

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Produção de taxtomina e outros metabólitos por *Streptomyces* spp. e seu uso potencial no controle da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) em soja

Lucas Emídio da Silva

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba
2024**

Lucas Emídio da Silva
Bacharel em Agronomia

Produção de metabólitos por *Streptomyces* spp. e seu uso potencial no controle da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) em soja

versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Silva, Lucas Emídio da

Produção de metabólitos por *Streptomyces* spp. e seu uso potencial no controle da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) em soja / Lucas Emídio da Silva. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2024.

74 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Controle biológico 2. Controle alternativo 3. *Streptomyces* 4. Ferrugem-asiática-da-soja 5. Fitotoxinas 6. Metabólitos I. Título

DEDICATÓRIA

A Deus por sempre me guiar e colocar boas pessoas em meu caminho.

Aos meus pais Maria Aparecida da Silva e Cícero Emídio da Silva por sempre me inspirarem e apoiarem nesta longa jornada, tanto nas alegrias quanto nas dificuldades.

A minha namorada Amanda Rose Alcântara, por todo suporte, afeto e colaboração para meu desenvolvimento.

A todos vocês, carinhosamente dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por tornar este trabalho possível, assim como sempre me guiar para escolha das decisões e ações corretas.

Agradeço ao professor Sérgio Florentino Pascholati pela dedicação, atenção e paciência ao longo dos ensinamentos e orientação, tornando possível a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos (ESALQ/USP), especialmente a Maria Antonia Calori Domingues (Tota) pela colaboração intelectual e disponibilização de equipamento para análises dos experimentos.

Aos meus pais que são meu alicerce, que sempre confiaram, apoiaram e tornaram possível minha trajetória ao longo destes anos, sem vocês nada seria.

A minha namorada por sempre compreender e apoiar meu trabalho, sempre esteve ao meu lado, seja em momentos bons ou ruins.

A todos os colegas de estudos Sabrina Holz, Dablieny Garcia, Cristiane Lurdes Paloschi, Natália Gabriele Mafra Cataleta, Marta Rodrigues de Oliveira, Jonathan Rodríguez Guerrero e Aline Nunes, que contribuíram seja para o desenvolvimento dos experimentos ou com sugestões enriquecedoras, além dos ótimos momentos a qual passamos juntos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

A todos vocês fica os meus mais sinceros agradecimentos.

EPIGRAFE

“Um dia você deixará este mundo para trás.

Por isso, viva uma vida que você vai se lembrar”

Avicii

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças.”

Charles Darwin

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 A cultura da soja.....	17
2.2 A ferrugem-asiática da soja.....	18
2.3 Indução de resistência.....	20
2.4 <i>Streptomyces</i> & fitotoxinas.....	22
2.5 Taxtomina: Condições físicas e nutricionais para produção.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Obtenção dos isolados de <i>Streptomyces</i> spp.	27
3.2 Obtenção dos filtrados de <i>Streptomyces</i> spp.....	27
3.3 Efeito da agitação e luminosidade sobre a biomassa e produção de metabólitos por isolados de <i>Streptomyces</i> spp.....	28
3.4 Efeito da composição nutricional de meio líquido sobre a produção de metabólitos.....	28
3.5 Purificação parcial, visualização e quantificação da taxtomina A.....	28
3.6 Experimentos <i>in vitro</i>	30
3.6.1 Obtenção e preparo de minitubérculos.....	30
3.6.2 Efeito dos filtrados sobre tubérculos de batata.....	30
3.6.3 Efeito dos filtrados sobre a germinação de esporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	31
3.7 Experimentos <i>in planta</i>	31
3.7.1 Obtenção e manutenção de plantas de soja.....	31
3.7.2 Obtenção e manutenção do inóculo de <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	32
3.7.3 Bioensaio taxtomina A comercial x <i>Phakopsora pachyrhizi</i> em soja.....	32
3.7.3.1 Seleção do solvente.....	32
3.7.3.2 Efeito da taxtomina A comercial aplicada em plantas de soja contra <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	32
3.8 Bioensaio filtrado x <i>Phakopsora pachyrhizi</i> em soja.....	33
3.8.1 Teste de fitotoxicidade do filtrado em folhas de soja.....	33

