dez complexos de espécies filogeneticamente relacionadas, resultado de sua importância tanto na agricultura quanto como patógeno de humanos e animais (O'Donnell *et al.*, 2010; Tupaki-Sreepurna; Kindo, 2018).

Trata-se de um gênero cosmopolita, reconhecido como um dos mais significativos na agricultura, dada sua alta patogenicidade em plantas. As toxinas produzidas por *Fusarium* podem contaminar produtos agrícolas e causar doenças severas. Os sintomas em plantas incluem queimaduras, cancrios e murchas, que afetam culturas hortícolas, ornamentais e grandes culturas. Esses danos comprometem significativamente a qualidade e a produtividade das plantas (Ma *et al.*, 2013; Ekwomadu; Mwanza, 2023).

Um exemplo da relevância econômica deste gênero como causador de doenças na soja é o impacto observado entre os anos de 1996 e 2023, período em que as perdas estimadas alcançaram 164 milhões de alqueires, resultando em um prejuízo econômico de aproximadamente 1,4 bilhões de dólares nos Estados Unidos (Crop Protection Network, 2024).

Em um estudo realizado por Ekwomadu, Gopane e Mwanza (2018), observou-se a predominância de *Fusarium* em 82% das amostras de milho (*Zea mays* L.) destinadas à alimentação humana na África do Sul. A presença dessas toxinas, como

tricotecenos, fumonisinas e zearalenona, representa um risco grave à saúde, podendo contaminar alimentos e rações, tornando-os impróprios para consumo e, em casos extremos, levando à morte (Ma *et al.*, 2013; Ekwomadu; Mwanza, 2023).

Em um estudo conduzido por Arias, Leandro e Munkvold (2013), foram testadas nove espécies de *Fusarium* em soja, tanto em condições de campo quanto em estudos controlados. As plantas infectadas apresentaram sintomas de podridão radicular, com impacto significativo no comprimento, área da superfície, e massa das raízes, variando entre e dentro das espécies ao longo dos estágios vegetativo e reprodutivo. Os resultados indicaram que a infecção pode levar à redução do rendimento devido à deterioração da saúde das raízes, comprometendo o suporte físico, a nodulação, e a absorção e transporte de água e nutrientes do solo para a planta. Entre as espécies avaliadas, *F. graminearum* foi a que causou as lesões mais severas, embora a associação desse fungo com danos às raízes de soja seja um fenômeno relativamente recente.

O desenvolvimento de *Fusarium* é favorecido por condições de cultivo quentes e secas (Ekwomadu; Mwanza, 2023). A infecção apresenta variabilidade: inicialmente como biotrófico (dependente de hospedeiro vivo) e, posteriormente, transicionando para um estilo de vida necrotrófico, em que consome células do hospedeiro, resultando em sua morte. Sua disseminação ocorre pelo ar, água e, predominantemente, pelo solo, onde os esporos podem sobreviver por muitos anos. Equipamentos agrícolas contaminados e insetos também são vetores de disseminação. *Fusarium* sobrevive em ampla variedade de condições ambientais (Ma *et al.*, 2013).

Os mecanismos de infecção incluem componentes de vias de sinalização celular, utilização de enzimas (celulases, pectinases e xilanases) para degradação da parede celular vegetal, e fatores de virulência, como toxinas e efetores, que facilitam a colonização do hospedeiro (Ma *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2020; Ekwomadu; Mwanza, 2023).

O controle de *Fusarium* apresenta desafios significativos devido à ineficácia de métodos físicos, químicos e culturais, além do elevado custo associado (Ekwomadu; Mwanza, 2023). Apesar de sua relevância para a produção de soja, a patogenicidade de *Fusarium* transmitido por sementes ainda não é totalmente compreendida. Em algumas espécies, o controle pode ser realizado por meio do tratamento de sementes; no entanto, durante os estágios finais de desenvolvimento

das plantas, a eficácia desse método diminui, tornando-o incapaz de controlar completamente a doença. Além disso, o uso prolongado de um único agente químico pode resultar na seleção de populações resistentes (Chang *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2024).

2.2.4.1 *Fusarium incarnatum-equiseti*

A especiação de *Fusarium* no complexo *F. incarnatum-equiseti* (FIESC) é considerada críptica, exigindo métodos adicionais de identificação além dos tradicionais. O complexo atualmente inclui 40 espécies filogenéticas, agrupadas em dois clados principais: *equiseti* e *incarnatum* (O'Donnell *et al.*, 2009; O'Donnell *et al.*, 2012; Villani *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2019). As espécies pertencentes ao complexo FIESC exibem variação em sua patogenicidade e toxicidade, podendo causar danos severos em diferentes tecidos da soja, dependendo das condições ambientais e do hospedeiro (Zhao *et al.*, 2022a).

Verma *et al.* (2024) destacaram que espécies do complexo FIESC estão associadas à podridão de grãos e vagens em várias culturas de importância econômica, incluindo a soja, alertando para o potencial de ameaça representado por esses fungos. O apodrecimento dos tecidos vegetais ocorre por meio da ação de enzimas extracelulares, como pectinases e celulases, que degradam as paredes celulares (Ghosal; Datta, 2024).

2.2.4.2 *Fusarium graminearum*

F. graminearum é amplamente reconhecido como um patógeno de poáceas, sendo responsável por causar giberela em diversas culturas de cereais, especialmente no trigo, além de provocar podridão da espiga e do colmo no milho. No entanto, também foi identificado infectando a soja, com o primeiro isolamento ocorrido entre 2001 e 2002, na Argentina, em sementes e partes vegetativas dessa cultura. Na ocasião, observou-se descoloração externa em partes do caule, com o interior apresentando coloração marrom-claro. As folhas exibiram clorose internerval, e as sementes apresentaram tegumento rosado (Detranaltes; Ma; Cai, 2023; Pioli; Mozzoni; Morandi, 2004).

Em um estudo realizado no Brasil com diversas linhagens de *F. graminearum*, foram observados sintomas característicos, como lesões necróticas em vagens semelhantes à queimaduras, que se expandiram para o interior da vagem, colonizando completamente o tegumento, o endosperma e o embrião das sementes de soja. As sementes infectadas não apresentaram coloração vermelha, mas sim manchas necróticas marrons e afundadas, além do desenvolvimento de um micélio branco e fofo (Martinelli *et al.*, 2004).

F. graminearum foi um dos primeiros patógenos a ter seu genoma completamente sequenciado, devido à sua relevância global como causador de doenças em plantas e seres humanos (Cuomo *et al.*, 2007; Brown; Antoniw; Hammond-Kosack, 2012). O sequenciamento genômico permitiu identificar ao menos 109 proteínas do secretoma do fungo, que desempenham papéis cruciais na interação com as plantas hospedeiras, atacando a cutícula e os componentes da parede celular das plantas, como as microfibrilas de celulose (Brown; Antoniw; Hammond-Kosack, 2012).

Apesar dos avanços, os mecanismos de patogênese e infecção de *F. graminearum* ainda não estão totalmente compreendidos. Entender esses processos é essencial para implementar estratégias de manejo mais eficazes direcionadas ao controle do patógeno em seus hospedeiros (Naeem *et al.*, 2021). Nesse contexto, foi realizada uma análise de RNA-seq, que revelou 2.313 genes diferencialmente expressos (DEGs). Esses genes fornecem informações importantes sobre o metabolismo do carbono, peroxissomos, eliminação de EROs, biossíntese de micotoxinas, reprodução sexual e virulência, ampliando o entendimento das interações moleculares entre *F. graminearum* e a soja.

2.2.5 *Macrophomina phaseolina*

M. phaseolina causa a doença chamada podridão de carvão em várias culturas de importância econômica, como milho, sorgo, algodão e principalmente a soja, além de outros 500 hospedeiros (Thakur; Reddy; Mathur, 2007). O fungo causa perdas significativas no rendimento e produtividade da soja (Shamrao, 2020). Nos Estados Unidos, a podridão de carvão apresenta elevada relevância econômica. Entre os anos de 1996 e 2023, as perdas acumuladas foram estimadas em 728 milhões de alqueires, resultando em um impacto financeiro de aproximadamente 6 bilhões de

dólares (Crop Protection Network, 2024). No Brasil, em 1994, as perdas de soja causadas por este fungo foram estimadas em 930 mil toneladas, enquanto nos Estados Unidos o impacto foi de 275 mil toneladas (Wrather *et al.*, 1997).

O fungo era considerado um patógeno necrótrofico. No entanto, atualmente é tratado como hemibiotrófico, pois foi verificado que há uma fase biotrófica distinta de até 36 horas antes do início do colapso necrótrofico do tecido, o que dificulta a detecção precoce no campo em decorrência dessa fase de infecção biotrófica assintomática (Chowdhury; Basu; Kundu, 2017; Shirai; Eulgem, 2023).

O fungo se desenvolve em condições climáticas quentes e secas, e as perdas são aumentadas em condições de alta umidade. Em algumas situações, pode não haver sintomas aparentes em soja, mas ainda assim ocorrer contaminação por este fungo, disseminando-se não apenas pelo solo, mas também por sementes (Sarr *et al.*, 2014; Shamrao, 2020). O fungo se espalha das raízes para o caule, formando estruturas chamadas microescleródios (aglomerados esféricos de células hifais), que podem sobreviver de 2 a 15 anos no solo. A infecção causa obstrução do tecido vascular, e ao atingir vasos do xilema, bloqueia a translocação de água e carboidratos para as partes superiores da planta, resultando em sintomas como murchas, amarelecimento e atrofiamento das plantas (Shamrao, 2020; Thakur; Reddy; Mathur, 2007; Shirai; Eulgem, 2023).

Dada a importância do patógeno, seu genoma foi sequenciado (Islam *et al.*, 2012), constatando-se que ele é capaz de produzir em abundância enzimas oxidativas, peroxidases e hidrolíticas, que possuem capacidade de degradar componentes da parede celular vegetal. Além disso, o fungo apresenta um conjunto de esterases de carboidratos com famílias mais amplas do que qualquer outro fungo. Dados de *microarray* fenotípico indicam que o fitopatógeno é altamente adaptável a diferentes condições ambientais, como variações de potencial osmótico e pH. Além das enzimas, possui um amplo número de genes associados à interação patógeno-hospedeiro, incluindo genes envolvidos na adesão, transdução de sinal e biossíntese de purinas (Islam *et al.*, 2012).

O patógeno produz diversas toxinas, como a potente patulina, sendo a principal a faseolinona, que causa danos ao protoplasto celular (Thakur; Reddy; Mathur, 2007; Islam *et al.*, 2012).

O controle químico de *M. phaseolina* é difícil, pois até o momento não há registro de fungicida eficaz para controlar esse patógeno. Não existe fungicida sistêmico com capacidade de se mover em direção às raízes (Marquez *et al.*, 2021).

Dessa forma, o uso de agentes biológicos surge como uma alternativa promissora para controlar doenças causadas por *M. phaseolina*, impactando diretamente no patógeno, inibindo seu crescimento e promovendo o uso de metabólitos vegetais e elicitores de defesas vegetais (Reznikov *et al.*, 2016; Marquez *et al.*, 2021).

2.3 *Bacillus* spp.

Bactérias do gênero *Bacillus* são microrganismos Gram-positivos, catalase positivos, com morfologia predominantemente no formato de bastonetes. Podem apresentar metabolismo aeróbio ou anaeróbio facultativo e possuem a capacidade de formar endósporos altamente resistentes, característica essencial para sua sobrevivência e colonização em diferentes ambientes. Essas estruturas permitem que resistam às condições adversas, incluindo variações extremas de temperatura, o que explica sua presença tanto em ambientes mesófilos quanto em extremos. *Bacillus* são capazes de formar biofilmes, que são agregados multicelulares que facilitam a sua associação em superfícies e interfaces. Após o estabelecimento desses agregados, inicia-se a produção da matriz extracelular, que são formadas principalmente por exopolissacarídeos e proteínas excretadas da célula (Branda *et al.*, 2005; Herrmann *et al.*, 2024). Essas bactérias podem ser encontradas em diversos locais, incluindo ar, água e solo, além disso, *Bacillus* apresenta metabolismo quimiorganotrófico, utilizando compostos orgânicos como fonte de carbono e energia (Baruzzi *et al.*, 2011; Herrmann *et al.*, 2024).

O gênero *Bacillus* destaca-se como um dos mais aplicados em processos industriais, visto que em grande maioria não são patogênicas e livres de exotoxinas e endotoxinas, várias cepas são rotuladas como geralmente reconhecido como seguro (*Generally Recognised as Safe*, GRAS) e presunção qualificada de segurança (*Qualified Presumption of Safety*, QPS) pelos Estados Unidos e União Europeia, respectivamente, incluindo espécies relevantes como *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* e *B. pumilus* (Liu *et al.*, 2013; Herrmann *et al.*, 2024).

O gênero *Bacillus* é altamente versátil, apresentando aplicações em diversas áreas devido à sua capacidade de produzir substâncias bioativas, como enzimas, antibióticos, vitaminas, aminoácidos e ácidos orgânicos (Yang *et al.*, 2025). Espécies desse gênero têm sido amplamente empregadas em formulações probióticas (Elshaghabee *et al.*, 2017), na fermentação de alimentos (Kimura; Yokoyama, 2019), em processos de biorremediação (Yang *et al.*, 2025), entre outras aplicações.

Na agricultura, essas bactérias atuam por meio de diversos mecanismos, incluindo a fixação de nitrogênio, a solubilização e mineralização de nutrientes, a produção de fitohormônios e sideróforos, a síntese de compostos antimicrobianos e enzimas hidrolíticas, além da indução de resistência sistêmica e do aumento da tolerância a estresses abióticos (Goswami; Thakker; Dhandhukia, 2016; Saxena *et al.*, 2020).

Além de promoverem o crescimento vegetal, bactérias do gênero *Bacillus* também podem atuar na proteção das plantas contra fitopatógenos (Maral-gül; Eltem, 2025). De modo geral, o principal mecanismo está associado à antibiose, na qual enzimas hidrolíticas extracelulares são capazes de degradar polissacarídeos e ácidos nucleicos dos microrganismos patogênicos (Castillo *et al.*, 2013). Chen *et al.* (2023) destacam ainda a importância dos peptídeos antimicrobianos, produzidos naturalmente, que apresentam atividade contra bactérias, parasitas, vírus e fungos. De forma complementar, Yu *et al.* (2023) discutem a atuação de metabólitos secundários, como peptídeos não ribossômicos e policetídeos, que também contribuem para os efeitos de biocontrole.

2.4 LIPOPEPTÍDEOS

Os lipopeptídeos (LPs) apresentam diversas propriedades funcionais, incluindo potencial de emulsificação/desemulsificação, dispersão, formação de espuma, mobilização e solubilização, capacidade de formar poros e redução de viscosidade (Mnif *et al.*, 2022). Eles apresentam potencial para diversas aplicações em variados setores, incluindo farmacêutico, agrícola, químico e alimentício. A estrutura anfipática dos LPs faz com que eles apresentem um amplo espectro de bioatividade, abrangendo propriedades antibacterianas, antivirais, antifúngicas e anticancerígenas (Saiyam *et al.*, 2024).

A biossíntese de LPs em bactérias do gênero *Bacillus* ocorre de maneira específica para cada cepa, sendo os genes responsáveis organizados em *clusters*, o que resulta em diferenças quanto às propriedades, modificações e mecanismos de transporte dessas moléculas (Saiyam *et al.*, 2024). O processo tem início com a ativação de aminoácidos dependente de adenosina trifosfato (ATP), permitindo sua incorporação na cadeia peptídica em crescimento. Essa etapa é realizada pelas peptídeo sintetases não ribossomais (*Nonribosomal Peptide Synthetases*, NRPSs), complexos multienzimáticos que incorporam os aminoácidos em cadeias em crescimento por meio de domínios especializados, permitindo sua ativação, seleção e formação das ligações peptídicas. Dessa forma, são gerados os peptídeos precursores, que formam a “espinha dorsal” das moléculas de LPs (Saiyam *et al.*, 2024).

A fração lipídica, geralmente composta por ácidos graxos, é adicionada a esse peptídeo precursor por meio de modificações enzimáticas. As enzimas responsáveis por essa ligação fazem parte do *cluster* genético, catalisando a união covalente da cauda lipídica a um aminoácido específico da cadeia peptídica. O aminoácido de ligação pode variar dependendo do tipo de LPs produzidos. Após a síntese inicial, podem ocorrer modificações pós-traducionais como ciclização, oxidação e glicosilação, que contribuem para a estrutura final e para as propriedades funcionais dos LPs. A produção dessas moléculas é fortemente regulada pela célula bacteriana e depende de fatores ambientais, como disponibilidade de nutrientes e densidade celular, que modulam a expressão dos genes presentes no *cluster* (Saiyam *et al.*, 2024).

Entre os LPs sintetizados de forma não ribossomal por espécies do gênero *Bacillus*, destacam-se três principais famílias: iturinas, fengicinas e surfactinas. Essas famílias são classificadas de acordo com a composição de aminoácidos em sua estrutura cíclica. As iturinas e as surfactinas apresentam um anel peptídico formado por sete aminoácidos, enquanto as fengicinas possuem um anel constituído por dez aminoácidos. Esse anel está ligado a uma fração lipídica composta por um ácido graxo: nas fengicinas e surfactinas trata-se de um ácido graxo do tipo β -hidroxi, com cadeias variando entre 14 e 19 carbonos para fengicinas e 12 a 17 carbonos para surfactinas. Já nas iturinas, os ácidos graxos apresentam entre 14 e 17 carbonos, podendo ser do tipo β -amino (Malfanova *et al.*, 2012).

Do ponto de vista funcional, as iturinas e fengicinas são reconhecidas principalmente por suas propriedades antifúngicas, enquanto as surfactinas se destacam pelas atividades antivirais e antibacterianas (Malfanova *et al.*, 2012).

Além da atividade antifúngica que pode ser benéfica para controle de patógenos, essas moléculas também facilitam a disseminação de bactérias benéficas pelos órgãos das plantas, além de provocar uma resposta de resistência sistêmica na planta, auxiliando a combater o patógeno (agindo como “imunoestimuladores”) (Favaro *et al.*, 2016).

Grande parte dos fungos apresentam a parede celular composta por uma camada externa de proteínas, que são organizadas em fibrilas altamente glicosiladas, que são densamente compactadas na formação da parede celular, e por consequência, determinam a permeabilidade e a carga da superfície celular. Também pode existir uma camada interna, que é rica em polissacarídeos que é composta principalmente de β -1,6- e β -1,3-glucanos e quitina (Ibe; Oladele; Alamir, 2022). A parede celular fúngica é um excelente alvo para o desenvolvimento de profiláticos, diagnósticos e terapêuticos (Ibe; Oladele; Alamir, 2022).

Os LPs com atividade antifúngica foram identificados quando foram realizadas investigações *in vitro* com fungos fitopatogênicos. De modo geral, os LPs atuam se ligando na membrana plasmática fúngica, desorganizando a bicamada lipídica (Ramesh *et al.*, 2024).

A iturina atua rompendo a membrana celular de fungos e bactérias ao interagir com os componentes lipídicos da membrana, o que propicia a lise celular (Saiyam *et al.*, 2024). A fengicina atua rompendo membrana plasmática através da formação de poros na membrana, que acarreta o efluxo do material celular e consequentemente levando a morte celular (Wise *et al.*, 2014; Saiyam *et al.*, 2024). A surfactina é notável por conta de suas propriedades tensoativas, que resulta na diminuição da tensão superficial, formando micelas. Além disso, apresenta ações antimicrobianas atuando sobre a membrana celular, rompendo-a através da interação de sua cauda hidrofóbica à bicamada lipídica que resulta na permeabilização da membrana e consequentemente a morte celular (Saiyam *et al.*, 2024).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE DESENVOLVIMENTO

Os experimentos foram desenvolvidos na Universidade Federal do Paraná - UFPR Setor Palotina, no Laboratório Experimental de Micologia Aplicada (NEMA).

Para as análises de caracterização do extrato, amostras foram encaminhadas para a Central de Análises Químicas do Instituto de Biotecnologia (CAIB), na Universidade de Caxias do Sul (UCS), Rio Grande do Sul (sob supervisão do Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva).

3.2 MICRORGANISMOS

3.2.1 Isolados *Bacillus* spp.

As bactérias do gênero *Bacillus* foram gentilmente cedidas por pesquisadores parceiros. Os isolados estão armazenados em freezer a -20 °C, contendo meio LB (Luria-Bertani) e glicerol (15%).

3.2.2 Isolados fitopatogênicos

Amostras de sementes de soja foram cedidas por um laboratório de sementes localizado na cidade de Palotina, Paraná. Os isolados fúngicos foram obtidos através do método do papel filtro (*Blotter Test*) conforme descrito no Manual de Análise Sanitária de Sementes (Brasil, 2009).

A metodologia consistiu na distribuição de 200 sementes de soja em placas de Petri, com 25 sementes por placa, totalizando oito repetições. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso. A montagem do teste foi realizada com duas folhas de papel mata-borrão autoclavadas, dispostas sobre o fundo de cada placa, as quais foram umedecidas com água destilada previamente esterilizada. As sementes foram posicionadas com o auxílio de uma pinça esterilizada, mantendo-se um espaçamento de aproximadamente 1 a 2 cm entre elas. As condições de incubação

foram estabelecidas em fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, durante um período de 7 dias, a uma temperatura de 20 ± 2 °C.

Após a realização do *Blotter Test*, as sementes que apresentaram crescimento de micélio mais recorrentes, foram individualmente submetidas a desinfecção superficial, utilizando hipoclorito de sódio 2% durante 3 minutos, seguido de submersão em álcool 70% durante 1 minuto e depois lavagem com água destilada. Após a desinfecção, as sementes foram transferidas, individualmente, para placa de Petri contendo meio de cultura Sabouraud Dextrose Ágar (SDA) suplementado com cloranfenicol e incubadas em estufa de crescimento durante 5 dias à temperatura de 28°C (± 2 °C). Após o crescimento em meio SDA, foram feitos repiques para o meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) até se obter a cultura pura, as condições de cultivo foram as mesmas utilizadas para o meio SDA.

3.3 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

3.3.1 Macroscópica e Microscópica

As características macroscópicas e microscópicas foram analisadas com o objetivo de verificar a pureza das colônias e registrar as particularidades morfológicas dos fitopatógenos isolados.

Após o isolamento das colônias fúngicas em culturas axênicas, as características macroscópicas como a cor, textura e tamanho foram observadas. Já na análise microscópica, utilizou-se um microscópio óptico com objetiva de 40x e ocular de 10x, totalizando aumento de 400 vezes. Para a visualização das hifas e estruturas de reprodução assexuada, empregou-se a técnica da fita adesiva (Durex).

Inicialmente, depositou-se uma gota de corante azul de lactofenol sobre uma lâmina limpa. Em seguida, um pequeno pedaço de fita adesiva foi pressionado levemente sobre a superfície da colônia fúngica, de modo a coletar estruturas do micélio. A fita contendo o material foi cuidadosamente transferida e fixada sobre a lâmina com o corante. Após a montagem, as lâminas foram observadas ao microscópio, e as estruturas fúngicas foram registradas por meio de fotografias tiradas com um aparelho celular.

3.3.2 Identificação molecular dos fitopatógenos

O DNA dos fungos foi extraído utilizando o kit *Plant/Fungi DNA Isolation da Norgen Biotek Corporation*, conforme protocolo sugerido pelo fabricante. O DNA extraído foi avaliado quanto à sua pureza e concentração em espectrofotômetro NanoDrop2000® (Thermo Fisher), observando-se a absorvância a 260 e 280 nm, além das relações 260/280 nm e 260/230 nm.

Após a extração, a região do espaçador transcricional interno (*Internal Transcribed Spacer*, ITS) do rDNA ITS1-5.8S-ITS2 (Mirhendi *et al.*, 2006) foi amplificada, pela técnica de reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR), seguindo a recomendação do kit *GoTaq Master Mix* (Promega), em uma reação de 25 µL contendo aproximadamente 100 ng do DNA genômico, 0,4 µM do iniciador *forward* ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e do iniciador *reverse* ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), 0,2 mM de cada dNTP (trifosfatos de desoxirribonucleosídeos), 2 mM de MgCl₂ e 1 U de GoTaq DNA Polimerase no tampão apropriado da enzima. As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos; 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 56 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto; com extensão final a 72 °C por 5 minutos, em termociclador. A confirmação da amplificação foi realizada através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v) em tampão TBE 1X (Tris-base 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2 mM pH 8,0), corado com SYBR® Safe (Invitrogen), utilizando padrão de tamanho molecular de 100 pb (Ludwig Biotecnologia) e visualizado utilizando o equipamento *White Ligth Transilluminator* (Kasvi) para fotodocumentação.

Para a realização do sequenciamento, uma alíquota de 10 µL da reação de PCR foi seca em estufa a 50 °C juntamente com 7,5 µM dos iniciadores *forward* e *reverse* e enviada para a empresa Ludwig Biotecnologia LTDA, Alvorada-RS, para a realização do sequenciamento. Foi utilizado o sequenciador automático ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*). O eletroferograma gerado foi editado utilizando o software BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.7.1.0 (Hall, 1999) e os resultados do sequenciamento comparados com as sequências depositadas no banco de dados GenBank, NCBI (*National Center for Biotechnology*), através da ferramenta BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide*).

3.4 CULTURA PAREADA (ANTAGONISMO)

Os ensaios de antagonismo foram conduzidos em triplicata para cada microrganismo, na presença de cada bactéria avaliada. Inicialmente, placas de Petri de 90 × 15 mm foram preparadas contendo meio BDA, previamente autoclavado a 121 °C por 20 minutos.

O ensaio de antagonismo foi realizado com base no método descrito por Haidar *et al.* (2016), com adaptações. Um disco de 9 mm contendo micélio fúngico, retirado de colônias com 5 dias de crescimento, foi colocado no centro da placa. Em seguida, foi realizada uma inoculação bacteriana utilizando a extremidade oposta de uma alça de inoculação de 10 µL, por meio de uma picada a 2,5 cm da borda do disco fúngico, medida a partir da extremidade do micélio até o ponto de inoculação. As placas foram incubadas a 28 °C por 5 dias. O ensaio foi realizado em triplicata, o controle foi realizado sem a inoculação da bactéria.

Os resultados foram obtidos por meio do software *ImageJ* (Rasband, 2011). Para isso, cada ensaio foi devidamente identificado e fotografado, sendo posicionada uma régua ao lado de cada placa no momento da captura da imagem, a fim de calibrar a escala no software. A partir dessa calibração, foi determinada a equivalência entre pixels e centímetros, possibilitando o cálculo da área de crescimento do fitopatógeno.

Com base nas áreas obtidas, foi calculada a média das triplicatas para cada microrganismo. A seguir, a porcentagem de inibição do crescimento fúngico foi determinada conforme proposto por Jia *et al.* (2023), sendo expressa pela seguinte equação (1):

Equação (1)

$$\text{Porcentagem de inibição \%} = (d - d_0) / d \times 100\%$$

Onde:

- d (mm²) representa a área de crescimento da colônia fúngica no grupo controle;
- d_0 (mm²) representa a área de crescimento da colônia fúngica no grupo tratado com a bactéria.

3.5 EXTRAÇÃO DE LIPOPEPTÍDEOS

Para a extração dos LPs de *Bacillus*, o cultivo foi iniciado a partir de estoques conservados em glicerol. Uma alíquota de 40 μ L foi semeada em meio Plate Count Agar (PCA) e incubada por 24 horas a 37 °C. A partir da cultura fresca, foi preparado um pré-inóculo: com auxílio de uma alça de platina, algumas colônias foram transferidas para um frasco tipo Schott contendo 100 mL de meio líquido LB. Este cultivo foi mantido a 30 °C, sob agitação orbital (Lucadema, Luca-222) de 120 rpm, durante 24 horas.

O pré-inóculo obtido em meio LB foi então padronizado por meio da densidade óptica, ajustada para valores entre 0,05 e 0,13 de absorbância, medida a 620 nm. Em seguida, alíquotas correspondentes a 10% do volume total do meio mínimo (500 mL) foram utilizadas para inocular dois frascos Erlenmeyer de 1 L. Um terceiro frasco, contendo apenas o meio mínimo, foi utilizado como controle.

O meio de cultivo utilizado para a síntese dos LPs foi adaptado de Bicca, Fleck e Ayub (1999), com a seguinte composição (g/L): NaNO_3 7,0; K_2HPO_4 1,0; KH_2PO_4 0,50; KCl 0,10; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,50; CaCl_2 0,01; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01; extrato de levedura 0,10; suplementado com 2% de sacarose, conforme descrito por Bueno (2008). As condições de cultivo foram adaptadas de Bicca, Fleck e Ayub (1999). A fermentação foi conduzida em agitador orbital, por 72 horas, a 30 °C, sob agitação de 200 rpm. O pH do meio de cultivo foi ajustado para 7,0 antes da adição do pré-inóculo.

As operações unitárias para a extração dos LPs a partir do caldo fermentado foram adaptadas de Rocha (2017). Inicialmente, o caldo fermentado foi transferido para tubos cônicos com capacidade para 50 mL e então foram centrifugados (Hoffmannlab, HCL-4) a 4.000 rpm, por 20 minutos. O precipitado obtido no fundo dos tubos foi descartado, e o sobrenadante livre de células foi submetido à precipitação ácida, ajustando-se o pH para 2,0 com HCl 6,0 M. As amostras foram mantidas em repouso a 4 °C, overnight.

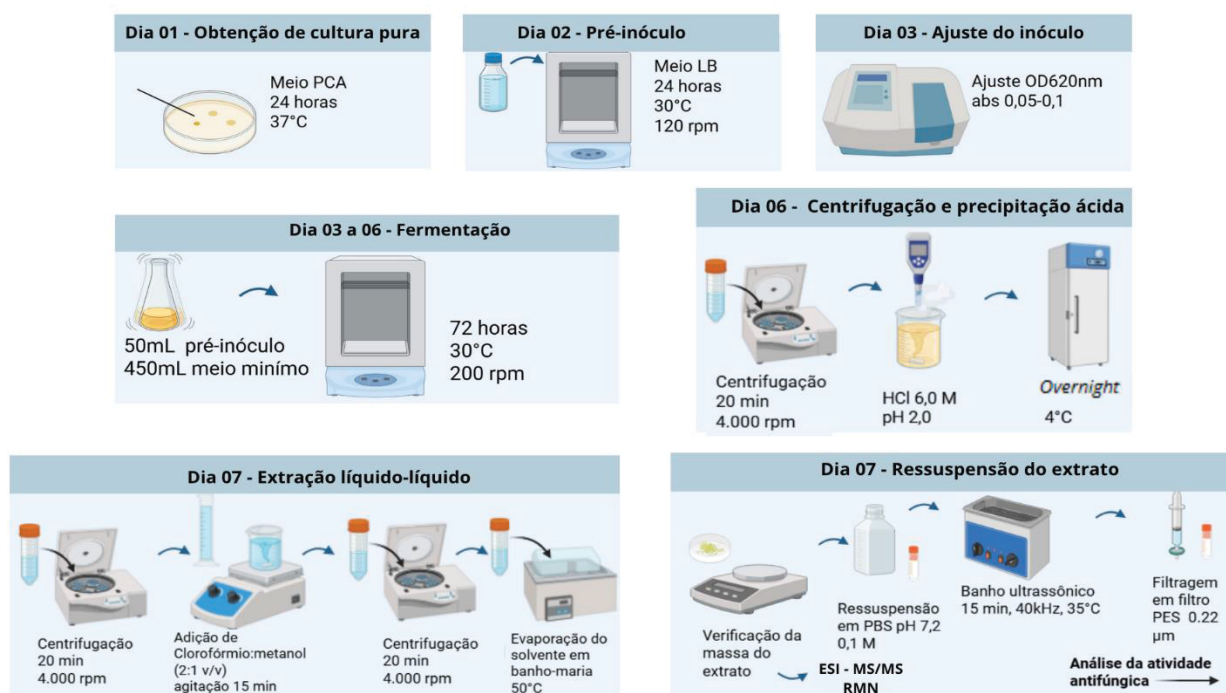
No dia seguinte, os tubos cônicos de 50 mL foram novamente centrifugados a 4.000 rpm por 20 minutos, sendo o precipitado formado coletado. Esse material foi submetido à extração líquido-líquido, utilizando uma solução de clorofórmio:metanol (2:1, v/v), em volume proporcional ao obtido na etapa de precipitação ácida. A mistura foi submetida à agitação magnética durante 15 minutos e, em seguida, centrifugada

novamente a 4.000 rpm por 20 minutos. Após a centrifugação, a fase inferior (clorofórmica) foi coletada, enquanto a fase superior foi descartada.

A fração clorofórmica foi submetida à evaporação em banho-maria a 50 °C. O material obtido foi raspado e pesado para determinação da concentração, sendo posteriormente ressuspensionado em 10 mL de solução salina tamponada com fosfato pH 7,2 0,1M (Phosphate-buffered saline, PBS). Em seguida, as amostras foram submetidas a banho ultrassônico (Sonic Clean 15 – Sanders), a 40 kHz e 35 °C, por 15 minutos. Por fim, o material foi filtrado em filtro de seringa com membrana de polietersulfona (PES) e poro de 0,22 µm, e armazenado em freezer para usos posteriores.

A FIGURA 1 ilustra, de maneira simplificada, o fluxo experimental adotado para a extração de LPs.

FIGURA 1 - ESQUEMA DE OBTENÇÃO DE LIPOPEPTÍDEOS



Fonte: A autora (2025).

3.6 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO

3.6.1 Espectrometria de massas de alta resolução – ionização por eletrospray (ESI-HRMS/MS)

Para realizar o ensaio de espectrometria de massas de alta resolução (*high-resolution tandem mass spectrometry*, HRMS/MS) os extratos foram dissolvidos em solução contendo acetonitrila grau cromatográfico e água deionizada (50:50, v/v), suplementada com 0,1% de ácido fórmico para análises em modo positivo (+). As soluções foram infundidas diretamente na fonte de ionização por eletrospray (*Electrospray Ionization*, ESI) utilizando bomba de seringa (*Harvard Apparatus*) a um fluxo de 150 $\mu\text{L min}^{-1}$.

As análises de ESI (+)-HRMS/MS foram realizadas em espectrômetro de massas híbrido de alta resolução e alta precisão (5 $\mu\text{l/L}$) microTOF-Q (Q-TOF, *Bruker® Scientific*). Os parâmetros de aquisição foram: tensão do capilar de +3500 V, cone de +40 V e temperatura de dessolvatação de 100 °C. Para ESI(+)-HRMS/MS, a energia de colisão para dissociação induzida por colisão (*Collision-Induced Dissociation*, CID) foi otimizada para cada componente.

A aquisição e o processamento dos dados foram realizados utilizando o software *Data Analysis* QTOF-control (*Bruker® Scientific*). Os espectros foram adquiridos na faixa de m/z 50–2000, a uma taxa de duas varreduras por segundo, com resolução de 50.000 largura total na metade do máximo (*Full Width at Half Maximum*, FWHM) em m/z 200.

3.6.2 Ressonância magnética nuclear ^1H

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) ^1H foram realizadas em espectrômetro *Bruker® Fourier* 300 (9,4 Tesla, 300,13 MHz para frequência de hidrogênio), equipado com sonda BBI de 5 mm de diâmetro interno, com detecção reversa e bobinas de gradiente de campo na coordenada.

O preparo das amostras foi realizado em solução de clorofórmio deuterado (CDCl_3 , 500 μL), acondicionadas em tubos de quartzo de 5 mm. Os espectros foram adquiridos a 303 K, com deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm, referenciados ao sinal residual de clorofórmio (CHCl_3 , δ 7,26 ppm). Para este

processo, foram empregados os seguintes parâmetros: tempo de espera entre aquisições (d1) de 1 s, tempo de aquisição (aq) de 5,37 s, 65k pontos (td) e sequência de pulsos zg30 (90°) com duração de 15 µs (p1).

O processamento foi realizado com 65k pontos (si), utilizando multiplicação exponencial (lb = 0,3 Hz) e correção manual de fase e linha de base. O software *TopSpin (Bruker Biospin®)* foi empregado para aquisição e análise dos dados.

3.7 VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada em meio de cultura BDA. Para isso, 200 µL do extrato foram distribuídos sobre a superfície do meio com auxílio de uma alça de Drigalski. Em seguida, um *plug* de micélio fúngico (9 mm de diâmetro) foi posicionado no centro da placa. As culturas foram incubadas a 28 °C, por 4 dias. O ensaio foi conduzido em duplicata.

3.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para verificar as alterações morfológicas dos fungos em contato direto com os LPs, a partir dos resultados obtidos no item 3.7.

Uma pequena porção de micélio fúngico foi coletada com auxílio de uma alça de platina e transferida para microtubo estéril de 1,5 mL contendo 100 µL de solução salina estéril a 0,85%. As amostras foram centrifugadas a 8.000 rpm por 2 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 1 mL de glutaraldeído 2,5% para fixação, permanecendo em repouso *overnight*. No dia seguinte, procedeu-se a nova centrifugação (8.000 rpm, 2 minutos), seguida do descarte do fixador. Em seguida, adicionou-se 1 mL de PBS 0,1 M (pH 7,2), com leve homogeneização manual. Após nova centrifugação (8.000 rpm, 2 minutos), o sobrenadante foi descartado e as amostras ressuspendidas em 100 µL de PBS.

Para a preparação das amostras, lamínulas de vidro de 13 mm foram previamente tratadas com 50 µL de poli-L-lisina a 0,1% por 10 minutos. Após a lavagem cuidadosa com água destilada, foram secas em estufa a 50 °C por 1 hora. Em seguida, 50 µL da suspensão contendo micélio fúngico em PBS foram depositados sobre cada lamínula, que foi novamente seca em estufa a 50 °C por 1 hora.

Após a secagem, as amostras foram submetidas à desidratação gradual em série crescente de etanol (50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100%), permanecendo 10 minutos em cada concentração. O etanol foi removido por sucção após cada etapa, exceto na última (100%), que foi mantida até a etapa seguinte.

A desidratação final foi realizada por ponto crítico (Leica EM CPD300 *Critical Point Dryer*), substituindo o etanol por CO₂ líquido, que foi levado ao ponto crítico e convertido em fase gasosa, mantendo a temperatura constante e reduzindo a pressão. Posteriormente, as amostras foram metalizadas com uma fina camada de ouro, por evaporação a vácuo, com o objetivo de conferir condutividade elétrica e térmica à superfície.

As análises foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura (Tescan Vega3 SEM), com ampliações de 5.000× e 1.000×.

4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MICRORGANISMOS

4.1.1 Isolamento dos fitopatógenos

A obtenção dos microrganismos foi realizada inicialmente por meio do *Blotter Test*, utilizando-se sementes cedidas por um laboratório de sementes, com o objetivo de isolar fungos fitopatogênicos. Após o período de incubação de 7 dias, a seleção foi baseada na presença evidente e recorrente de micélio fúngico. Deram-se preferência às sementes que apresentavam sinais visíveis de deterioração e perda de viabilidade, indicando possível ação patogênica do fungo.

As sementes selecionadas foram submetidas à desinfecção superficial, com o intuito de eliminar microrganismos contaminantes presentes. Posteriormente, foram individualmente transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura SDA, suplementado com cloranfenicol, um antibiótico utilizado para inibir o crescimento bacteriano e favorecer o isolamento dos fungos.

Após o crescimento em SDA, *plugs* de 9 mm das colônias fúngicas foram transferidos para placas contendo BDA.

A etapa de isolamento a partir do *Blotter Test* apresentou alguns desafios, como o crescimento de bactérias, mesmo na presença do antibiótico. As bactérias foram posteriormente sequenciadas e identificadas como pertencentes ao gênero *Pseudomonas* spp.

A FIGURA 2 apresenta um esquema ilustrativo da sequência adotada para o isolamento dos fungos, tendo como exemplo o isolamento de *D. ueckeri*. O mesmo procedimento foi aplicado a todos os isolados utilizados neste estudo. Em alguns casos, foram necessários vários repiques sucessivos em meio BDA para a obtenção de culturas puras, livres de contaminantes, sejam eles bacterianos ou fúngicos não pertencentes ao interesse da pesquisa.

FIGURA 2 - ESQUEMA DE ISOLAMENTO FÚNGICO EM SEMENTES DE SOJA



FONTE: A autora (2025).