3.8.2 Efeito do filtrado na severidade e em respostas bioquímicas em plantas de soja contra <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	33
3.9 Análises bioquímicas.....	34
3.9.1 Preparo do extrato enzimático.....	34
3.9.2 Quantificação de proteínas totais.....	34
3.9.3 Atividade de guaiacol peroxidase.....	34
3.9.4 Atividade da beta-1-3-glucanase.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1 Efeito da agitação e luminosidade sobre a biomassa de isolados de <i>Streptomyces</i> spp.....	37
4.2 Efeito da agitação e luminosidade sobre a produção de metabólitos por isolados de <i>Streptomyces</i> spp.....	39
4.3 Efeito da agitação, luminosidade e composição nutricional do meio líquido sobre a produção de metabólitos.....	45
4.4 Efeito dos filtrados sobre tubérculos de batata.....	46
4.5 Efeito dos filtrados sobre a germinação de esporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	49
4.6 Bioensaio taxtomina A comercial x <i>Phakopsora pachyrhizi</i> em soja.....	51
4.6.1 Seleção do solvente.....	51
4.6.2 Efeito da taxtomina A comercial aplicada em plantas de soja contra <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	52
4.7 Bioensaio filtrados x <i>Phakopsora pachyrhizi</i> em soja.....	54
4.7.1 Teste de fitotoxicidade dos filtrados em folhas de soja.....	54
4.7.2 Efeito do filtrado na severidade e em respostas bioquímicas em plantas de soja contra <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	55
4.7.2.1 Severidade.....	55
4.7.2.2 Análises bioquímicas.....	57
5. CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS.....	62
APÊNDICES.....	74

RESUMO

Produção de metabólitos por *Streptomyces* spp. e seu uso potencial no controle da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) em soja

O controle biológico/alternativo vem ganhando cada vez mais espaço na agricultura, a busca por formas sustentáveis e menos danosas ao meio ambiente e ao ser humano se tornou um assunto recorrente e de grande importância no âmbito agrícola. Dentre os múltiplos métodos de controle biológico/alternativo, o uso de metabólitos produzidos por microrganismos é um vasto campo a ser explorado, devido à diversidade de microrganismos produtores e à riqueza de substâncias por eles produzidos, devendo aqui ser citada as actinobactérias do gênero *Streptomyces*, produtoras de diversas substâncias já catalogadas e de outras ainda desconhecidas com alto potencial de uso. A ferrugem-asiática-da-soja (*Phakopsora pachyrhizi*), é considerada o patógeno mais importante para a sojicultura mundial, acarretando prejuízos expressivos, devido às perdas em produtividade e aos altos gastos com controle químico. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de metabólitos por diferentes isolados de *Streptomyces* spp. e avaliar o potencial de seus filtrados no controle da ferrugem-asiática-da-soja. Os isolados foram produzidos em meio aveia líquido, submetidos a diferentes agitações e presença/ausência de luz, em sequência seus filtrados foram aplicados sobre discos de tubérculo de batata, a fim de avaliar sua atividade biológica. Os isolados que apresentaram melhores resultados foram selecionados e cultivados em diferentes meios de cultura: Aveia, carboximetil celulose, carboximetil celulose + glicose e casca de batata + glicose, a fim de comparar seus efeitos sobre a produção de metabólitos. Posteriormente, os filtrados de cada isolado foram avaliados por métodos cromatográficos e uma nova seleção entre os isolados foi realizada baseando-se em uma fitotoxina pura aplicada à avaliação. Os isolados selecionados foram aplicados sobre uredíniosporos de *P. pachyrhizi* a fim de avaliar seu potencial inibitório de germinação *in vitro*. Paralelamente, foram pulverizados em plântulas de soja em casa de vegetação, para avaliar seu potencial de controle direto e indireto sobre a severidade da doença *in planta*. Os resultados demonstraram que não há diferenças na produção de metabólitos quando alteradas as condições de agitação, presença de luz, assim como tampouco com os diferentes meios de cultura testados. Os isolados 1901, 1903 e 1926 foram os que apresentaram maior atividade biológica sobre os discos de tubérculos de batata. Nos testes cromatográficos, nenhum dos isolados demonstrou ter taxtomina (fitotoxina usada para comparação na avaliação), porém os isolados 1901, 1909 e 1926 apresentaram substâncias com tempo de retenção similar a esta. Quando aplicados sobre os uredíniosporos de *P. pachyrhizi*, os isolados 1901 e 1909 se destacaram apresentando maior efeito inibitório sobre sua germinação. Por fim, ambos apresentaram efeito positivo no controle da severidade da doença, diminuindo-a, sendo o isolado 1909, o de maior destaque. Conclui-se que nem todos os isolados de *Streptomyces* avaliados são produtores de metabólitos com atividade biológica e dentre os que os produzem, todos são capazes de inibir a germinação dos uredíniosporos *in vitro*, assim como reduzem a severidade da doença *in planta*.