LEGENDA: Esquema ilustrativo da metodologia utilizada para o isolamento de fungos fitopatogênicos a partir de sementes de soja. Inicialmente, foi realizado o teste de papel de filtro (*Blotter Test*). As sementes que apresentaram crescimento de micélio fúngico foram transferidas para meio SDA suplementado com cloranfenicol e incubadas por 5 dias à 28°C. Em seguida, os isolados foram repicados para o meio BDA até a obtenção de culturas puras. Fungo representado na imagem: *D. ueckeri*.

4.2 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

4.2.1 Identificação macroscópica e microscópica

A TABELA 1 apresenta alguns resultados previamente descritos na literatura para cada fungo analisado neste trabalho, incluindo a coloração do anverso e do reverso das colônias, as características do micélio e as estruturas observáveis em análise microscópica óptica.

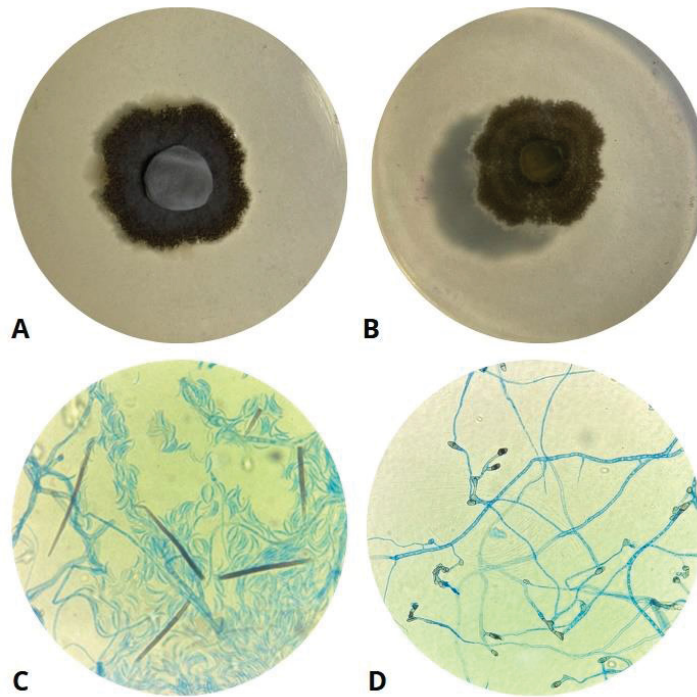
TABELA 1 - REVISÃO DE CARACTERÍSTICAS DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Fungos	Cor anverso	Cor reverso	Micélio aéreo	Conídios/ estruturas microscópicas	Referência
<i>C. truncatum</i>	Verde-oliva, cinza e castanho.	Escuro.	Aveludado, granuloso e algodão.	Cerdas marrons, conidióforos e conídios falciformes.	(Poti <i>et al.</i> , 2020; Bhatt <i>et al.</i> , 2024).
<i>C. cassicola</i>	Branco, cinza e verde.	Marrom e preto.	Circular, anel concêntrico e aéreo.	Formato oval, obclavado, cilíndrico, reto e curvado.	(Qi <i>et al.</i> , 2011).
<i>D. longicolla</i>	Branco e regiões amarelo-esverdeadas.	Branco, verde escuro ao longo do tempo.	Aéreo, formação de picnídeos.	Alfa-conídios bigutulados e ovais.	(Hosseini, 2023).
<i>D. ueckeri</i>	Amarelo e marrom.	Amarelo e marrom.	Radial e estromas pretos.	Conídios alfa, peritécios e ascósporos bicelulares.	(Mena <i>et al.</i> , 2024).
<i>Fusarium sp.</i>	Mel, branco-rosado, amarelo, rosa, roxo, cinza e salmão.	Âmbar, canela, salmão, siena, vermelho e azul.	Aéreo abundante, denso, flocoso, pulverulento, radial e margens inteiras ou onduladas.	Macroconídios fusiformes e curvados, microconídios, mesoconídios, clamidósporos, peritécios, esporodóquios e conidióforos.	(Santos <i>et al.</i> , 2019; Tupaki-Sreepurna & Kindo, 2018; Matic <i>et al.</i> , 2020; Jacobs <i>et al.</i> , 2018)
<i>M. phaseolina</i>	Preto.	Preto.	Aéreo, superficial ou imerso.	Escleródios marrons a preto, formato e tamanho irregulares, esféricos ou oblongos.	(Thakur <i>et al.</i> , 2007; Lakhran <i>et al.</i> , 2018)

FONTE: A autora (2025)

Para *C. truncatum*, observou-se a formação de colônia densa com centro acinzentado-escuro e bordas com aspecto granular (FIGURA 3A). O reverso apresentou coloração acastanhada (FIGURA 3B), enquanto a micrografia evidenciou conídios falcados, acérvulos e cerdas marrons (FIGURA 3C). Também foi observado a presença de apressórios (FIGURA 3D), Bhadauria *et al.* (2013) descrevem esses apressórios, por meio de pinos de penetração, se desenvolvem em vesículas de infecção. Essas vesículas crescem entre a parede celular e a membrana plasmática da planta hospedeira, onde ocorre o início da formação das hifas primárias.

FIGURA 3 - *Colletotrichum truncatum*

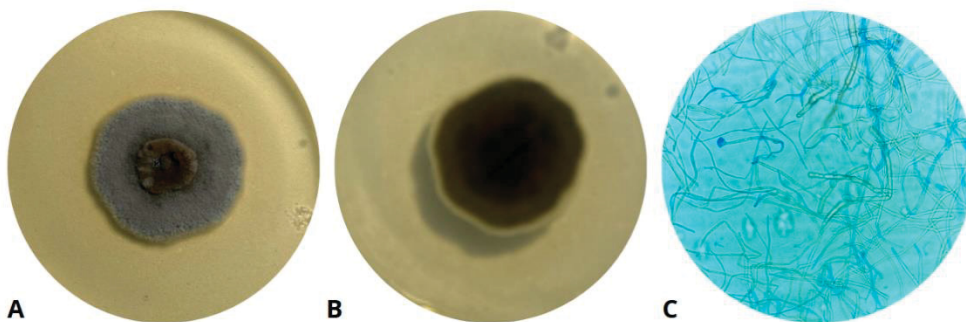


FONTE: A autora (2025)

LEGENDA: *Colletotrichum truncatum* cultivado em meio de cultura BDA e incubado a 28 °C por 5 dias: (A) aspecto do micélio no anverso da placa; (B) reverso da colônia; (C-D) micrografia óptica a 400×, corada com azul de lactofenol.

C. cassicola desenvolveu colônias com anel central acinzentado-escuro (FIGURA 4A), reverso escuro (FIGURA 4B) e esporos alongados característicos (FIGURA 4C).

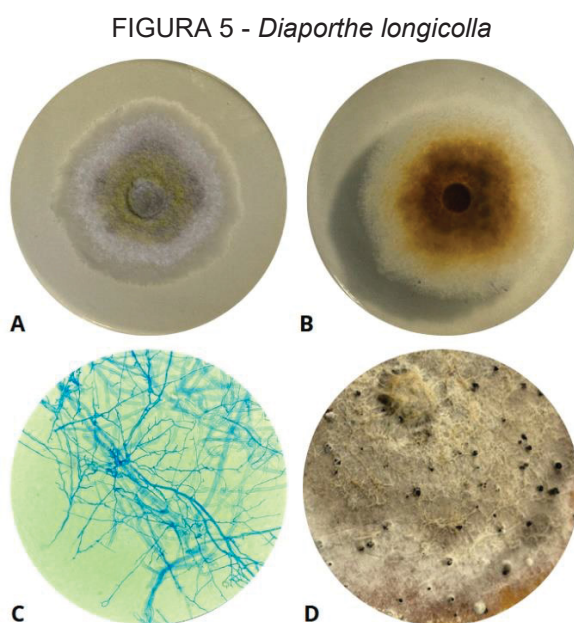
FIGURA 4 - *Corynespora cassicola*



FONTE: A autora (2025)

LEGENDA: *Corynespora cassicola* cultivado em meio de cultura BDA e incubado a 28 °C por 5 dias: (A) aspecto do micélio no anverso da placa; (B) reverso da colônia; (C) micrografia óptica a 400×, corada com azul de lactofenol.

D. longicolla exibiu colônias com bordas brancas e centro verde-claro, além de micélio aéreo (FIGURA 5A). O reverso apresentou coloração marrom, mais intensa no centro, com pontos escuros próximos à região central (FIGURA 5B). Na micrografia, verificaram-se apenas hifas ramificadas, sem esporos visíveis (FIGURA 5C). Após 45 dias de cultivo, observou-se a formação de picnídios dispersos na superfície da colônia, mas sem a formação de conídios (FIGURA 5D).

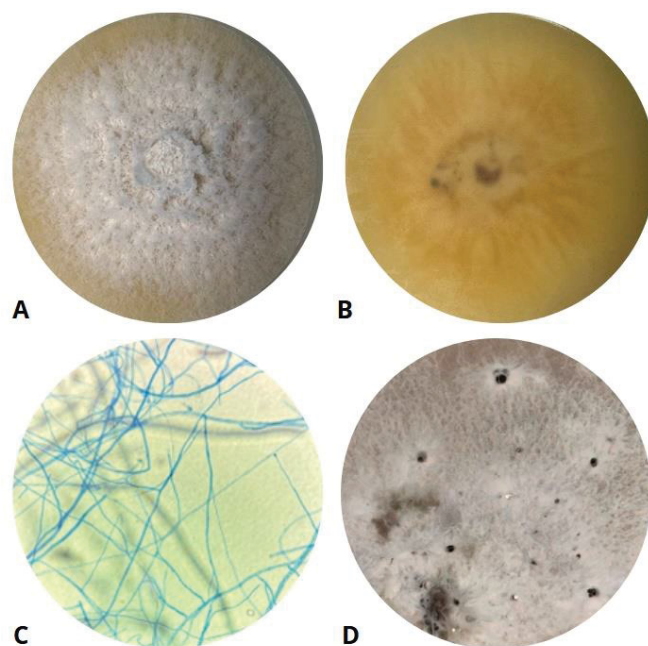


FONTE: A autora (2025)

LEGENDA: *Diaporthe longicolla* cultivado em meio de cultura BDA e incubado a 28 °C por 5 dias: (A) aspecto do micélio no anverso da placa; (B) reverso da colônia; (C) micrografia óptica a 400×, corada com azul de lactofenol; (D) cultura incubada a 28°C durante 45 dias.

D. ueckeri produziu colônia branca e lanosa, com micélio aéreo abundante (FIGURA 6A), reverso marrom-claro (FIGURA 6B) e na microscopia apresentou apenas hifas ramificadas com ausência de esporos visíveis (FIGURA 6C). Mesmo após 45 dias de incubação, não foram observados esporos. No entanto, a presença de picnídeos marrons distribuídos pela superfície da colônia foi registrada (FIGURA 6D).

FIGURA 6 - *Diaporthe ueckeri*

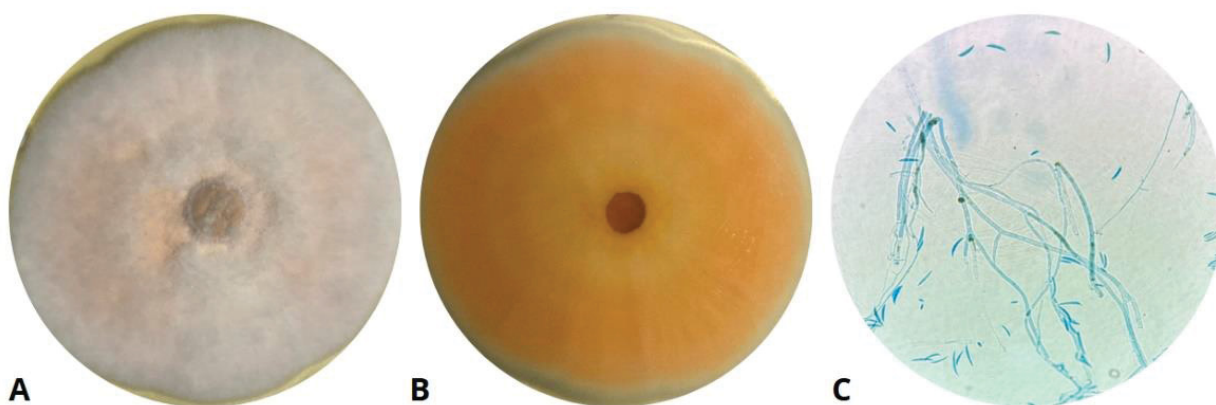


FONTE: A autora (2025)

LEGENDA: *Diaporthe ueckeri* cultivado em meio de cultura BDA e incubado a 28 °C por 5 dias: (A) aspecto do micélio no anverso da placa; (B) reverso da colônia; (C) micrografia óptica a 400×, corada com azul de lactofenol; (D) cultura incubada a 28°C durante 45 dias.

O isolado do complexo *F. incarnatum-equiseti* apresentou colônia rosada, com micélio aéreo de aspecto algodoadoso (FIGURA 7A), reverso salmão (FIGURA 7B) e micrografia contendo macroconídios falcados (FIGURA 7C).

FIGURA 7 - *Fusarium incarnatum-equiseti*

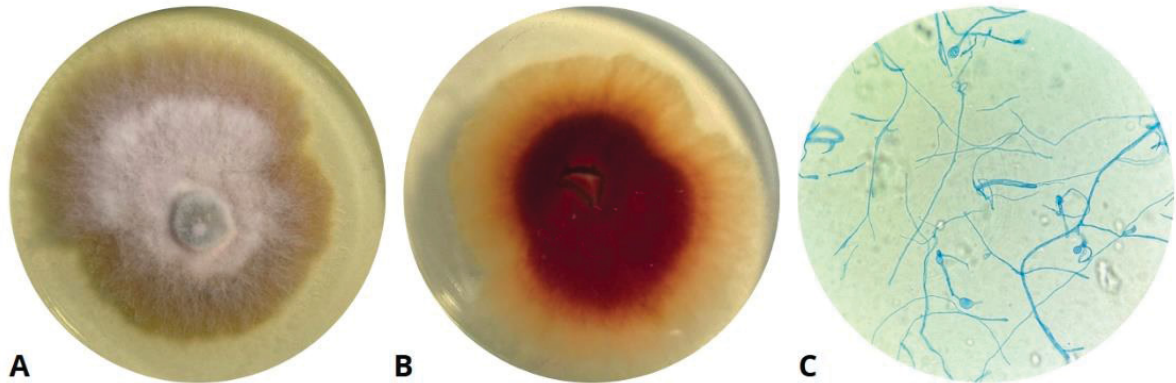


FONTE: A autora (2025)

LEGENDA: *Fusarium incarnatum-equiseti* cultivado em meio de cultura BDA e incubado a 28 °C por 5 dias: (A) aspecto do micélio no anverso da placa; (B) reverso da colônia; (C) micrografia óptica a 400×, corada com azul de lactofenol

F. graminearum exibiu colônias com bordas brancas e centro amarelado, micélio aéreo algodinoso (FIGURA 8A), reverso vermelho-intenso (FIGURA 8B) e, na micrografia, hifas e clamidósporos esparsos (FIGURA 8C).

FIGURA 8 - *Fusarium graminearum*

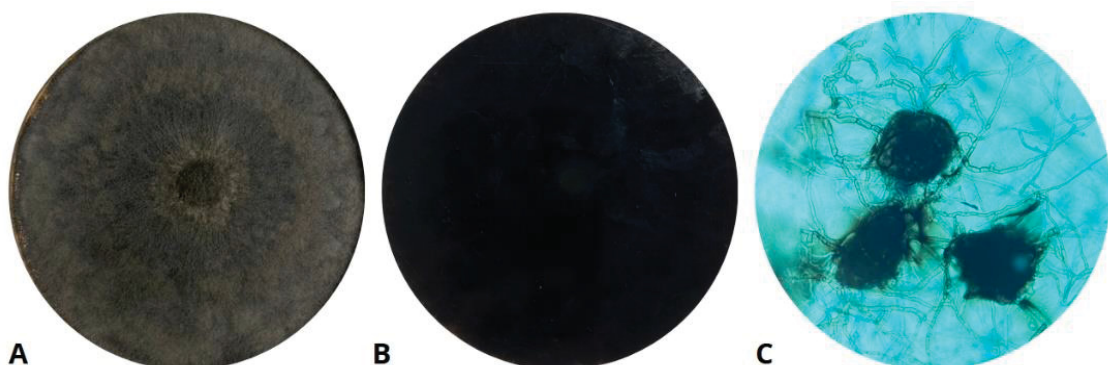


FONTE: A autora (2025)

LEGENDA: *Fusarium graminearum* cultivado em meio de cultura BDA e incubado a 28 °C por 5 dias: (A) aspecto do micélio no anverso da placa; (B) reverso da colônia; (C) micrografia óptica a 400×, corada com azul de lactofenol

Por fim, *M. phaseolina* formou colônias escuras e compactas, com micélio aéreo reduzido nas extremidades (FIGURA 9A), reverso totalmente negro (FIGURA 9B) e micrografia revelando hifas septadas e microescleródios (FIGURA 9C).

FIGURA 9 - *Macrophomina phaseolina*



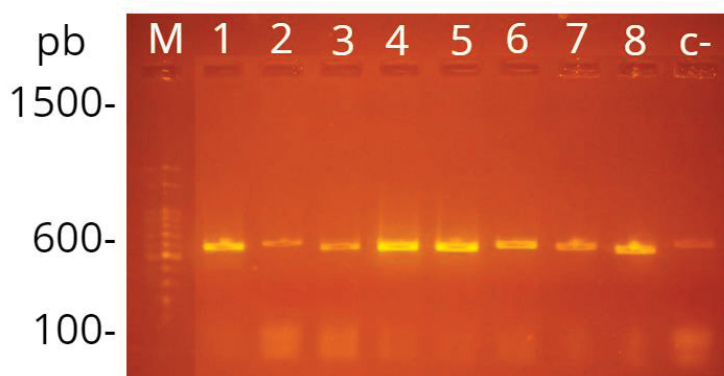
FONTE: A autora (2025)

LEGENDA: *Macrophomina phaseolina* cultivado em meio de cultura BDA e incubado a 28 °C por 5 dias: (A) aspecto do micélio no anverso da placa; (B) reverso da colônia; (C) micrografia óptica a 400×, corada com azul de lactofenol

4.2.2 Identificação molecular dos fitopatógenos

Após a extração do DNA genômico dos isolados fúngicos, realizou-se a amplificação por PCR. Os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v), corado com SYBR® Safe (Invitrogen), para verificação da amplificação específica e qualidade do DNA. Os resultados do padrão de migração, no gel de agarose, estão apresentados na FIGURA 10, onde se observam bandas de amplificação próximas ao tamanho esperado de 600 pb. A presença de bandas únicas e bem definidas indica amplificação eficiente do DNA alvo, sem formação de dímeros de *primer* ou produtos inespecíficos.

FIGURA 10 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A PARTIR DE PRODUTO DE PCR DOS FUNGOS ISOLADOS



FONTE: A autora (2025).

LEGENDA: Eletroforese em gel de agarose 1,5%. TAE 1X. M: Padrão de tamanho molecular de 100 pb. (1) *M. phaseolina*; (2) *D. longicolla*; (3) *F. incarnatum-equiseti*; (4) *C. cassiicola*; (5) *A. alternata*; (6) *C. truncatum*; (7) *D. ueckeri*; (8) *F. graminearum*; (c-) controle negativo.

O produto da reação de PCR foi preparado e enviado para sequenciamento. As seqüências obtidas foram editadas e montadas utilizando o software BioEdit, sendo corrigidas regiões com baixa qualidade de leitura. As seqüências finais foram então submetidas à ferramenta BLASTn, disponível na plataforma do NCBI, com o objetivo de identificar os organismos mais semelhantes com base na comparação com seqüências previamente depositadas em banco de dados. Os resultados obtidos estão apresentados na TABELA 2, contendo o tamanho de pares de bases (pb), os parâmetros como cobertura da consulta (*Query Cover*) e percentual de identidade (*Per. Ident*), os quais permitiram confirmar a identidade molecular dos isolados analisados.