Palavras-chave: Controle biológico, Controle alternativo, Actinomicetos, Ferrugem-asiática-da-soja, Fitotoxinas, Filtrados

ABSTRACT

Production of metabolites by *Streptomyces* spp. and its potential use in the control of Asian rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybean

Biological/alternative control has been gaining more and more space in modern agriculture, the search for sustainable ways, less harmful to the environment and human beings has become a recurring subject of great importance in the agricultural field. Among the multiple methods of biological/alternative control, the use of metabolites produced by microorganisms is a vast field to be explored, due to the diversity of microorganisms produced and the richness of substances produced by them, here, actinobacterias of the genus *Streptomyces*, must be mentioned, producer of several valuable substances already cataloged and others still unknown with high potential for use. Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) is considered the most important pathogen for world soybean production, resulting in significant losses due to productivity losses and high expenses with chemical control. The objective of this work was to evaluate the production of metabolites by different isolates of *Streptomyces* spp. and to evaluate the potential of its filtrates in controlling Asian soybean rust. The isolates were produced in liquid oat medium, subjected to different agitation and presence/absence of light, in sequence their filtrates were applied on potato tuber discs, in order to evaluate their biological activity. The isolates that showed the best results were selected and cultivated in different culture media: Oats, carboxymethyl cellulose, carboxymethyl cellulose + glucose and potato peel + glucose, in order to compare their effects on the production of metabolites. Subsequently, the filtrate of each isolate were evaluated by chromatographic methods and a new selection among the isolates was performed based on a pure phytotoxin applied to the evaluation, the selected ones were applied on urediniospores of *Phakopsora pachyrhizi* in order to evaluate their *in vitro* germination inhibitory potential and sprayed on soybean seedlings in a greenhouse, to evaluate their potential for direct and indirect control over the severity of the pathogen *in the planta*. The results showed no difference in the production of metabolites due to changes in agitation, presence of light and culture medium. The isolates 1901, 1903 and 1926 were the ones that showed the highest biological activity on potato tuber discs. In the chromatographic tests, none of the isolates showed thaxtomin (phytotoxin used for comparison in the evaluation), but isolates 1901, 1909 and 1926 showed substances with retention time similar to this one, when applied on spores of *Phakopsora pachyrhizi*, isolates 1901 and 1909 stood out with a greater inhibitory effect on their germination. Finally, both showed a positive effect in controlling the disease severity, with isolate 1909 being the most prominent. It is concluded that not all *Streptomyces* isolates are producers of metabolites with biological activity, among which the adopted ones are all capable of inhibiting the germination of urediniospores *in vitro*, as well as the severity of the disease *in planta*.

Keywords: Biological control, Alternative control, *Streptomyces*, Asian soybean rust, Phytotoxins, Metabolites