TABELA 2 - IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

Fitopatógeno	Tamanho (pb)	Query Cover	Per. Ident	Nº de Acesso*
<i>Colletotrichum truncatum</i>	532	100%	99,63%	MN871600.1
<i>Corynespora cassiicola</i>	535	98%	100%	MT228954.1
<i>Diaporthe longicolla</i>	555	98%	99,63%	AY841801.1
<i>Diaporthe ueckeri</i>	548	98%	100%	PQ331841.1
<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>	498	100%	100%	OP315276.1
<i>Fusarium graminearum</i>	485	100%	100%	PQ097589.1
<i>Macrophomina phaseolina</i>	554	99%	99,82%	OQ318445.1

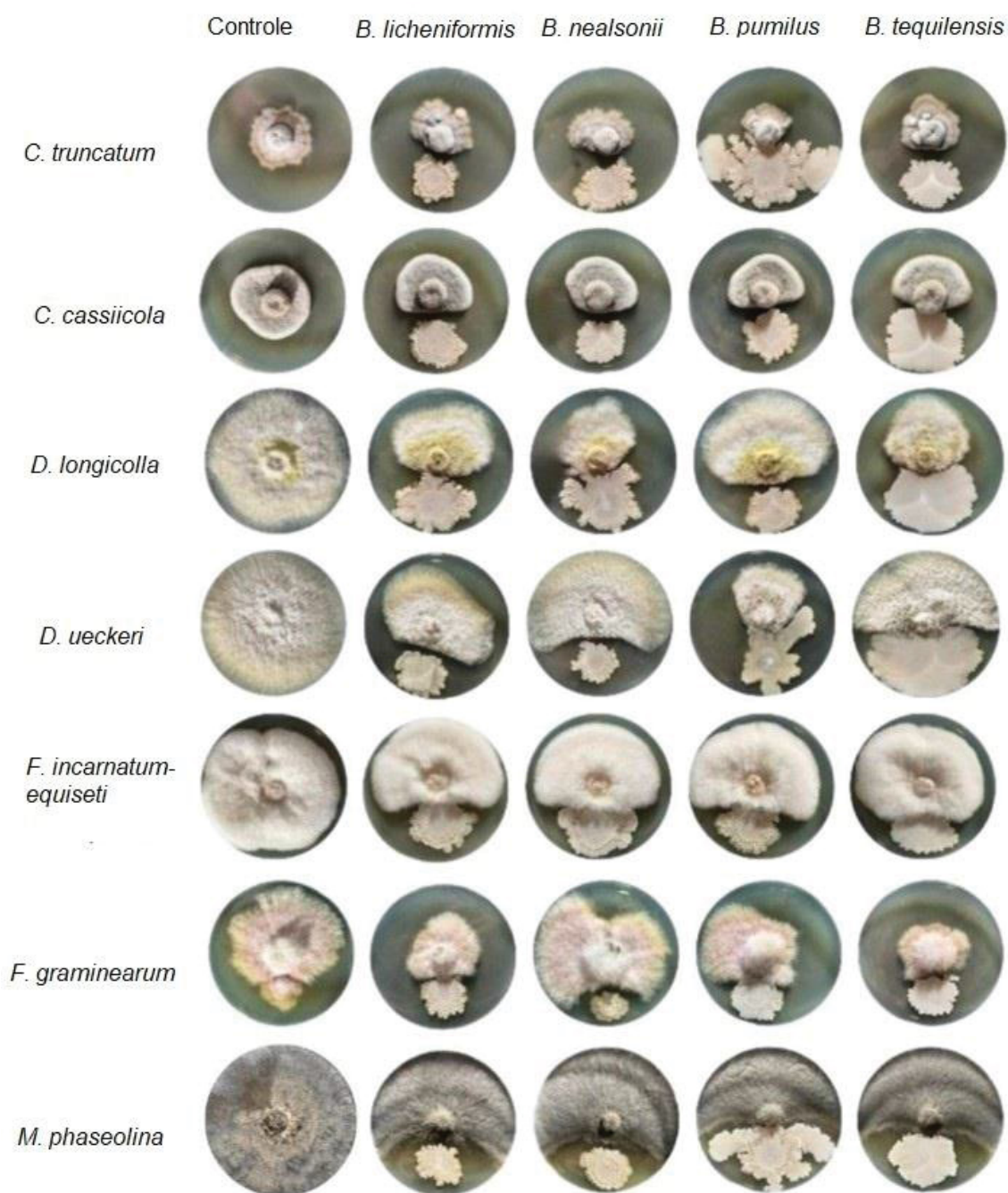
*Número de acesso no GenBank utilizado para confirmar a identidade da sequência obtida.

FONTE: A autora (2025).

4.3 ANTAGONISMO

As imagens do ensaio (FIGURA 11) revelam padrões distintos de inibição entre fungos e bactérias testadas. Na primeira coluna (controle), observa-se crescimento livre do fungo, enquanto nas colunas subsequentes, a presença de bactérias testadas.

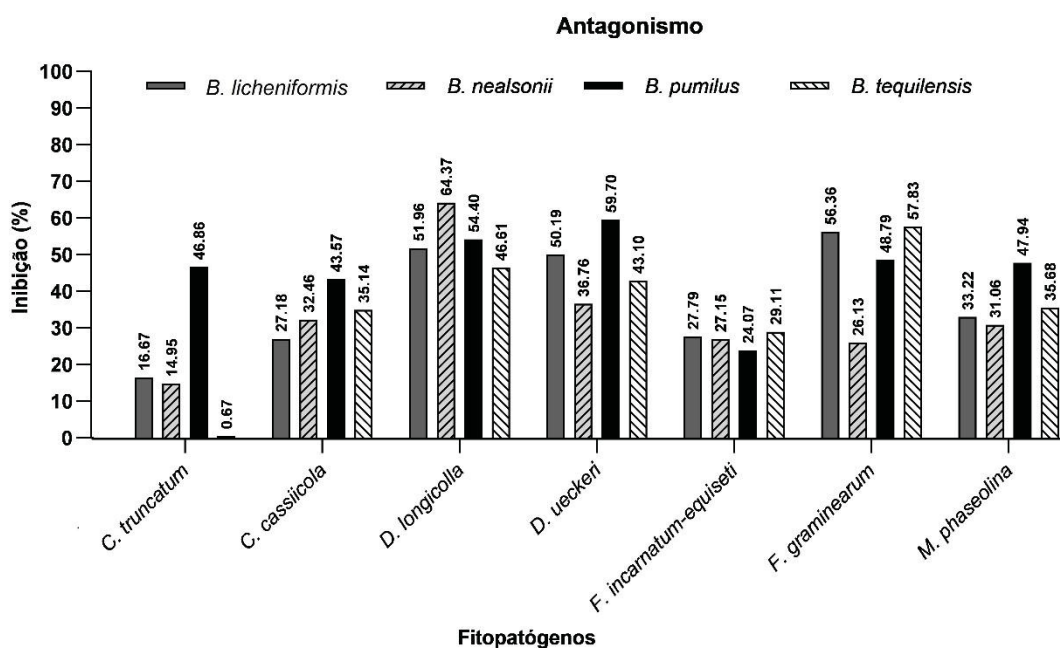
FIGURA 11 – ENSAIO DE ANTAGONISMO ENTRE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS FRENTE A DIFERENTES ESPÉCIES DE *Bacillus* SPP.



FONTE: A autora (2025).

A partir da área de crescimento de cada fungo, foi feita então a medição da área de crescimento através do software *ImageJ*, os valores obtidos foram aplicados na Equação 1, e os valores foram expressos em porcentagem (GRÁFICO 1).

GRÁFICO 1 - PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS EM ENSAIO DE ANTAGONISMO FRENTE A DIFERENTES ESPÉCIES DE *Bacillus* spp.



FONTE: A autora (2025).

Dentre as bactérias avaliadas, *B. pumilus* apresentou os maiores percentuais de inibição contra *C. truncatum*, *C. cassiicola*, *D. ueckeri* e *M. phaseolina*. Entretanto, em relação ao complexo *F. incarnatum-equiseti*, esta espécie exibiu o menor percentual de inibição. Resultados semelhantes já foram reportados por outros autores, que destacaram o potencial de *B. pumilus* no controle de fitopatógenos, como *F. graminearum* (Shali *et al.*, 2010) e *F. equiseti* (Swarnakar; Chakraborty, 2025). O mecanismo de ação atribuído a essa espécie de bactéria envolve, principalmente, a produção de LPs, enzimas hidrolíticas (como quitinases e celulasas) e compostos orgânicos voláteis (Dobrzynski *et al.*, 2023). Em um estudo conduzido por Agarwal *et al.* (2017), foram analisadas alterações morfológicas em diferentes fungos por meio de MEV, após o contato direto com uma cepa de *B. pumilus* em ensaio de cultura pareada. Os autores observaram inibição da germinação de esporos, perfurações no micélio e bifurcações anormais nas hifas. Além disso, verificaram modificações na parede celular, que resultaram em extravasamento do conteúdo citoplasmático e consequente morte das hifas.

Por sua vez, *B. tequilensis* destacou-se pela elevada inibição de *F. incarnatum-equiseti* e *F. graminearum*, embora tenha apresentado os menores índices

frente a *C. truncatum* e *D. longicolla*. Dinango *et al.* (2025) indicam que *B. tequilensis* é um forte candidato a agente de biocontrole, especialmente contra espécies de *Fusarium*. De forma consistente, Baard *et al.* (2023) também relataram eficácia dessa bactéria contra diferentes espécies do gênero. A atividade antifúngica tem sido associada principalmente à produção de LPs, mas também pode estar relacionada à síntese de sideróforos, proteases, catalase, quitinase e β -1,3-glucanase (Baard *et al.*, 2023).

No caso de *B. nealsonii*, o maior percentual de inibição foi observado contra *D. longicolla*, enquanto os menores valores foram registrados frente a *D. ueckeri* e *F. graminearum*. Até o momento, não há estudos que investiguem especificamente sua atividade antifúngica. Contudo, há evidências de que esta espécie possui capacidade de produzir biossurfactantes (Phulpoto *et al.*, 2020), os quais são reconhecidos por exercer atividade antifúngica em diferentes contextos.

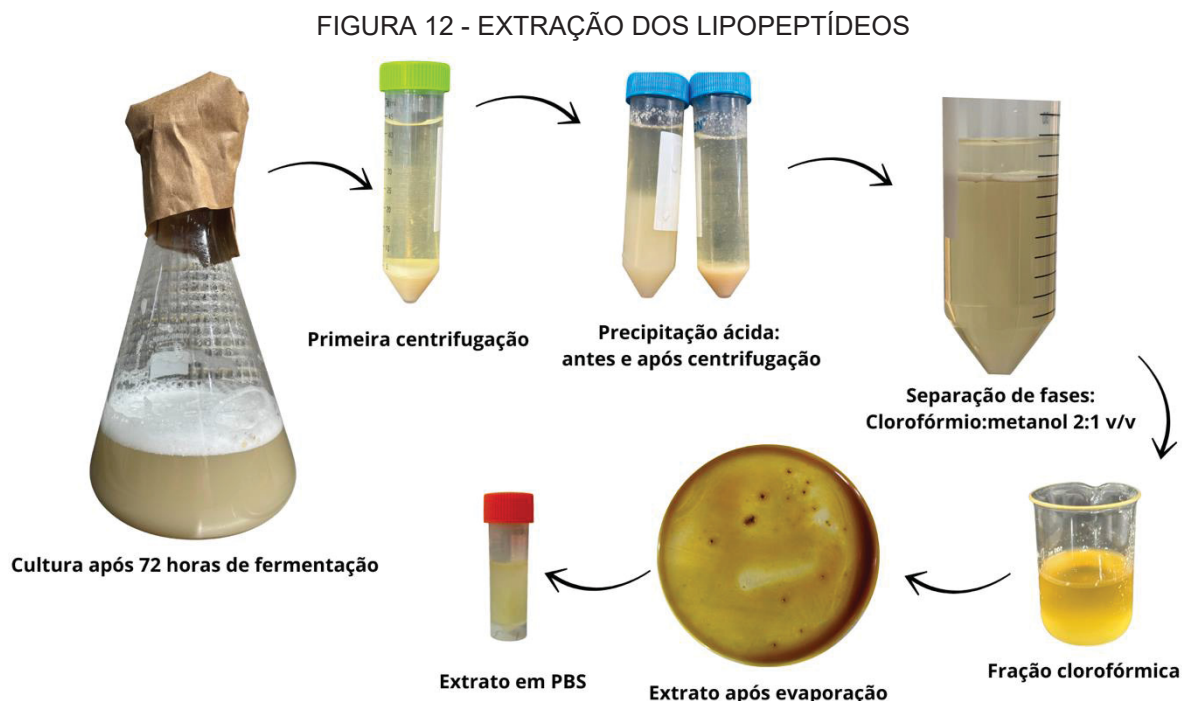
Já *B. licheniformis* não se destacou entre as bactérias com maior efeito inibitório. Apesar disso, sua eficácia como agente de biocontrole é amplamente reportada na literatura. Por exemplo, Tariq *et al.* (2025) demonstraram sua capacidade de suprimir fitopatógenos em culturas de arroz, enquanto Moon *et al.* (2025) atribuíram a ação antifúngica dessa espécie à produção de enzimas degradadoras da parede celular, como quitinases, β -1,3-glucanases e proteases.

De modo geral, diversos autores destacam que bactérias do gênero *Bacillus* apresentam expressivo potencial antimicrobiano, podendo ser aplicadas em diferentes áreas de interesse, que vai desde a medicina a agricultura. No contexto agrícola, estas bactérias representam alternativas promissoras para o controle de fungos fitopatogênicos, atuando por diferentes mecanismos, que incluem desde a produção de enzimas hidrolíticas capazes de degradar a parede celular dos fungos, até a síntese de LPs, compostos amplamente reconhecidos pelo seu papel no biocontrole.

4.4 EXTRAÇÃO DE LIPOPEPTÍDEOS

Com base nos resultados obtidos no item 4.3 (antagonismo), a bactéria *B. pumilus* apresentou o melhor desempenho, motivo pelo qual foi selecionada para a extração de LPs, conforme a metodologia descrita no item 3.5.

A representação esquemática das principais etapas do processo de extração está apresentada na FIGURA 12.



Fonte: A autora (2025).

Durante a fermentação, observou-se a formação de espuma já no primeiro dia, característica que sugere a produção de biossurfactantes. Após a fermentação, foi realizada a centrifugação para a separação do sobrenadante e da biomassa celular, a qual sedimentou no fundo do tubo. O sobrenadante livre de células, após a etapa de precipitação ácida, apresentou a formação de um precipitado esbranquiçado que, após nova centrifugação, sedimentou-se no fundo do tubo.

Durante a extração líquido-líquido, observou-se a formação de três fases, sendo a fração de interesse a inferior, contendo os lipopeptídeos dissolvidos em clorofórmio (Nelson; Cox, 2014, p. 378). A etapa de evaporação do solvente durou aproximadamente 10 horas. O material resultante foi raspado com espátula, transferido para tubos criogênicos previamente tarados e pesado, obtendo-se 50 mg de produto. Este foi ressuspendido em 10 mL de PBS, resultando em uma concentração final de 5 mg/mL.

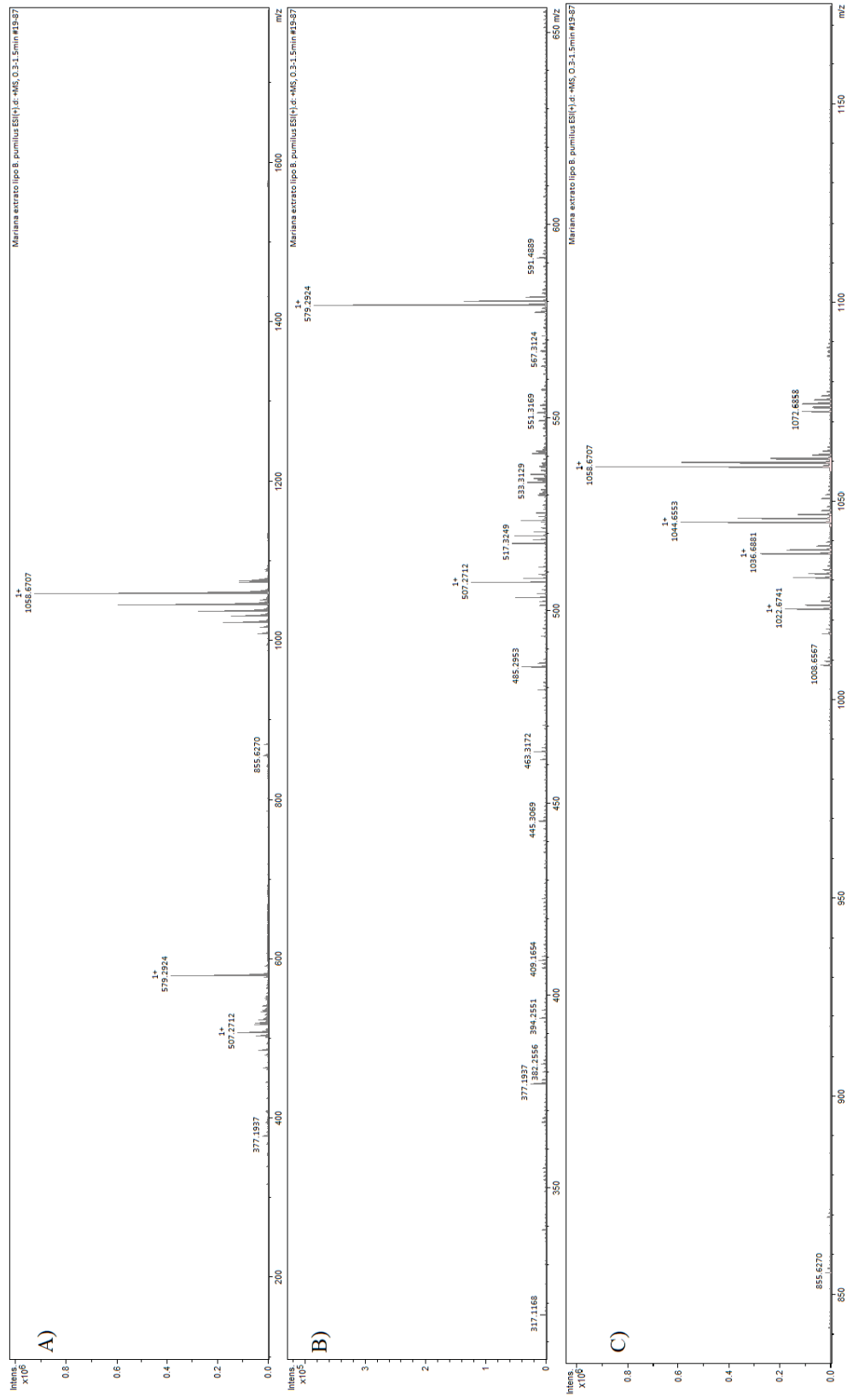
4.5 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO

A determinação da composição química é essencial para compreensão da atividade de um extrato. Enquanto isso, é necessária a utilização de ferramentas analíticas sensíveis e seletivas o suficiente, com variação de peso molecular, capazes de analisar um extrato, o qual é uma mistura complexa. Desta forma, os produzidos a partir de *B. pumilus*, onde se espera composição majoritariamente de LPs, foram avaliados a partir de ESI(+)-HRMS/MS e RMN ¹H. Estes compostos são anfifílicos constituídos por uma cauda hidrofóbica (geralmente um ácido graxo), ligada a uma cabeça hidrofílica peptídica, que pode ser linear ou conter um anel lactona formado por 4 a 12 aminoácidos (Biniarz; Lukaszewicz; Janek, 2017).

Assim, em uma primeira etapa, utilizamos o emprego de ESI(+)-HRMS/MS. A FIGURA 13 apresenta o espectro geral (FIGURA 13A), obtido para o extrato de *B. pumilus*, com uma varredura de 50 a 1400 *m/z*, e expandidos nas FIGURAS 13B e 13C, para que sejam detalhadas algumas *m/z* importantes.

Na FIGURA 13C observamos algumas *m/z* exatas 1008.6570, 1022.6741 e 1036.6881 que correspondem às surfactinas C13, C14 e C15 respectivamente, conforme reportado previamente por Peypoux *et al.* (1991) e Toral *et al.* (2018), (TABELA 3). Estes são confirmados pelo encaixe da razão isotópica e pelo perfil de fragmentação (Wolfender, 2019) conforme exemplo indicado para a surfactina C14, FIGURA 14.