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Face adaxial (A) e abaxial (B) de folhas de soja infectadas por *Phakopsora pachyrhizi*.....19
- Figura 2- Biomassa (g) dos isolados após cinco dias em 100 RPM de agitação na presença ou ausência de luz. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (maiúscula - fator luminosidade, minúscula - fator agitação) pelo teste de Tukey a 5%.. 38
- Figura 3- Biomassa (g) dos isolados após cinco dias em 150 RPM de agitação na presença ou ausência de luz. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (maiúscula - fator luminosidade, minúscula - fator agitação) pelo teste de Tukey a 5%.. 38
- Figura 4- Biomassa (g) dos isolados após cinco dias em 100 RPM ou 150 RPM de agitação na presença ou ausência de luz. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (maiúscula - fator luminosidade, minúscula - fator agitação) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As barras nas colunas representam o erro padrão.....39
- Figura 5- Cromatografia de camada delgada (TLC) da taxtomina A comercial (A), 1901 a 100 RPM com luz (B), 1926 a 150 RPM com luz (C), 1901 a 150 RPM sem luz (D), IB2507 a 150 RPM com luz (E), 1903 a 100 RPM com luz (F), 1903 a 150 RPM com luz (G), 1901 a 150 RPM com luz (H) e 1903 a 100 RPM sem luz (I) visualizada sob luz natural..... 41
- Figura 6- Cromatografia de camada delgada (TLC) da taxtomina A comercial (A), 1901 a 100 RPM com luz (B), 1926 a 150 RPM com luz (C), 1901 a 150 RPM sem luz (D), IB2507 a 150 RPM com luz (E), 1903 a 100 RPM com luz (F), 1903 a 150 RPM com luz (G), 1901 a 150 RPM com luz (H), 1903 a 100 RPM sem luz (I), IB2507 a 150 RPM sem luz (J), 1906 a 100 RPM sem luz (K), 1926 a 150 RPM sem luz (L), 1909 a 150 RPM com luz (M) e 1909 a 150 RPM sem luz (N) visualizada sob comprimento de onda de 254nm..... 41
- Figura 7- Curva analítica da concentração de taxtomina A por unidades de área determinada por cromatografia líquida de alta pressão (CLAE).....43
- Figura 8- Cromatogramas obtidos dos isolados de *Streptomyces* no detector DAD – HPLC. a) Isolado 1901. b) Isolado 1909. c) Isolado 1926.....44
- Figura 9- Espectro dos isolados de *Streptomyces* 1901 (a) 1909 (b) e 1926 (c) obtido no detector DAD. 44
- Figura 10- Efeito da agitação e luminosidade na absorbância de filtrados de *Streptomyces* spp. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As barras nas colunas representam o erro padrão.....46

- Figura 11- Efeito de aveia (AV), carboximetil celulose (CMC), Carboximetil celulose mais glicose (CMC + G) e casca de batata (CB) na absorvência de filtrados de *Streptomyces* spp. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (maiúscula – Entre isolados, minúscula – Entre meios de cultura) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As barras nas colunas representam o erro padrão.....46
- Figura 12- Discos de tubérculos 24 horas após aplicação de controles (A e E), filtrados 1926 (B), 1901 (C), 1913 (D), 1903 (F), 1909 (G), 1906 (H) e IB2507 (I).....47
- Figura 13- Discos de tubérculos 96 horas após aplicação dos controles (A) e dos filtrados 1901 (B), 1903 (C), 1906 (D), 1909 (E), 1913 (F), 1926 (G) e IB2507 (H)..... 48
- Figura 14- Urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi* após 6 horas em contato com água (A) e filtrado 1901 em concentração de 25% (B)..... 50
- Figura 15- Efeito da aplicação de Dimetil sulfoxido (A), etanol (B) e metanol (C) nas concentrações de 100% em folhas de soja.....52
- Figura 16- Fitotoxidez em trifólio “V2” de soja, sete dias após a aplicação de taxtomina A nas concentrações de 2,5 µg/mL (A), 10 µg /mL (B) e 50 µg /mL (C)..... 52
- Figura 17- Fitotoxidez em trifólio “V2” de soja, 12 dias após a aplicação de taxtomina A nas concentrações de 2,5 µg/mL (A), 10 µg /mL (B) e 50 µg /mL (C)..... 53
- Figura 18- Severidade em trifólio “V1” de soja, 18 dias após a aplicação de taxtomina A nas concentrações de 2,5 µg /mL (A), 10 µg /mL (B) e 50 µg /mL (C). Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As barras nas colunas representam o erro padrão.....53
- Figura 19- Efeito de filtrado 1901 nas concentrações de 100% (A), 75% (B), 50% (C) e 25% (D), durante e cinco dias após a aplicação.....55
- Figura 20- Severidade em trifólio “V1” de soja, 12 dias após a aplicação dos filtrados dos isolados 1901 e 1909 nas concentrações de 2,5% (v/v) e 10% (v/v). Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As barras nas colunas representam o erro padrão.....56
- Figura 21- Teor de clorofila em trifólio “V1” de soja, 12 dias após a aplicação dos filtrados dos isolados 1901 e 1909 nas concentrações de 2,5% (v/v) e 10% (v/v). Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As barras nas colunas representam o erro padrão.....57
- Figura 22- atividade de guaiacol peroxidase quantificada em folhas de soja mantidas em casa de vegetação e pulverizadas com diferentes filtrados e inoculação de urediniósporos de *P. pachyrizhi* 72 horas após aplicação dos tratamentos..... 58
- Figura 23- atividade de beta-1-3-glucanase quantificada em folhas de soja mantidas em casa de vegetação pulverizadas com diferentes filtrados e inoculação de *P. pachyrizhi* 72 horas após aplicação dos tratamentos..... 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fator de retenção obtido para a taxtamina A e para os filtrados avaliados.....	40
Tabela 2 - Porcentagem de discos de tubérculos necrosados e grau de necrose 96 horas após a aplicação dos filtrados de <i>Streptomyces</i> spp.....	48
Tabela 3 - Porcentagem de urediniósporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> germinados após 6 horas de contato direto com filtrados dos isolados 1901, 1909 e 1926 nas concentrações de 100, 75, 50 e 25%.....	51