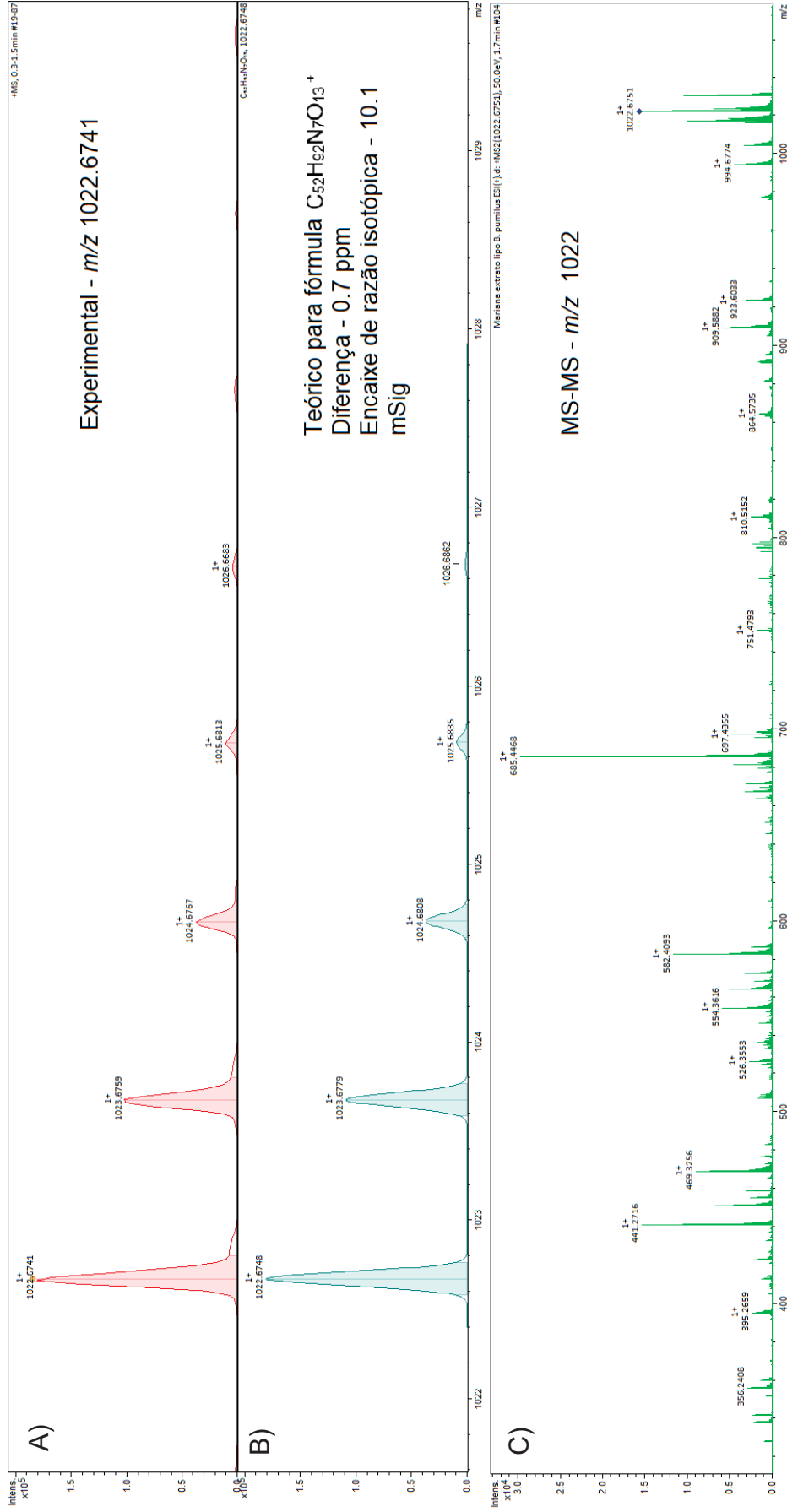
FIGURA 13 - ESPECTRO DE MASSAS OBTIDO POR ES(+)-HRMS/IMS COMPLETO DO EXTRATO DE *B. pumilus*



FONTE: A autora (2025)

LEGENDA: A) expansão entre 300 e 1600 u.m.a; B) expansão entre 300 e 650 u.m.a e C) expansão entre 850 e 1200 u.m.a.

FIGURA 14 - ESPECTRO DE MASSAS OBTIDO POR ES(+)-HRMS/MS PARA O PICO m/z 1022.6741 DO EXTRATO DE *B. pumilus*



FONTE: A autora (2025)

LEGENDA: A) expansão entre 1022 e 1028 u.m.a; B) comparação com a teórica para o m/z 1022.6741; C) uma análise no modo HRMS-MS para o m/z 1022.

A composição química, determinada por análise de ESI(+)-HRMS/MS no modo positivo ($[M+H]^+$), está apresentada na TABELA 3.

TABELA 3 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA OBTIDA A PARTIR DE ESI-MS/MS DO EXTRATO DE *B. pumilus*

Surfactina	Precursor ion m/z	Fórmula	Diferença (ppm)	Encaixe Razão isotópica (mSigma)	Perfil de Fragmentação MS-MS
C13	1008.6570	$C_{51}H_{90}N_7O_{13}^+$	1.8	15.1	980.6621 $[M - CO]^+$; 895.5685 $[M - Leu]^+$; 877.5762 (-Leu- H_2O); 851.583 (Provável: -Leu-Val); 764.538 (-Leu-Leu- H_2O)
C14	1022.6741	$C_{52}H_{92}N_7O_{13}^+$	0.7	10.1	994.6774 $[M - CO]^+$; 923.6033 $[M - Val]^+$; 909.5882 $[M - Leu]^+$; 864.5735 (-fragmento misto); 810.5152 (-fragmento misto)
C15	1036.6881	$C_{53}H_{94}N_7O_{13}^+$	2.0	9.1	1031.6379 (Rearranjo); 931.5714 (-Leu+ porção graxa); 859.529 (dipeptídeo); 818.4861 (cauda graxa); 804.471 $[M - CH_2]$

FONTE: a autora (2025).

A análise por ESI(+)-HRMS/MS revelou perfis de fragmentação característicos para as três isoformas de surfactina identificadas (C13, C14 e C15), com padrões consistentes com a estrutura heptapeptídica Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu típica desses LPs (Liu *et al.*, 2007).

Destacamos o resultado obtido para a C13, onde observamos uma sequência de fragmentação envolvendo múltiplas perdas de resíduos de leucina: inicialmente a perda de CO (m/z 980) do anel lactônico, seguida pela eliminação de um resíduo de leucina (m/z 895), e subsequentemente perdas combinadas envolvendo leucina e água (m/z 877), leucina e valina (m/z 851), e dois resíduos de leucina com água (m/z 764), padrão este que reflete a abundância de leucina na estrutura molecular.

No caso da surfactina C14, o perfil de fragmentação incluiu a perda de CO, seguida pela eliminação sequencial de resíduos de valina (m/z 923) e leucina (m/z 909), e a perda de fragmentos mistos envolvendo porções lipídicas e peptídicas (m/z 864 e 810), demonstrando a complexidade da fragmentação dessa isoforma.

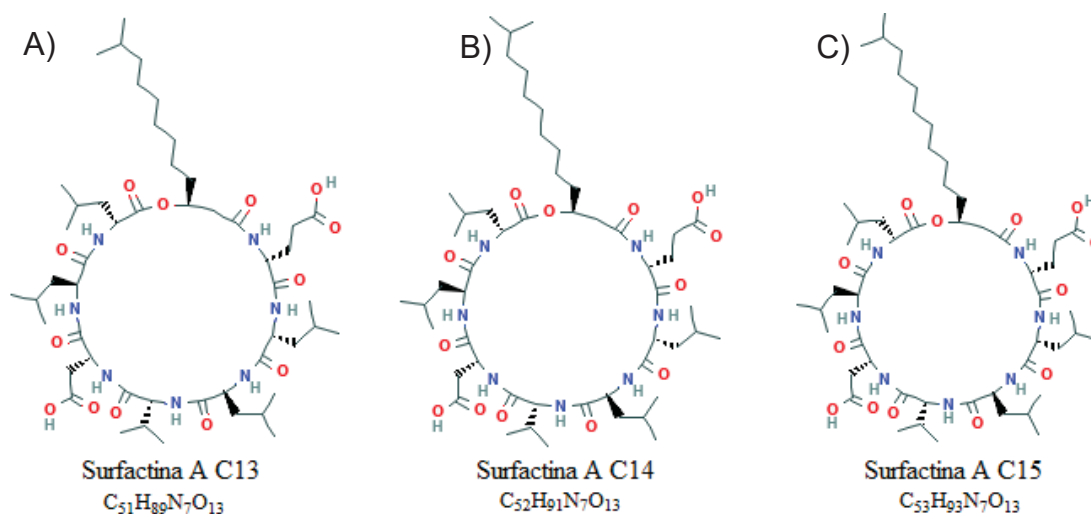
Para a surfactina C15, identificou-se uma sequência distintiva iniciando com rearranjo intramolecular (m/z 1031), seguido pela perda de um fragmento combinado contendo leucina e porção da cadeia graxa (m/z 931), um dipeptídeo (m/z 859), a

cadeia graxa completa (m/z 818), e uma perda de CH_2 (m/z 804). Este padrão evidencia de forma clara a arquitetura molecular das surfactinas, destacando a perda seletiva da porção lipídica completa na isoforma C15.

A combinação dos perfis de fragmentação característicos e das massas moleculares precisas (m/z 1008, 1022, 1036) confirma inequivocamente a presença das surfactinas C13, C14 e C15 no extrato, em concordância com relatos prévios para LPs de *Bacillus* spp. (Pecci *et al.*, 2010).

A FIGURA 15, ilustra as estruturas químicas das surfactinas neutras propostas, representando a conformação cíclica da cadeia peptídica e a variação no comprimento da cadeia lipídica. As estruturas químicas correspondentes foram consultadas na base de dados PubChem e utilizadas como referência para a proposta de identificação dos compostos.

FIGURA 15 - ESTRUTURA DAS MOLÉCULAS DE SURFACTINA C13, C14 E C15 PROPOSTA COM BASE EM DADOS DE ESI(+)-HRMS/MS E INFORMAÇÕES DISPONÍVEIS NA BASE PUBCHEM



Fonte: PubChem (NCBI) (2025).

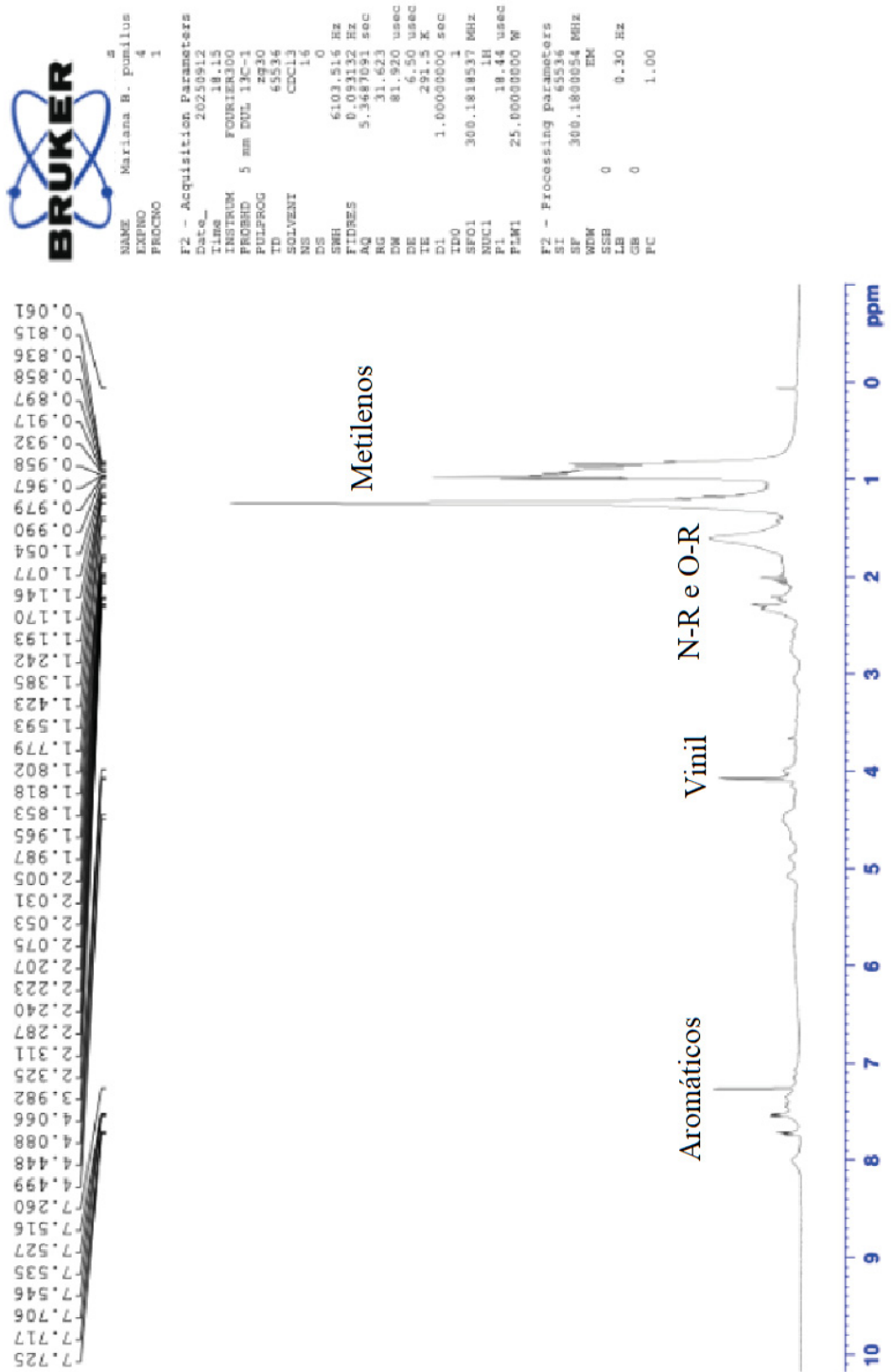
LEGENDA: A) CID (44227777); B) CID (44227776); C) CID (44227775).

A atribuição das fórmulas moleculares $\text{C}_{51}\text{H}_{90}\text{N}_7\text{O}_{13}^+$ (erro de 1.8 ppm, mSigma = 15.1), $\text{C}_{52}\text{H}_{92}\text{N}_7\text{O}_{13}^+$ (erro de 0.7 ppm, mSigma = 10.1) e $\text{C}_{53}\text{H}_{94}\text{N}_7\text{O}_{13}^+$ (erro de 2.0 ppm, mSigma = 9.1) foi validada pelos baixos erros de massa e excelente correlação dos padrões isotópicos experimentais com os teóricos. Esses dados indicam a presença de múltiplas isoformas de surfactina, cuja variação estrutural ocorre principalmente no comprimento da cadeia graxa. A heterogeneidade dessas isoformas

foi confirmada por Kakinuma *et al.* (1969) por espectrometria de massas, que identificaram diferentes ácidos graxos β -hidroxilados ligados à mesma sequência peptídica. Além disso, a biossíntese da surfactina envolve a ação flexível das NRPSs, cuja variação na incorporação de aminoácidos e resíduos lipídicos resulta em diferentes isoformas, conforme descrito por Yu *et al.* (2024).

Da mesma forma, a RMN ^1H , contribui para a caracterização química de misturas complexas, como são os extratos contendo LPs. Portanto, RMN ^1H foi utilizada como uma ferramenta complementar para a identificação dos compostos. O espectro obtido (FIGURA 16) revelou sinais característicos atribuíveis à presença de LPs.

FIGURA 16 - ESPECTRO RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ¹H DE EXTRATO DE *B. pumilus*



Fonte: A autora (2025).

A região entre δ 0,9 e 2,5 ppm, apresentou sinais múltiplos atribuídos aos grupos metila e metileno das cadeias hidrocarbonadas alifáticas, indicativos da presença de caudas graxas típicas de LPs.

Múltiplos sinais entre δ 4,0 e 5,5 ppm são compatíveis aos hidrogênios α dos aminoácidos e ao hidrogênio ligado ao carbono envolvido na formação do anel lactona. Um pico característico em aproximadamente δ 5,1 ppm, reforça a presença deste anel, estrutura essencial da conformação cíclica das surfactinas.

Além disso, a ausência de picos intensos e bem definidos entre δ 6,0 e 8,5 ppm indica que não há resíduos aromáticos em abundância, como tirosina, o que contribui para a exclusão de outras classes de LPs, como fengicinas e iturinas. Um pequeno pico observado próximo a 8 ppm, é compatível com hidrogênios de amida da cadeia peptídica.

Os espectros de RMN ^1H obtidos estão de acordo com os resultados encontrados por Peypoux *et al.* (1991), exibindo sinais nas regiões características de prótons de amida (δ 6,5 - 10 ppm), carbonos α dos aminoácidos (δ 3,5 - 5,5 ppm) e cadeias laterais alifáticas (δ 0,25 - 3,0 ppm).

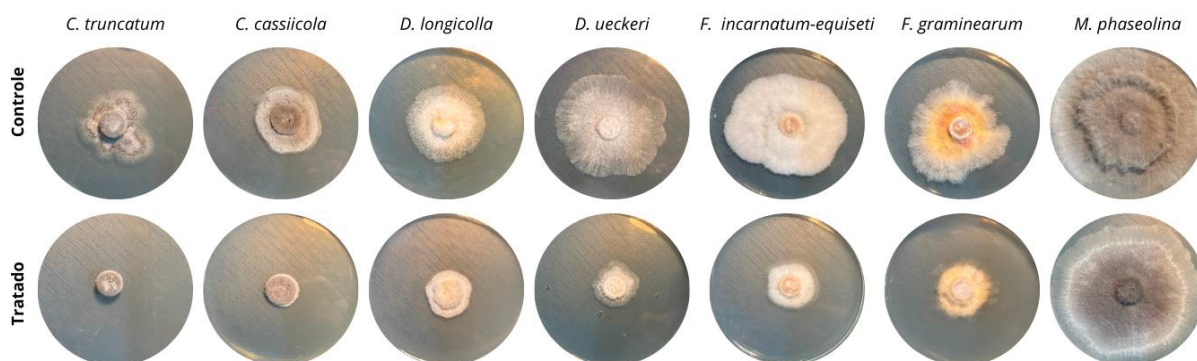
Esses dados indicam que os compostos majoritários presentes no extrato analisado possuem características estruturais compatíveis com as surfactinas, uma classe conhecida de LPs biosurfactantes produzidos por espécies do gênero *Bacillus*.

A espectrometria de massas, nas modalidades ESI(+) complementou os dados obtidos por RMN ^1H , fornecendo informações sobre o peso molecular e o padrão de fragmentação dos compostos presentes.

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os resultados obtidos a partir do desafio dos fungos com o extrato de LPs de *B. pumilus* estão apresentados na FIGURA 17. Foram aplicados 200 μL do extrato para avaliar se o contato direto promoveria alterações morfológicas e/ou inibição do crescimento fúngico.

FIGURA 17 - FITOPATÓGENOS DESAFIADOS COM EXTRATO DE LIPOPEPTÍDEO DE *B. pumilus*



FONTE: A autora (2025)

LEGENDA: Culturas de fungos em meio BDA. Controle: sem adição de extrato. Tratado: suplementado com 200 μ L de extrato de LPs (5 mg/mL) obtidos de *B. pumilus*. Condições de incubação: 4 dias a 28 °C.

Foi possível observar diferenças entre o controle, no qual não havia extrato sobre a superfície do meio de cultura, e os tratamentos com extrato. A principal diferença foi a inibição do crescimento, visto que os fungos-controle apresentaram áreas maiores de desenvolvimento.

Nos casos de *C. truncatum* e *C. cassicola*, o crescimento observado nos tratamentos correspondeu apenas ao diâmetro inicial do disco fúngico de repique (9 mm), sem expansão sobre a superfície do meio, diferentemente do observado no controle, onde houve crescimento ativo. Já os fungos *D. longicolla*, *D. ueckeri*, *F. incarnatum-equiseti* e *F. graminearum* apresentaram um leve crescimento além da área do repique, porém com redução expressiva em comparação ao controle.