1. INTRODUÇÃO

A população mundial tende a chegar a dez milhões de pessoas até 2050, atrelado a este crescimento acelerado e contínuo, há a necessidade de aumento na produção de alimentos, um grande desafio devido à limitação de área disponível para cultivo e aos problemas fitossanitários que afetam a produção agrícola, como pragas e doenças (FAO, 2017). Em relação à expansão das fronteiras agrícolas, buscam-se alternativas devido às restrições (SAATH, FACHINELLO, 2018), além das preocupações com o meio ambiente, como a diminuição na biodiversidade (WU et al, 2014). Em função da limitação de terras cultivadas, a opção mais viável torna-se aumentar a produção por área, diminuir suas possíveis perdas e causar menos danos ao meio ambiente, de uma forma que seja economicamente viável (FAO, 2017).

A agricultura atual conta com diversas ferramentas que colaboram para melhorar a sanidade das plantas, como o uso intensivo de defensivos agrícolas que contribuem para o alcance de grandes produtividades nas mais variadas culturas (OERKE, 2006; POPP *et al*, 2013). Mesmo com expressivos ganhos em produção, os defensivos agrícolas químicos também apresentam desvantagens, como a pressão de seleção de patógenos e insetos praga resistentes, acarretando na inefetividade do produto aplicado ou em aumento na frequência e na dose aplicada para se obter sucesso no controle, o que pode afetar diretamente a saúde humana e o meio ambiente, além da geração de resíduos no solo e eliminação de insetos considerados inimigos naturais de outros insetos pragas (POPP *et al*, 2013).

O agronegócio é um setor de grande importância para o Brasil, representando 25,5% do PIB em 2022 (CNA, CEPEA, 2022). Dentre as culturas de grande importância econômica e social está a soja (*Glycine max*), o Brasil se destaca na produção desta leguminosa, com uma estimativa em torno de 312,5 milhões de toneladas na safra 2022/2023 (CONAB, 2020). Entre os limitantes da produtividade desta cultura está a doença conhecida como ferrugem-asiática da soja, causada pelo fungo basidiomiceto *Phakopsora pachyrhizi*, um parasita biotrófico identificado pela primeira vez no país em 2001 no Paraná (YORINORI *et al*, 2004).

Após sua entrada, a ferrugem asiática se espalhou rapidamente pelo Brasil, tornando-se uma das principais doenças da cultura, sendo capaz de reduzir 90% da produção, devido a sua alta eficiência de disseminação pelo vento e presença de hospedeiro durante grande parte do ano (KASHIWA *et al.*, 2020). Os sintomas iniciais da doença são pequenas lesões foliares, de coloração castanha a marrom-escura na abaxial da folha, onde é possível observar urédias que se rompem e liberam os urediniosporos. Plantas severamente infectadas apresentam desfolha precoce, o que compromete a formação, enchimento de vagens e o peso final do grão (HARTMAN *et al.*, 2015; GODOY *et al.*, 2018).

O controle da doença atualmente se faz a partir da integração de medidas de controle cultural, genético e químico. O controle cultural baseia-se na adoção do vazio sanitário, visando retardar a

ocorrência da doença e o escape a partir do uso de variedades precoces. O controle genético consiste no uso de variedades com resistência genética à doença, porém, ainda são poucas as cultivares resistentes à ferrugem-asiática da soja. E por fim o controle químico, com a aplicação de fungicidas, sendo esta a prática mais adotada para o controle da doença, porém o patógeno tem demonstrado redução da sensibilidade a diferentes grupos químicos e, inevitavelmente, a dosagem destes defensivos vem sendo aumentada, o que pode ser um grande risco de torná-los ineficientes devido à pressão de seleção exercida sobre o patógeno (GODOY *et al.*, 2018; GODOY *et al.*, 2020).

Levando-se em conta as dificuldades no manejo da doença e do potencial impacto e desequilíbrio ambiental gerado com uso excessivo de defensivos agrícolas químicos, é necessária a busca por métodos de controle que possam ser tão efetivos quanto estes e causar menos danos tanto ao ambiente quanto a seu aplicador, o que pode ser alcançado com o uso da indução de resistência, que consiste na ativação de respostas defensivas da planta à patógenos a partir do uso de substâncias elicitoras, podendo esta ser de origem biótica ou abiótica (O'BRIEN, 2017; WALTERS *et al.*, 2013).

A fim de se defenderem do ataque dos patógenos, as plantas utilizam mecanismos estruturais ou bioquímicos, podendo estes serem constitutivos (já presente na planta antes do contato com patógeno), como fenóis, alcaloides, lactonas, terpenoides, peptídeos e proteínas, ou pós-formados (ausentes ou presente em baixas concentrações, sendo ativados após contato com o patógeno) envolvendo espécies reativas de oxigênio, fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese. A forma como ambos os mecanismos interferem na relação entre patógeno e hospedeiro varia, podendo atuar em diferentes fases do ciclo e de formas diferentes em função da idade da planta e tecido afetado (PASCHOLATI, DALIO, 2018).

A manipulação dos mecanismos de defesa das plantas é uma estratégia alternativa em potencial, alguns compostos inorgânicos, extratos de microrganismos, algas e de plantas já se mostraram efetivos na ativação desses mecanismos no controle de doenças e insetos pragas (BOUBAKRI, 2020). Como exemplos, pode ser citado a indução de resistência em soja pelo uso do extrato de alecrim para o controle de *Macrophomina phaseolina* e a aplicação de diferentes fosfitos no controle de *P. pachyrizhi* (LORENZETTI, *et al.* 2018; BRUZAMARELLO, *et al.* 2018).

Por tratar-se da ativação de mecanismos de defesa inerente às plantas, a indução de resistência pode apresentar grandes vantagens de uso em relação a fitopatógenos, como a sistemicidade na proteção, durabilidade, ausência de especificidade e potencial de pré-condicionar a planta contra a subsequente infecção por patógenos, característica chamada de “*Priming*” (PASCHOLATI, DALIO, 2018).

Dentre os ativadores bióticos para indução de resistência estão as fitotoxinas, metabólitos secundários de baixo peso molecular produzidos por microrganismos, capazes de alterar ou causar a morte das células vegetais em concentrações baixas (BERESTETSKIY, 2008). Bactérias do gênero *Streptomyces* são produtoras de uma ampla gama de substâncias bioativas, que podem ser utilizadas para o controle de diversos agentes fitopatogênicos, principalmente os fungos (LAW *et al.*, 2017), o que

lhe confere grande destaque e importância na pesquisa de potenciais biofungicidas/indutores de resistência, a taxtomina é uma das fitotoxinas produzida por espécies do gênero *Streptomyces*, e está ligada a seu mecanismo de patogenicidade.