No caso de *M. phaseolina*, não foram verificadas grandes diferenças na taxa de crescimento entre tratado e controle. Entretanto, a análise macroscópica revelou alterações morfológicas importantes no micélio tratado, como mudanças de coloração, padrão de radiação e ausência de hifas aéreas, sugerindo um possível efeito fisiológico mesmo sem redução aparente no crescimento.

Estudos prévios demonstram que LPs produzidos por *B. pumilus* apresentam eficácia contra diferentes fungos fitopatogênicos (Dobrzynski *et al.*, 2025), confirmando o elevado potencial dessa espécie como agente biocontrolador (Dehghanifar; Keyhanfar; Emtiazi, 2019). Esses compostos podem ser sintetizados isoladamente ou coproduzidos em associação com outras famílias de LPs, sendo a diversidade estrutural frequentemente associada a maior eficiência antimicrobiana (Malakar *et al.*, 2023). Assim, os resultados aqui obtidos corroboram com resultados

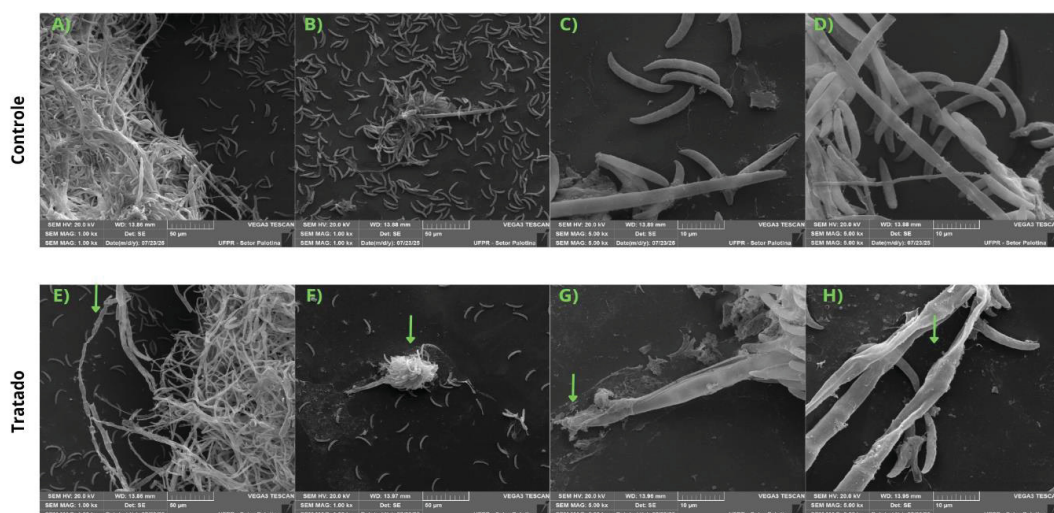
anteriores descritos na literatura e reforçam a aplicabilidade de *B. pumilus* como alternativa sustentável no manejo de fitopatógenos.

4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para a microscopia eletrônica de varredura (MEV), foram preparadas duas amostras de cada fungo: uma correspondente ao controle (sem contato com o extrato) e outra obtida a partir dos micélios desafiados, conforme descrito no item 4.6. O objetivo dessa etapa foi avaliar possíveis alterações morfológicas decorrentes da exposição ao extrato de LPs. As amostras controle serviram como parâmetro de comparação, possibilitando confirmar a ocorrência de modificações estruturais nos fungos tratados.

As alterações observadas em *C. truncatum* após o tratamento, em comparação ao controle estão apresentadas na FIGURA 18. Verificou-se destruição da ponta de uma cerda e comprometimento de sua formação basal, deformação dos conídios, murchamento das hifas e redução no número de conídios nas amostras tratadas. Resultados semelhantes foram observados por Deng *et al.* (2023), que relataram inchaço, enrugamento e deformações em hifas de uma espécie de *Colletotrichum* tratada com LPs. De forma consistente, Bhakat *et al.* (2023) também observaram, por MEV, alterações na integridade e morfologia do micélio e esporos de outra espécie do gênero.

FIGURA 18 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE *Colletotrichum truncatum*

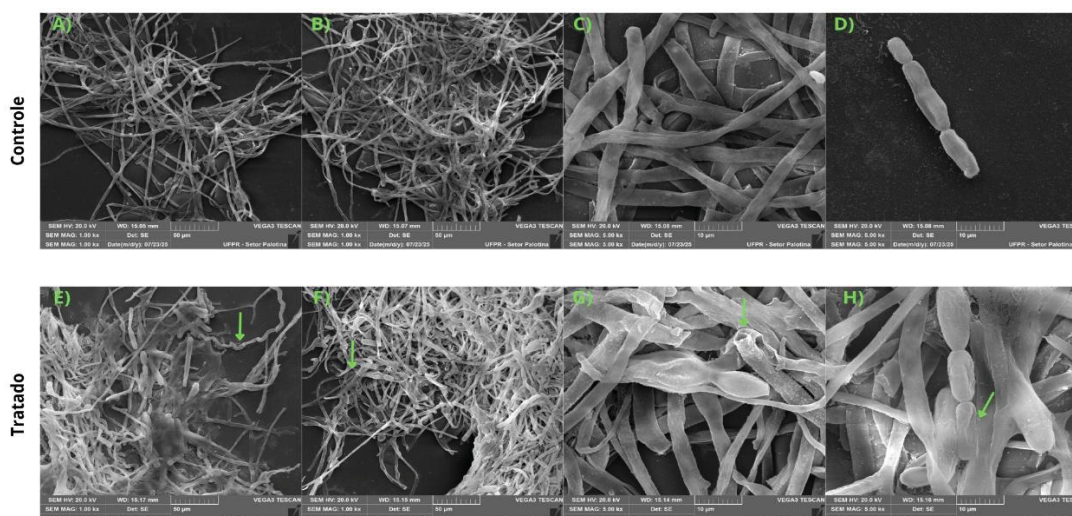


FONTE: A autora (2025)

LEGENDA: Aumento de 1.000 vezes, tamanho 50 μm (A, B, E, F); aumento de 5.000 vezes, tamanho 10 μm (C, D, G, H). A-D: *C. truncatum* controle sem tratamento. E-H: *C. truncatum* tratado com extrato de LPs de *B. pumilus* (5 mg/mL).

As capturas obtidas para *C. cassicola* estão apresentadas na FIGURA 19. Foram observadas alterações morfológicas como murchamento, mudança na angulação e ruptura evidente das hifas, além do surgimento de um aspecto granular ausente na amostra controle (sem contato com LPs). Também foi verificada a deformação de conídios, que apresentaram leve murchamento e formato côncavo. Até o momento, não há relatos de análises por MEV desse fungo em contato direto com extratos de LPs. Entretanto, estudos prévios já evidenciaram atividade antifúngica desses compostos contra *C. cassicola* (Malakar *et al.*, 2023).

FIGURA 19 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE *Corynespora cassiicola*

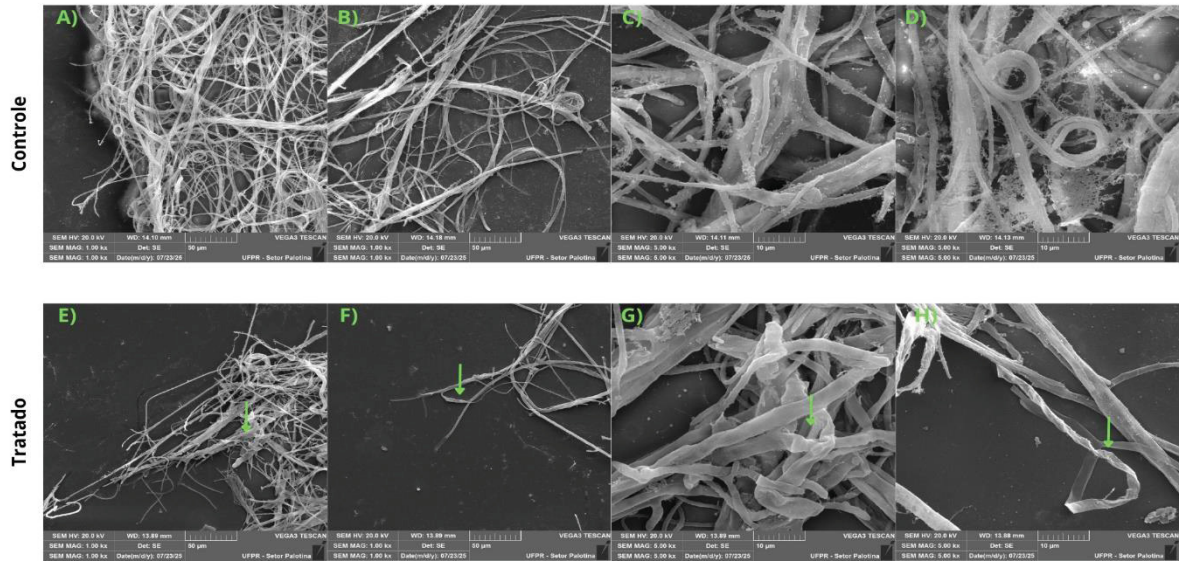


FONTE: A autora (2025)

LEGENDA: Aumento de 1.000 vezes, tamanho 50 μm (A, B, E, F); aumento de 5.000 vezes, tamanho 10 μm (C, D, G, H). A-D: *C. cassiicola* controle sem tratamento. E-H: *C. cassiicola* tratado com extrato de LPs de *B. pumilus* (5 mg/mL).

As micrografias obtidas para *D. longicolla* estão apresentadas na FIGURA 20. Até o momento, não foram encontrados relatos na literatura que empregassem MEV para avaliar alterações morfológicas desse fungo em contato com LPs. No presente trabalho, observou-se que o tratamento com o extrato promoveu alterações evidentes nas hifas, como murchamento, torções e indícios de perda do conteúdo celular. A cepa analisada não apresentou formação de esporos. Nas amostras controle, em contrapartida, foi possível visualizar regiões em que as hifas exibiam espiralamento, possivelmente relacionado à formação de estruturas de resistência. Entretanto, nas amostras tratadas, a formação dessas estruturas mostrou-se interrompida, sugerindo comprometimento do desenvolvimento fúngico.

FIGURA 20 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE *Diaporthe longicolla*

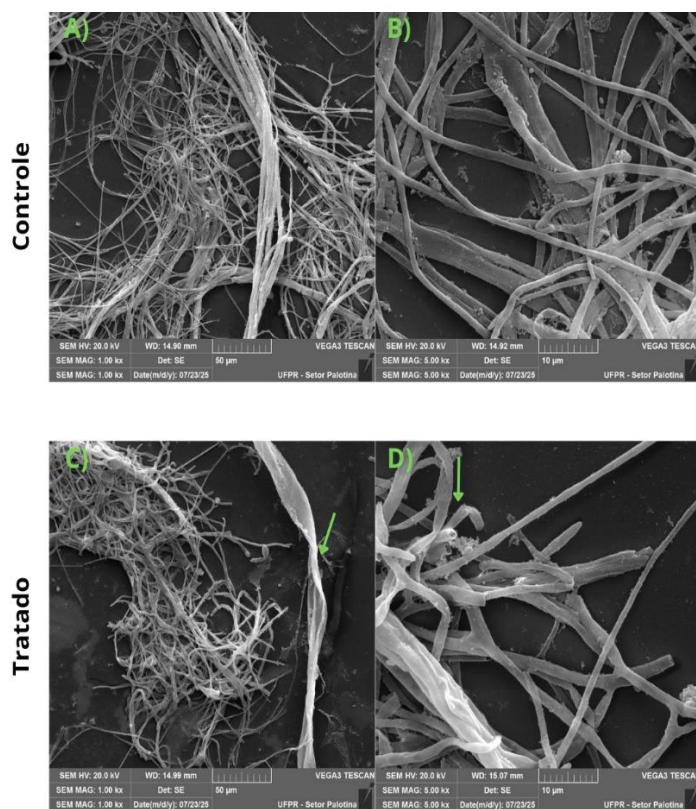


FONTE: A autora (2025)

LEGENDA: Aumento de 1.000 vezes, tamanho 50 µm (A, B, E, F); aumento de 5.000 vezes, tamanho 10 µm (C, D, G, H). A-D: *D. longicolla* controle sem tratamento. E-H: *D. longicolla* tratado com extrato de LPs de *B. pumilus* (5 mg/mL).

As micrografias obtidas para *D. ueckeri* estão apresentadas na FIGURA 21. *D. ueckeri* é uma espécie relativamente recente na literatura, especialmente no Brasil. Observou-se que o extrato de LPs interferiu na formação das hifas, promovendo alterações morfológicas como murchamento, torção e indícios de perda do conteúdo celular, de forma semelhante ao verificado para *D. longicolla*.

FIGURA 21 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE *Diaporthe ueckeri*

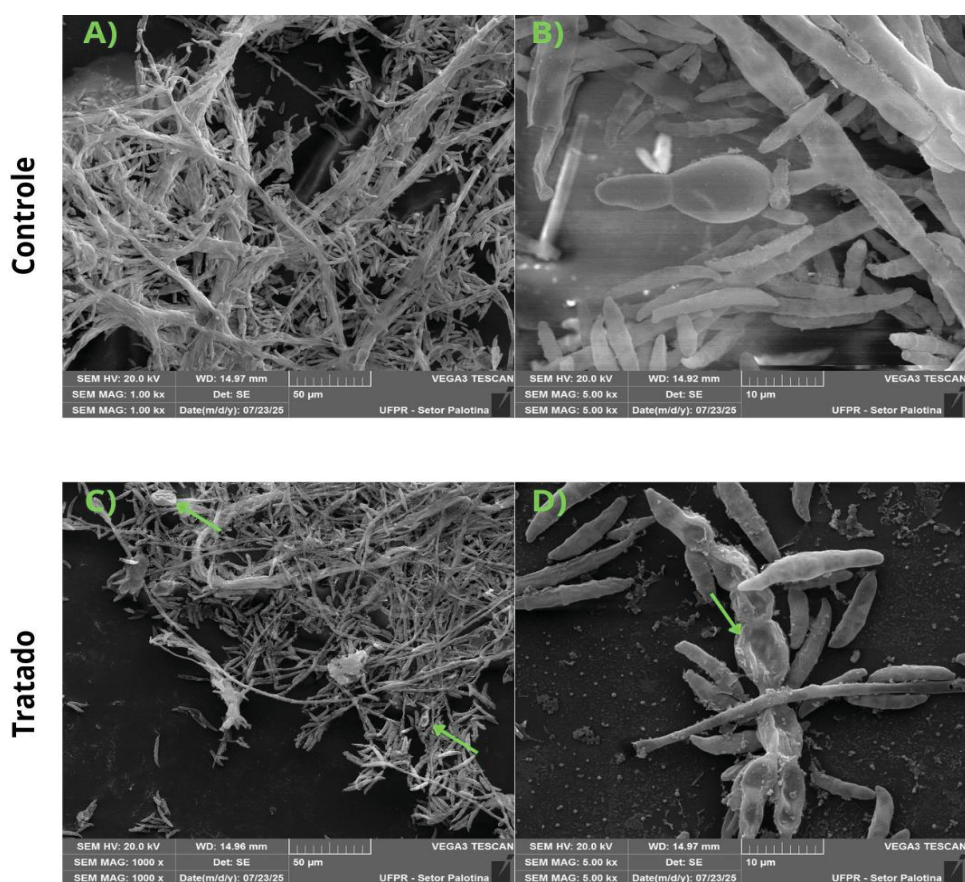


FONTE: A autora (2025)

LEGENDA: Aumento de 1.000 vezes, tamanho 50 µm (A, C); aumento de 5.000 vezes, tamanho 10 µm (B, D). A-B: *D. ueckeri* controle sem tratamento. C-D: *D. ueckeri* tratado com extrato de LPs de *B. pumilus* (5 mg/mL).

As micrografias de *F. incarnatum-equiseti* estão apresentadas na FIGURA 22. O principal achado foi relacionado aos macroconídios: nas amostras controle, apresentaram-se íntegros e com morfologia regular, enquanto no tratamento com LPs exibiram anomalias, incluindo murchamento acentuado que resultou em formatos côncavos. Além disso, observaram-se alterações nos conídios, que apresentaram formas irregulares, presença de protuberâncias ausentes no controle e variação acentuada no tamanho. Resultados semelhantes foram descritos por Mihalache *et al.* (2018), que também relataram deformações em conídios e conidióforos, além da inibição da formação e germinação de esporos. Segundo os autores, os LPs promovem danos irreversíveis à parede celular das hifas, mecanismo que pode explicar as alterações observadas no presente estudo.

FIGURA 22 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE *Fusarium incarnatum equiseti*

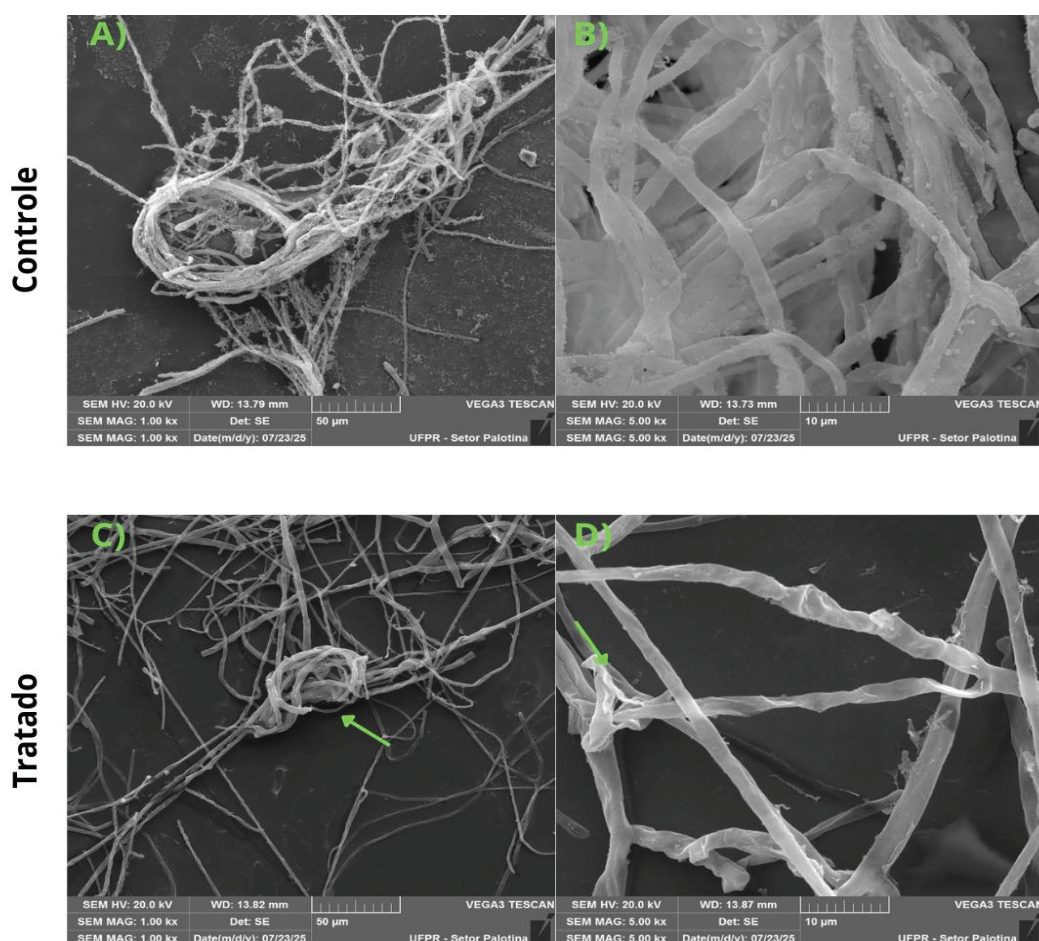


FONTE: A autora (2025)

LEGENDA: Aumento de 1.000 vezes, tamanho 50 µm (A, C); aumento de 5.000 vezes, tamanho 10 µm (B, D). A-B: *F. incarnatum-equiseti* controle sem tratamento. C-D: *F. incarnatum-equiseti* tratado com extrato de LPs de *B. pumilus* (5 mg/mL).

As micrografias de *F. graminearum* estão apresentadas na FIGURA 23. Foram observadas alterações significativas nas hifas, como murchamento e ruptura. Resultados semelhantes foram relatados por Liu *et al.* (2025), que, em análises de MEV, descreveram o micélio enrugado, sugerindo que esse aspecto pode estar associado ao efluxo do material intracelular decorrente da ruptura da parede celular. Utilizando o mesmo material, os autores também realizaram microscopia eletrônica de transmissão (MET), na qual foi possível observar com maior riqueza de detalhes as modificações ultraestruturais.