A taxtomina apresenta tóxicos a nível celular em concentrações abaixo de 1 μ M, inibindo a síntese de celulose e promovendo a hipertrofia e morte das células vegetais. Em doses elevadas pode levar à morte do tecido vegetal, o que demonstra seu potencial como bioherbicidas (LORIA, *et al.* 1997; BISCHOFF *et al.* 2009). Por outro lado, alguns estudos mostraram que esta mesma fitotoxina tem propriedades eliciadoras colaborando para a indução de resistência contra agentes fitopatogênicos (GARCIA, 2008; BRAND, 2016).

Ainda que a taxtomina apresente alto potencial para diversos usos na agricultura, seu uso em larga escala ainda se apresenta inviável, devido à baixa quantidade produzida por isolados naturais de *Streptomyces* spp. e elevado custo da produção sintética da molécula (LI, *et al.* 2021). Desta forma a busca por métodos que aumentem a produção da referida fitotoxina a partir de isolados de *Streptomyces* spp. torna-se importante, a fim de viabilizar seu uso na agricultura.

Tendo em vista os fatores limitantes ligados à viabilidade do uso da taxtomina na agricultura, assim como os problemas da produtividade de soja gerado pela ferrugem-asiática, e a preocupação da sociedade devido o uso irracional dos defensivos químicos na agricultura, métodos alternativos de controle se mostram importantes no panorama atual. Desta forma, objetivou-se com este trabalho avaliar o uso do princípio ativo da taxtomina A comercial e filtrados de meio de cultura de isolados de *Streptomyces* ssp. como indutor de resistência em plantas de soja para o controle da ferrugem-asiática e otimizar a produção de metabólitos a partir de alterações em requerimentos físicos e nutricionais do microrganismo produtor. Os objetivos específicos envolveram: a) Avaliar diferentes requisitos físicos e nutricionais para maior produção de metabólitos por diferentes isolados de *Streptomyces* spp. em meio de cultura complexo; b) Avaliar a severidade da necrose gerada pela taxtomina A comercial aplicada em minitubérculos de batata; c) Avaliar efeito do filtrado de isolados de *Streptomyces* spp. na germinação de esporos de *Phakopsora pachyrhizi in vitro*; d) Avaliar o potencial de indução de resistência da taxtomina A comercial e do filtrado de isolados de *Streptomyces* spp. no controle de *Phakopsora pachyrhizi in planta*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da soja

A soja [*Glycine max* (L.) Merr.], pertencente à ordem Fabales, família Fabaceae, é uma planta com hábito de crescimento ereto, herbáceo e anual, apresenta uma raiz principal de onde são geradas um grande número de raízes secundárias, ambas importantes para a formação de nódulos a partir de simbiose com bactérias, colaborando para a fixação de nitrogênio (MASCARENHAS et al., 2005) A soja apresenta três tipos de folhas durante seu desenvolvimento: folhas cotiledonares que surgem após a emergência, seguido de um par de folhas primárias simples (unifoliadas) e por fim folhas trifoliadas, sendo estas últimas formadas durante todo o desenvolvimento da planta (CHUNG, SINGH, 2008; KOESTER *et al*, 2014).

O ciclo da cultura da soja é dividido em duas fases, denominadas fase vegetativa e reprodutiva, a fase vegetativa inicia-se após a germinação da semente e dura até o surgimento da primeira flor, quando é iniciada a fase reprodutiva a qual se encerra com a colheita (FEHR, CAVINESS, 1977). A duração de cada estágio pode mudar em função da variedade da soja e condições climáticas (NLEYA *et al.*, 2019). A soja pode apresentar dois hábitos de crescimento: determinado ou indeterminado. Cultivares de crescimento determinado apresentam a característica de cessar seu desenvolvimento vegetativo quando entram em estágio reprodutivo, enquanto que cultivares indeterminados apresentam fases vegetativas e reprodutivas simultaneamente (NLEYA *et al.*, 2019).

A produção de soja é a atividade agropecuária de maior crescimento ao longo dos anos, além de ser uma cultura de grande importância econômica mundial, é o quarto grão mais produzido no mundo, ficando atrás apenas do milho, trigo e o arroz. 90% da produção mundial desta oleaginosa é destinada para produção de farelo de soja, utilizado como constituinte de ração animal e óleo de soja para consumo humano, enquanto o restante é utilizado para geração de biodiesel e outros produtos industriais (HIRAKURI, LAZZAROTTO, 2014; GAONKAR, ROSENTRATER, 2019).