FIGURA 23 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE *Fusarium graminearum*



FONTE: A autora (2025)

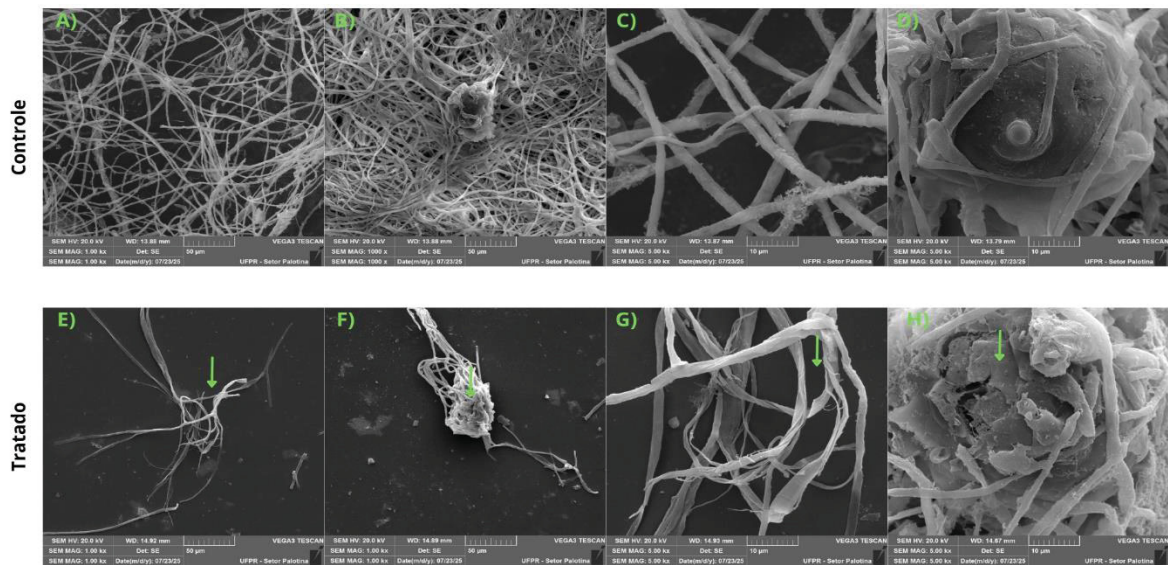
LEGENDA: Aumento de 1.000 vezes, tamanho 50 µm (A, C); aumento de 5.000 vezes, tamanho 10 µm (B, D). A-B: *F. graminearum* controle sem tratamento. C-D: *F. graminearum* tratado com extrato de LPs de *B. pumilus* (5 mg/mL).

As micrografias obtidas para *M. phaseolina* estão apresentadas na FIGURA 24. A análise por MEV revelou alterações significativas tanto nas hifas quanto nos microescleródios do fungo. Nas hifas, foi possível observar redução na abundância, além de comprometimento da integridade estrutural, evidenciado por afinamento, torção e aspecto de murcha. Em relação aos microescleródios, verificou-se a ocorrência de anomalias em sua formação, quando comparados os tratamentos com o controle, sugerindo que o extrato interferiu diretamente no processo de desenvolvimento dessas estruturas de resistência.

Até o momento, não foram encontrados trabalhos que avaliem, por meio de MEV, os efeitos de extratos de LPs sobre *M. phaseolina*, um fungo de elevada importância agrícola. No entanto, há relatos de espécies de *Bacillus* com potencial de controle desse patógeno por meio da produção de LPs. Torres *et al.* (2016), por

exemplo, descreveram, utilizando MEV, as alterações morfológicas observadas na zona de inibição de ensaios de cultura pareada. Contudo, os efeitos descritos por esses autores demonstraram menor impacto sobre a estrutura fúngica em comparação aos resultados obtidos no presente trabalho, no qual foi utilizado extrato concentrado de LPs.

FIGURA 24 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE *Macrophomina phaseolina*



FONTE: A autora (2025)

LEGENDA: Aumento de 1.000 vezes, tamanho 50 µm (A, B, E, F); aumento de 5.000 vezes, tamanho 10 µm (C, D, G, H). A-D: *M. phaseolina* controle sem tratamento. E-H: *M. phaseolina* tratado com extrato de LPs de *B. pumilus* (5 mg/mL).

De modo geral, a MEV mostrou-se uma ferramenta de grande relevância para a avaliação dos efeitos do extrato de LPs obtido de *B. pumilus*. As alterações nas hifas foram evidentes em todos os fungos analisados e, naqueles que produziram esporos, essas estruturas também apresentaram comprometimento. Além disso, estruturas de resistência sofreram modificações perceptíveis.

Levanta-se a hipótese de que o fungo que apresentou maior sensibilidade ao extrato foi *M. phaseolina*, possivelmente em razão de seu crescimento mais acelerado em comparação aos demais. Alterações mais expressivas poderiam ter sido observadas em *C. truncatum* e *C. cassicola*. Contudo, conforme indicado no ensaio de verificação da atividade antimicrobiana (FIGURA 17), não houve crescimento além da área de repique (9 mm). Essa limitação pode ter influenciado a análise por MEV, visto que o micélio coletado não esteve totalmente exposto ao extrato no meio de

cultura. Ainda assim, foi possível identificar alterações, mesmo que em menor intensidade.

As micrografias foram obtidas a partir das regiões que apresentaram as alterações mais evidentes em comparação ao controle. Outro fator que pode ter influenciado os resultados refere-se à quantidade de micélio coletada, que não foi uniforme entre os fungos. Dessa forma, em alguns casos pode ter havido menor disponibilidade de material para análise, o que possivelmente restringiu a detecção de alterações adicionais que de fato ocorreram, mas não puderam ser registradas.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho permitiu o isolamento e identificação de sete fungos importantes causadores de doenças em sementes de soja, sendo eles: *C. truncatum*, *C. cassicola*, *D. longicolla*, *D. ueckeri*, *F. incarnatum-equiseti*, *F. graminearum* e *M. phaseolina*.

Nos ensaios de antagonismo realizados, a bactéria *B. pumilus* destacou-se entre as espécies testadas (*B. nealsonii*, *B. licheniformis* e *B. tequilensis*), apresentando maior potencial de inibição do crescimento fúngico. A extração de LPs, embora com rendimento relativamente baixo, foi suficiente para demonstrar atividade antifúngica frente aos fitopatógenos avaliados.

A caracterização do extrato por ESI(+)-HRMS/MS e RMN ¹ H confirmou a presença de isoformas de surfactina, sendo elas C13, C14 e C15.

A verificação da atividade antimicrobiana *in vitro* mostrou que, em contato direto com o fungo, o extrato reduziu a área de crescimento, além de modificar características macroscópicas, como cor e aspecto do micélio.

Complementarmente, a microscopia eletrônica de varredura evidenciou diversas alterações morfológicas nas estruturas fúngicas, como afinamento, torção e murcha das hifas, além da perda de integridade dos esporos e anomalias na formação de estruturas de resistência. Tais alterações sugerem comprometimento da membrana e da parede celular, possivelmente levando à perda do conteúdo intracelular e inviabilizando o desenvolvimento dos fungos.

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que o extrato de LPs produzido por *B. pumilus* apresenta elevado potencial de biocontrole de fitopatógenos de soja, podendo ser explorado como alternativa promissora e sustentável para o manejo integrado de doenças. Além de reduzir a dependência exclusiva de fungicidas químicos, sua aplicação pode contribuir para práticas agrícolas mais seguras e ambientalmente responsáveis.

5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para dar continuidade a este estudo, recomenda-se que futuras pesquisas considerem a otimização das condições de cultivo, com o objetivo de maximizar o rendimento na produção de LPs. Sugere-se, ainda, a aplicação de diferentes

abordagens para a avaliação da atividade antifúngica, incluindo avaliações em diferentes concentrações do extrato.

Outro ponto relevante é investigar e avaliar *in vivo* o potencial do extrato não apenas quanto à atividade antifúngica direta, mas também em relação à promoção do crescimento vegetal, à indução de resistência sistêmica e a outros mecanismos de interação benéfica com as plantas.

Adicionalmente, recomenda-se o estudo da interação do extrato com os fungos em nível molecular, por meio da análise de expressão gênica associada a possíveis mecanismos de ação, como a indução de espécies reativas de oxigênio (EROs), a regulação de genes relacionados à morfologia e a respostas a estresses.

Por fim, destaca-se que este campo de pesquisa pode se expandir além da agricultura, alcançando também a área médica e veterinária, onde o controle de fungos de interesse clínico representa um desafio crescente.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, Mohit *et al.* Differential antagonistic responses of *Bacillus pumilus* MSUA3 against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* causing fungal diseases in *Fagopyrum esculentum* Moench. **Microbiological research**, v. 205, p. 40-47, 2017.

AGROFIT (2024). Sistemas de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: https://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons_acesado_em_12/12/2024.

AHMED, Abdalmoiz IM *et al.* Effect of short-term exposure to the strobilurin fungicide dimoxystrobin: Morphofunctional, behavioural and mitochondrial alterations in *Danio rerio* embryos and larvae. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 279, p. 116493, 2024.

AMJID, Muhammad; ÜSTÜN, Rüstem. Selection of soybean genotypes exhibiting drought resistance by assessing morphological and yield traits. **Euphytica**, v. 221, n. 4, p. 1-21, 2025.

ARIAS, M. M. D.; LEANDRO, L. F.; MUNKVOLD, G. P. Aggressiveness of *Fusarium* species and impact of root infection on growth and yield of soybeans. **Phytopathology**, v. 103, n. 8, p. 822-832, jul. 2013.

ASSIS, Rhayane A. *et al.* Mutagenic effect of a commercial fungicide on *Rana catesbeiana* and *Leptodactylus latrans* tadpoles. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 94, n. suppl 4, p. e20210161, 2022.

BAARD, Vejonepher *et al.* Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* and *Bacillus tequilensis* against four *Fusarium* species. **Pathogens**, v. 12, n. 2, p. 254, 2023.

BACKMAN, P. A.; WEAVER, D. B.; MORGAN-JONES, G. Soybean stem canker: An emerging disease problem. *Plant Disease*, v. 69, n. 8, p. 641-648, ago. 1985.

BAĆMAGA, Małgorzata; WYSZKOWSKA, Jadwiga; KUCHARSKI, Jan. Response of soil microbiota, enzymes, and plants to the fungicide azoxystrobin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 15, p. 8104, 2024.

BAI, Xue *et al.* Identification and comparative genomic analysis of two *Bacillus subtilis* producing antifungal lipopeptide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, p. 106470, 2025.

BAIBAKOVA, Ekaterina V. *et al.* Modern fungicides: Mechanisms of action, fungal resistance and phytotoxic effects. **Annual Research & Review in Biology**, v. 32, n. 3, p. 1-16, 2019.

BAKR, Ramadan *et al.* The Potential of Beneficial Microbes for Sustainable Alternative Approaches to Control Phytopathogenic Diseases. **Microbiology Research**, v. 16, n. 5, p. 105, 2025.

BARTHE, Philippe *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.

BARUZZI, Federico *et al.* Antimicrobial compounds produced by *Bacillus* spp. and applications in food. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**, v. 2, n. 1, p. 1102-1111, 2011.

BATZER, Jean Carlson; MUELLER, Daren S. Soybean fungal endophytes *Alternaria* and *Diaporthe* spp. are differentially impacted by fungicide application. **Plant disease**, v. 104, n. 1, p. 52-59, 2020.

BERGLÖF, Tomas *et al.* Carbendazim sorption–desorption in Vietnamese soils. **Chemosphere**, v. 48, n. 3, p. 267-273, 2002.

BHADARIA, Vijai *et al.* Overexpression of a novel biotrophy-specific *Colletotrichum truncatum* effector, CtNUDIX, in hemibiotrophic fungal phytopathogens causes incompatibility with their host plants. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 1, p. 2-11, 2013.

BHATT, Pooja *et al.* Simple sequence repeat genotyping of *Colletotrichum* species associated with soybean anthracnose in Uttarakhand and other states of India. **Journal of Phytopathology**, v. 172, n. 4, p. e13376, 2024.

BICCA, Flávio Correa; FLECK, Leonardo Colombo; AYUB, Marco Antônio Záchia. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and

BINIARZ, Piotr; ŁUKASZEWICZ, Marcin; JANEK, Tomasz. Screening concepts, characterization and structural analysis of microbial-derived bioactive lipopeptides: a review. **Critical reviews in biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 393-410, 2017.

BOOSALIS, M. G.; HAMILTON, R. I. Root and stem rot of soybean caused by *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei. 1957.

BOUFLEUR, Thais R. *et al.* Soybean anthracnose caused by *Colletotrichum* species: Current status and future prospects. **Molecular Plant Pathology**, v. 22, n. 4, p. 393-409, 2021.

BRANDA, Steven S. *et al.* Biofilms: the matrix revisited. **Trends in microbiology**, v. 13, n. 1, p. 20-26, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de Análise Sanitária de Sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 200p.

BRETON, Frédéric; SANIER, Christine; D'AUZAC, Jean. Role of cassiicolin, a host-selective toxin, in pathogenicity of *Corynespora cassiicola*, causal agent of a leaf fall disease of Hevea. **Journal of Rubber Research**, v. 3, n. 2, p. 115, 2000.

BROWN, Neil A.; ANTONIW, John; HAMMOND-KOSACK, Kim E. The predicted secretome of the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*: a refined comparative analysis. ***PloS one***, v. 7, n. 4, p. e33731, 2012.

BUENO, Silvia Messias. Bactérias produtoras de biossurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo. **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, SP**, 2008.

CASTILLO, Hernández FD *et al.* Biological control of root pathogens by plant-growth promoting *Bacillus* spp. **Weed and pest control-conventional and new challenges**, p. 79-103, 2013.

CERESINI, Paulo Cezar *et al.* Strategies for managing fungicide resistance in the Brazilian tropical agroecosystem: Safeguarding food safety, health, and the environmental quality. **Tropical Plant Pathology**, v. 49, n. 1, p. 36-70, 2024.

CHANG, Xiaoli *et al.* Diversity of the seedborne fungi and pathogenicity of *Fusarium* species associated with intercropped soybean. **Pathogens**, v. 9, n. 7, p. 531, 2020.

CHEN, Meiling *et al.* A novel antimicrobial peptide screened by a *Bacillus subtilis* expression system, derived from *Larimichthys crocea* Ferritin H, exerting bactericidal and parasitocidal activities. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1168517, 2023.

CHOWDHURY, Supriyo; BASU, Arpita; KUNDU, Surekha. Biotrophy-necrotrophy switch in pathogen evoke differential response in resistant and susceptible sesame involving multiple signaling pathways at different phases. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 17251, 2017.

CORKLEY, Isabel; FRAAIJE, Bart; HAWKINS, Nichola. Fungicide resistance management: Maximizing the effective life of plant protection products. **Plant Pathology**, v. 71, n. 1, p. 150-169, 2022.

Crop Protection Network. 2024. Estimates of crop yield losses due to diseases and invertebrate pests: an online tool. [Doi.org/10.31274/cpn-20191121-0](https://doi.org/10.31274/cpn-20191121-0)

CUOMO, Christina A. *et al.* The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization. **Science**, v. 317, n. 5843, p. 1400-1402, 2007.

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

DEB, Debjani *et al.* Investigating potential water quality impacts of fungicides used to combat soybean rust in Indiana. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 207, p. 273-288, 2010.

DEGHANIFAR, Shahrzad; KEYHANFAR, Mehrnaz; EMTIAZI, Giti. Production and partial purification of thermostable bacteriocins from *Bacillus pumilus* ZED17 and

DFAR8 strains with antifungal activity. **Molecular biology research communications**, v. 8, n. 1, p. 41, 2019.

DEISING, Holger B.; REIMANN, Sven; PASCHOLATI, Sérgio F. Mechanisms and significance of fungicide resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 286-295, 2008.

DENG, Ying-Jie *et al.* Antifungal activities of *Bacillus velezensis* FJAT-52631 and its lipopeptides against anthracnose pathogen *Colletotrichum acutatum*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 63, n. 6, p. 594-603, 2023.

DETRANALTES, Christopher; MA, Jianxin; CAI, Guohong. Identification of Soybean Germplasm and Associated Molecular Markers with Resistance to *Fusarium graminearum*. **Agronomy**, v. 13, n. 9, p. 2376, 2023.

DIAS, Moab Diany; PINHEIRO, Valdeci Fernandes; CAFÉ-FILHO, Adalberto Corrêa. Impacto da antracnose na produtividade de soja sob controle químico na região norte do Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 42, p. 18-23, 2016.

DINANGO, Vanessa Nya *et al.* Unveiling the plant growth promotion and the antifungal potency against maize pathogen *Fusarium verticillioides* by desert-derived endophytes *Bacillus subtilis* RA15 and *Bacillus tequilensis* FC6 and their lipopeptides. **Applied Soil Ecology**, v. 207, p. 105949, 2025.

DWIVEDI, Shreya; GAUR, Vivek Kumar; GUPTA, Juhi. Ecotoxicological impact of succinate dehydrogenase inhibitor (SDHI) fungicides on non-targeted organisms: a review. **Ecotoxicology**, p. 1-21, 2025.

EKWOMADU, Theodora I.; GOPANE, Ramokone E.; MWANZA, Mulunda. Occurrence of filamentous fungi in maize destined for human consumption in South Africa. **Food science e nutrition**, v. 6, n. 4, p. 884-890, 2018.

EKWOMADU, Theodora Ijeoma; MWANZA, Mulunda. *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, 2023.

ELSHAGHABEE, Fouad MF *et al.* *Bacillus* as potential probiotics: status, concerns, and future perspectives. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1490, 2017.

FAO. Pesticides Use and Trade, 1990–2021. FAOSTAT Analytical Briefs, 2023.

FAVARO, Gabriella *et al.* Characterization of lipopeptides produced by *Bacillus licheniformis* using liquid chromatography with accurate tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 30, n. 20, p. 2237-2252, 2016.

FÖRSTER, Bernhard *et al.* Effects of carbendazim and lambda-cyhalothrin on soil invertebrates and leaf litter decomposition in semi-field and field tests under tropical conditions (Amazônia, Brazil). **European Journal of Soil Biology**, v. 42, p. S171-S179, 2006.

GAMBHIR, Nikita *et al.* Spontaneous and fungicide-induced genomic variation in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**®, v. 111, n. 1, p. 160-169, 2021.

GAO, Nana *et al.* The administration of Glycyrrhiza polysaccharides mitigates liver injury in mice caused by mancozeb via the Keap1-Nrf2/NF-κB pathway. **Food and Chemical Toxicology**, v. 195, p. 115088, 2025.

GAO, Yahui; LIU, Fang; CAI, Lei. Unravelling *Diaporthe* species associated with *Camellia*. **Systematics and Biodiversity**, v. 14, n. 1, p. 102-117, 2016.

GEISER, David M. *et al.* One fungus, one name: defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. **Phytopathology**, v. 103, n. 5, p. 400-408, 2013.

GHOSAL, Debraj; DATTA, Bejoysekhar. Characterization, phylogenetic analysis and toxigenic potential of *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex isolates associated with root rot disease in vegetables. **Journal of Phytopathology**, v. 172, n. 4, p. e13362, 2024.

GOMES, Juliana Barroso *et al.* **Avaliação do potencial genotóxico, imunotóxico e carcinogênico dos compostos benzimidazóis: uma revisão sistemática de estudos epidemiológicos e experimentais**. 2022. Tese de Doutorado.

GOMES, R. R. *et al.* *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 31, n. 1, p. 1-41, 2013.

GOSWAMI, Dweipayan; THAKKER, Janki N.; DHANDHUKIA, Pinakin C. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n. 1, p. 1127500, 2016.

GUILLANTE, Tainá *et al.* Chlorothalonil as a potential endocrine disruptor in male zebrafish (*danio rerio*): impact on the hypothalamus-pituitary-gonad axis and sperm quality. **Chemosphere**, v. 352, p. 141423, 2024.

HAAFKE, Alexandria Jade. **Management of Diaporthe-infected soybean seed**. 2021. Dissertação de Mestrado. Iowa State University.

H Aidar *et al.* Screening and modes of action of antagonistic bacteria to control the fungal pathogen *Phaeomoniella chlamydospora* involved in grapevine trunk diseases. **Microbiology Research**, v. 192:172-184, 2016.

HALL, Tom A. *et al.* BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: **Nucleic acids symposium series**. 1999. p. 95-98.

HASSAN, Sherif M. Soybean, nutrition and health. **Soybean-Bio-Active Compounds**, v. 20, p. 453-473, 2013.

HERRMANN, Leonardo Wedderhoff *et al.* *Bacillus* genus industrial applications and innovation: First steps towards a circular bioeconomy. **Biotechnology Advances**, v. 70, p. 108300, 2024.

HEYDARI, ASGHAR; MISAGHI, IRAJ J. Herbicide-Mediated Changes in the Population and Activity of Root-Potential Cause of Plant Stress. **Plant and**, p. 613, 1999.

HOSSEINI, Behnoush. Species of the *Diaporthe/Phomopsis* Complex (DPC) in European soybean and establishment of quadruplex Real-Time PCR for diagnosis. 2023.

IBE, Chibuike; OLADELE, Rita O.; ALAMIR, Omran. Our pursuit for effective antifungal agents targeting fungal cell wall components: where are we?. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 59, n. 1, p. 106477, 2022.

ISLAM, Md Shahidul *et al.* Tools to kill: genome of one of the most destructive plant pathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*. **BMC genomics**, v. 13, p. 1-16, 2012.

ISLAM, Tarequl *et al.* Resistance mechanisms of plant pathogenic fungi to fungicide, environmental impacts of fungicides, and sustainable solutions. **Plants**, v. 13, n. 19, p. 2737, 2024.

JACOBS, Adriaana *et al.* Characterisation of members of the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex from undisturbed soils in South Africa. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 111, p. 1999-2008, 2018.

JIA, Qinlan *et al.* Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* XJ-BV2007 on growth of *Alternaria alternata* and production of tenuazonic acid. **Toxins**, v. 15, n. 1, p. 53, 2023.

KAKINUMA, Atsushi *et al.* Confirmation of the structure of surfactin by mass spectrometry. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 33, n. 11, p. 1669-1671, 1969.

KARAS, P. A. *et al.* Assessment of the impact of three pesticides on microbial dynamics and functions in a lab-to-field experimental approach. **Science of the total environment**, v. 637, p. 636-646, 2018.

KIMURA, Keitarou; YOKOYAMA, Satoshi. Trends in the application of *Bacillus* in fermented foods. **Current opinion in biotechnology**, v. 56, p. 36-42, 2019.

LAKHRAN, Lalita *et al.* Isolation, purification, identification and pathogenicity of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) goid caused dry root rot of chickpea. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 3, p. 3314-3317, 2018.

LIU, Long *et al.* Developing *Bacillus* spp. as a cell factory for production of microbial enzymes and industrially important biochemicals in the context of systems and synthetic biology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 14, p. 6113-6127, 2013.

LIU, Xiangyang *et al.* Structural characterization of eight cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* HSO121. **Protein and peptide letters**, v. 14, n. 8, p. 766-773, 2007.

LIU, Yuxuan *et al.* Identification of an antifungal lipopeptide from *Bacillus amyloliquefaciens* HAU3 inhibiting the growth of *Fusarium graminearum* using preparative chromatography and 2D-NMR. **Microbiology Spectrum**, p. e00218-25, 2025.

LÓPEZ-CARDONA, Nathali *et al.* First report of *Diaporthe ueckerae* causing stem canker on soybean (*Glycine max*) in Colombia. **Plant Disease**, v. 105, n. 12, p. 4162, 2021.

LORI, Gabriele *et al.* Toxicological comparison of mancozeb and zoxamide fungicides at environmentally relevant concentrations by an in vitro approach. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 16, p. 8591, 2021.

LUCAS, John A.; HAWKINS, Nichola J.; FRAAIJE, Bart A. The evolution of fungicide resistance. **Advances in applied microbiology**, v. 90, p. 29-92, 2015.

MA, Li-Jun *et al.* *Fusarium* pathogenomics. **Annual review of microbiology**, v. 67, n. 1, p. 399-416, 2013.

MACKENZIE, Keegan J. *et al.* A review of *Corynespora cassiicola* and its increasing relevance to tomato in Florida. **Plant Health Progress**, 19(4), p. 303-309, 2018.

MAHAPATRA, Subhasmita; YADAV, Radheshyam; RAMAKRISHNA, Wusirika. *Bacillus subtilis* impact on plant growth, soil health and environment: Dr. Jekyll and Mr. Hyde. **Journal of applied microbiology**, v. 132, n. 5, p. 3543-3562, 2022.

MALAKAR, Chandana *et al.* A biosurfactant-producing novel bacterial strain isolated from vermicompost having multiple plant growth-promoting traits. **Journal of Basic Microbiology**, v. 63, n. 7, p. 746-758, 2023.

MALFANOVA, Natalia *et al.* Cyclic lipopeptide profile of the plant-beneficial endophytic bacterium *Bacillus subtilis* HC8. **Archives of microbiology**, v. 194, n. 11, p. 893-899, 2012.

MARAL-GÜL, Derya; ELTEM, Rengin. Evaluation of *Bacillus* isolates as a biological control agents against soilborne phytopathogenic fungi. **International Microbiology**, v. 28, n. Suppl 1, p. 75-89, 2025.

MARQUEZ, Nathalie *et al.* *Macrophomina phaseolina*: General characteristics of pathogenicity and methods of control. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 634397, 2021.

MARTINELLI, José A. *et al.* Soybean pod blight and root rot caused by lineages of the *Fusarium graminearum* and the production of mycotoxins. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 492-498, 2004.

MATIĆ, Slavica *et al.* Emerging leafy vegetable crop diseases caused by the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex. **Phytopathol. Mediterr**, v. 59, n. 2, p. 2, 2020.

MENA, E. *et al.* First report of *Diaporthe miriciae* and *Diaporthe masirevicii* causing soybean stem canker in Uruguay. **New Disease Reports**, v. 49, n. 2, 2024.

MÉNDEZ, Michael *et al.* Acute, chronic and biochemical effects of chlorothalonil on *Agalychnis callidryas*, *Isthmohyla pseudopuma* and *Smilisca baudinii* tadpoles. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 21238-21248, 2016.

MIHALACHE, Gabriela *et al.* Lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* as new biocontrol products against fusariosis in ornamental plants. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 30, p. 29784-29793, 2018.

MIRHENDI, Hossein *et al.* A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida* species. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 47, n. 3, p. 225-229, 2006.

MNIF, Inès *et al.* Characterization of lipopeptides biosurfactants produced by a newly isolated strain *Bacillus subtilis* ZNI5: potential environmental application. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 30, n. 6, p. 2378-2391, 2022.

MONKIEDJE, Adolphe; ILORI, Matthew Olusoji; SPITELLER, Michael. Soil quality changes resulting from the application of the fungicides mefenoxam and metalaxyl to a sandy loam soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, n. 12, p. 1939-1948, 2002.

MOON, Jae-Hyun *et al.* Biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) and high-quality walnut production in walnut (*Juglans regia* L.) trees by *Bacillus licheniformis* PR2. **Biological Control**, p. 105871, 2025.

NAEEM, Muhammd *et al.* Transcriptional responses of *Fusarium graminearum* interacted with soybean to cause root rot. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 6, p. 422, 2021.

NASCIMENTO, Cosma RB *et al.* First Report of *Diaporthe ueckeri* and *D. longicolla* as the Causal Agents of Pod and Grain Rot of Soybean in Brazil. **Plant Disease**, v. 109, n. 2, p. 506, 2025.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Artmed Editora, 2014.

NEVES, Andressa C. *et al.* Effect of ultraviolet radiation on inactivation of microorganisms present in Brazilian diesel fuel. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 14, n. 6, p. 1152-1162, 2020.

O'DONNELL, Kerry *et al.* Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 10, p. 3708-3718, 2010.

O'DONNELL, Kerry *et al.* Novel multilocus sequence typing scheme reveals high genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium incarnatum-F. equiseti* and *F. chlamydosporum* species complexes within the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 12, p. 3851-3861, 2009.

O'DONNELL, Kerry *et al.* Phylogenetic diversity of insecticolous fusaria inferred from multilocus DNA sequence data and their molecular identification via *FUSARIUM-ID* and *Fusarium MLST*. **Mycologia**, v. 104, n. 2, p. 427-445, 2012.

OLIVER, Richard P.; HEWITT, H. Geoff. Fungicides in crop protection. **Cabi**, 2014.

PANDEY, Geeta; RATHORE, Harkesh. Toxicity of Strobilurins fungicides: A comprehensive review. **Journal of Chemical Health Risks**, v. 13, n. 2, 2023.

PARK, Junho *et al.* Developmental defects induced by thiabendazole are mediated via apoptosis, oxidative stress and alteration in PI3K/Akt and MAPK pathways in zebrafish. **Environment international**, v. 176, p. 107973, 2023.

PECCI, Ylenia *et al.* LC/ESI-MS/MS characterisation of lipopeptide biosurfactants produced by the *Bacillus licheniformis* V9T14 strain. *Journal of mass spectrometry*, v. 45, n. 7, p. 772-778, 2010.

PETROVIĆ, Kristina *et al.* *Diaporthe* seed decay of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] is endemic in the United States, but new fungi are involved. **Plant disease**, v. 105, n. 6, p. 1621-1629, 2021.

PEYPOUX, Françoise *et al.* Isolation and characterization of a new variant of surfactin, the [Val7] surfactin. **European Journal of Biochemistry**, v. 202, n. 1, p. 101-106, 1991.

PHULPOTO, Irfan Ali *et al.* Production and characterization of surfactin-like biosurfactant produced by novel strain *Bacillus nealsonii* S2MT and its potential for oil contaminated soil remediation. **Microbial cell factories**, v. 19, n. 1, p. 145, 2020.

PIOLI, R. N.; MOZZONI, Leandro; MORANDI, E. N. First report of pathogenic association between *Fusarium graminearum* and soybean. **Plant Disease**, v. 88, n. 2, p. 220-220, 2004.

POTI, Teeranai *et al.* Detection and molecular characterization of carbendazim-resistant *Colletotrichum truncatum* isolates causing anthracnose of soybean in Thailand. **Journal of Phytopathology**, v. 168, n. 5, p. 267-278, 2020.

RAMESH, Swetha *et al.* A promising antifungal lipopeptide from *Bacillus subtilis*: its characterization and insight into the mode of action. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 108, n. 1, p. 161, 2024.

RASBAND, W. S. **Imagej**, us national institutes of health, bethesda, maryland, usa. <http://imagej.nih.gov/ij/>, 2011.

REVEGLIA, Pierluigi *et al.* Uncovering phytotoxic compounds produced by *Colletotrichum* spp. involved in legume diseases using an OSMAC–metabolomics approach. **Journal of Fungi**, 9(6), p. 610, 2023.

REZNIKOV, Sebastian *et al.* Evaluation of chemical and biological seed treatments to control charcoal rot of soybean. **Journal of General Plant Pathology**, v. 82, p. 273-280, 2016.

ROCHA, Patrícia Maria. **Produção de surfactina por *Bacillus subtilis* UFPEDA 438 utilizando melão de cana como substrato**. 2017. Dissertação de Mestrado. Brasil.

RODRIGUES, Elsa Teresa; LOPES, Isabel; PARDAL, Miguel Ângelo. Occurrence, fate and effects of azoxystrobin in aquatic ecosystems: a review. *Environment international*, v. 53, p. 18-28, 2013.

ROMAN, Diana Larisa *et al.* A review of the toxicity of triazole fungicides approved to be used in European Union to the soil and aqueous environment. **Ovidius University Annals of Chemistry**, v. 33, n. 2, p. 113-120, 2022.

ROMERO, Cintia Mariana; COSTA, José Sebastian Dávila. Nano-Biofungicides and Bio-Nanofungicides: State of the Art of Innovative Tools for Controlling Resistant Phytopathogens. 2025.

ROSSMAN, Amy Y. *et al.* Recommendations of generic names in Diaporthales competing for protection or use. **IMA fungus**, v. 6, n. 1, p. 145-154, 2015.

SAIFULLAH, Shahed *et al.* Repeated exposure of fluazinam fungicides affects gene expression profiles yet carries no costs on a nontarget pest. **Insect Science**, v. 29, n. 5, p. 1373-1386, 2022.

SAIYAM, Diksha *et al.* Lipopeptides from *Bacillus*: Unveiling biotechnological prospects—Sources, properties, and diverse applications. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 281-295, 2024.

SANA, Aiman *et al.* Traversing the heat-A review on heat stress untangling the modern approaches in soybean (*Glycine max.* L). **Plant Stress**, v. 15, p. 100731, 2025.

SANTOS, Ana Carla da Silva *et al.* Morphology, phylogeny, and sexual stage of *Fusarium caatingaense* and *Fusarium pernambucanum*, new species of the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex associated with insects in Brazil. **Mycologia**, v. 111, n. 2, p. 244-259, 2019.

SANTOS, Gabriela Carolina dos *et al.* First Report of Seed Decay Caused by *Diaporthe ueckeri* on soybean in Brazil. **Plant Disease**, v. 108, n. 9, p. 2925, 2024.

SANTOS, Jorge Manuel *et al.* Resolving the *Diaporthe* species occurring on soybean in Croatia. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 27, n. 1, p. 9-19, 2011.

SARR, Mame P. *et al.* Genetic diversity in *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 53, n. 2, p. 250, 2014.

SAXENA, A. Kumar *et al.* *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. **Journal of applied microbiology**, v. 128, n. 6, p. 1583-1594, 2020.

SHALI, Abbas *et al.* *Bacillus pumilus* SG2 chitinases induced and regulated by chitin, show inhibitory activity against *Fusarium graminearum* and *Bipolaris sorokiniana*. **Phytoparasitica**, v. 38, n. 2, p. 141-147, 2010.

SHAMRAO, MADKE MEGHA. **Macrophomina phaseolina (Charcoal Rot) IN SOYBEAN**. 2020. Tese de Doutorado. DR. PANJABRAO DESHMUKH KRISHI VIDYAPEETH.

SHIRAI, Miwa; EULGEM, Thomas. Molecular interactions between the soilborne pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* and its host plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1264569, 2023.

SILVA, Vera *et al.* Pesticide residues in European agricultural soils—A hidden reality unfolded. **Science of the Total Environment**, v. 653, p. 1532-1545, 2019.

SMITH, Tyler M.; KELLY, Heather Y.; LAMOUR, Kurt H. Detection of the G143A mutation in the cytochrome b gene of *Corynespora cassiicola* isolates from soybean in Tennessee. **Plant Health Progress**, 22(4), p. 570-572, 2021.

SURESHBABU, Bijula Mankara *et al.* Greenhouse Results Suggest that Disease Severity in Soybean (*Glycine max*), Caused by *Diaporthe longicolla* as Both a Stem and Seed Pathogen, May Not Be Correlated. **Plant Health Progress**, v. 26, n. 1, p. 12-19, 2025.

SWARNAKAR, Shambhu; CHAKRABORTY, Arka Pratim. *Bacillus pumilus*: a potent IAA producing plant growth-promoting rhizobacteria with In Vitro PGP traits and antagonism against *Fusarium equiseti*. **Discover Plants**, v. 2, n. 1, p. 183, 2025.

TAO, Huaping *et al.* The toxicity and health risk of chlorothalonil to non-target animals and humans: a systematic review. **Chemosphere**, p. 142241, 2024.

TARIQ, Mohsin *et al.* Biocontrol efficacy of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus amyloliquefaciens* against rice pathogens. **PeerJ**, v. 13, p. e18920, 2025.

THAKUR, R. P.; REDDY, Belum VS; MATHUR, Kusum. Screening techniques for sorghum diseases. Information: Bulletin No. 76. **International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics**, 2007.

THOMPSON, S. M. *et al.* Green and brown bridges between weeds and crops reveal novel *Diaporthe* species in Australia. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 35, n. 1, p. 39-49, 2015.

TORAL, Laura *et al.* Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus* XT1 CECT 8661 against *Botrytis cinerea*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1315, 2018.

TORRES, María Julia *et al.* Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. **Microbiological research**, v. 182, p. 31-39, 2016.

TUPAKI-SREEPURNA, Ananya; KINDO, Anupma Jyoti. *Fusarium*: The versatile pathogen. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 8-17, 2018.

UDAYANGA, Dhanushka *et al.* The *Diaporthe sojae* species complex: Phylogenetic re-assessment of pathogens associated with soybean, cucurbits and other field crops. **Fungal Biology**, v. 119, n. 5, p. 383-407, 2015.

UDAYANGA, Dhanushka *et al.* The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. **Fungal diversity**, v. 50, p. 189-225, 2011.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Foreign Agricultural Service. *World Agricultural Production – Circular Série WAP 08-25*. Washington, D.C.: U.S. Department of Agriculture, 2025. Disponível em: <https://www.fas.usda.gov/data/world-agricultural-production-08122025>. Acesso em: 08 set. 2025.

VAN DEN BOSCH, Frank *et al.* Identifying when it is financially beneficial to increase or decrease fungicide dose as resistance develops: an evaluation from long-term field experiments. **Plant Pathology**, v. 69, n. 4, p. 631-641, 2020.

VERMA, Rajshree *et al.* Emerging threat to Indian agriculture: *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex as a novel pathogen imperiling bajra, cowpea, finger millet, green gram, moth bean, and soybean crops. **Crop Protection**, v. 182, p. 106741, 2024.

VILLANI, Alessandra *et al.* A polyphasic approach for characterization of a collection of cereal isolates of the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex. **International Journal of Food Microbiology**, v. 234, p. 24-35, 2016.

VOZNIUK, S. V. *et al.* Formation and functioning of symbiotic systems and rhizosphere microbiocenosis of soybean under various fungicides application. **Mikrobiolohichnyi Zhurnal** (Kiev, Ukraine: 1993), v. 78, n. 4, p. 59-70, 2016.

WANG, M. M. *et al.* *Fusarium incarnatum-equiseti* complex from China. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 43, n. 1, p. 70-89, 2019.

WANG, Yuhe *et al.* Genome-Wide Association Study and Marker Development for *Fusarium oxysporum* Root Rot Resistance in Soybean. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 23, p. 12573, 2024.

WISE, Cody *et al.* Cellular lipid composition affects sensitivity of plant pathogens to fengycin, an antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* strain CU12. **Phytopathology**, v. 104, n. 10, p. 1036-1041, 2014.

WOLFENDER, Jean-Luc *et al.* Accelerating metabolite identification in natural product research: toward an ideal combination of liquid chromatography–high-resolution tandem mass spectrometry and NMR profiling, in silico databases, and chemometrics. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 704-742, 2018.

WRATHER, J. Allen *et al.* Soybean disease loss estimates for the top 10 soybean producing countries in 1994. **Plant disease**, v. 81, n. 1, p. 107-110, 1997.

YANG, Chao *et al.* Fungicide: modes of action and possible impact on nontarget microorganisms. **International Scholarly Research Notices**, v. 2011, n. 1, p. 130289, 2011.

YANG, Xiaowen *et al.* Metabolic response of *Bacillus* spp. to heavy metal stress: pathway alterations and metabolite profiles. **Biotechnology Letters**, v. 47, n. 3, p. 50, 2025.

YU, Chenjie *et al.* Profiling of antimicrobial metabolites synthesized by the endophytic and genetically amenable biocontrol strain *Bacillus velezensis* DMW1. **Microbiology Spectrum**, v. 11, n. 2, p. e00038-23, 2023.

YU, Futian *et al.* Effects of branched-chain amino acids on surfactin structure and antibacterial activity in *Bacillus velezensis* YA215. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 9, p. 281, 2024.

ZHANG, Jiale *et al.* Derivation of ecological safety thresholds and risk assessment of new SDHI fungicides in farmland system. **Science of The Total Environment**, v. 954, p. 176773, 2024.

ZHAO, Lin *et al.* Evaluation of pathogenic *Fusarium* spp. associated with soybean seed (*Glycine max*) in Hubei Province, China. **Plant Disease**, v. 106, n. 12, p. 3178-3186, 2022a.

ZHAO, Xiaolin *et al.* *Diaporthe* diversity and pathogenicity revealed from a broad survey of soybean stem blight in China. **Plant Disease**, v. 106, n. 11, p. 2892-2903, 2022b.