O Brasil tem grande destaque na sojicultura mundial, sendo o país com maior produção deste grão, é estimado que durante a safra 2022/2023 a produção alcance aproximadamente 152 milhões de toneladas (CONAB, 2021). Devido a avanços tecnológicos, manejo e eficiência dos produtores, o Brasil comparado à safra anterior – 2020/2021 – ampliou a área plantada de soja em 3,4%, atingindo um total de 42.9 milhões de hectares, aumentou a produtividade em 17,4% e teve crescimento de 21,3% na produção, sendo a região centro-oeste, a maior produtora da cultura no país (CONAB, 2021).

Assim como todas plantas cultivadas, a soja pode ter sua produtividade e qualidade de produto final afetada por diversos problemas fitossanitários, dentre eles estão problemas com a qualidade fisiológica e sanitária das sementes, nematóides (*Heterodera glycine*, *Meloidogyne* spp., *Pratylenchulus brachyurus* e *Rotylenchulus reniformis*) e doenças como a ferrugem-asiática

(*Phakopsora pachyrhizi*) que pode causar perdas de 10% a 90% na produtividade (JUHÁNSZ *et al.*, 2013).

2.2 A ferrugem-asiática da soja

A ferrugem-asiática é considerada a principal doença foliar da cultura da soja, trata-se de um fungo parasita obrigatório pertencente ao filo Basidiomycota, ordem Uredinales e família Phakopsoraceae, sendo o agente causal denominado *Phakopsora pachyrhizi*. O mesmo foi relatado pela primeira vez no Japão em 1903 e no Brasil na safra de 2001, gerando grandes perdas de produção nas safras subsequentes (YORINARI *et al.*, 2004; PELIN, *et al.*, 2020). Até o momento mais de 150 espécies foram identificadas como plantas hospedeiras de *P. pachyrhizi* (SLAMINKO *et al.*, 2008), porém no Brasil a principal fonte de inóculo é o cultivo contínuo de soja entre safras e a presença de plantas voluntárias (YORINARI *et al.*, 2004).

Os sintomas iniciais são pequenas lesões escuras que ocorrem principalmente nas folhas baixas e posteriormente aparecem em folhas superiores e outros órgãos da planta, ao longo de seu desenvolvimento. As folhas infectadas ficam cloróticas (Figura 1), secam e caem, o principal dano causado pela doença é a desfolha precoce, afetando diretamente a formação e enchimento das vagens (GODOY *et al.*, 2016; CAGLIARI, 2019). Todas as partes da planta acima do solo podem ser afetadas, principalmente as folhas, indiferente de seu estágio fenológico, porém a maior incidência é notada próximo aos estádios reprodutivos, devido à formação de um microclima favorável e sombreamento, protegendo os esporos contra radiação UV (ISARD *et al.*, 2006). A partir das lesões são produzidas urédias de coloração castanha, as urédias são responsáveis por produzir os urediniosporos que são os causadores das epidemias. As lesões podem ser vistas em ambas as faces das folhas, e afetam a capacidade fotossintética da planta, levando à diminuição em seu desenvolvimento e consequentemente diminuição na produção (PELIN *et al.*, 2020).

O ciclo primário da doença se inicia com a disseminação de urediniosporos de plantas voluntárias (fonte de inóculo primária), a qual ocorre principalmente pelo vento, levando à deposição destes esporos nas folhas da soja. Posteriormente, se dá início ao processo de germinação com a produção do tubo germinativo e seu desenvolvimento até formar-se o apressório, do qual é formado a hifa de penetração que irrompe nos tecidos da planta via estômatos ou epiderme (PELIN *et al.*, 2020). O processo de germinação ocorre em temperaturas que variam desde 8 até 36°C, com uma faixa ótima entre 19 e 24 °C (ALVES *et al.*, 2006). Para o sucesso da infecção é necessário um período mínimo de molhamento de seis horas e temperatura próximo a 28 °C, quanto mais próximo a esta temperatura, menor é o intervalo até início da esporulação (FURTADO *et al.*, 2011; ALVES, *et al.*, 2006; SALVADORI *et al.*, 2016).

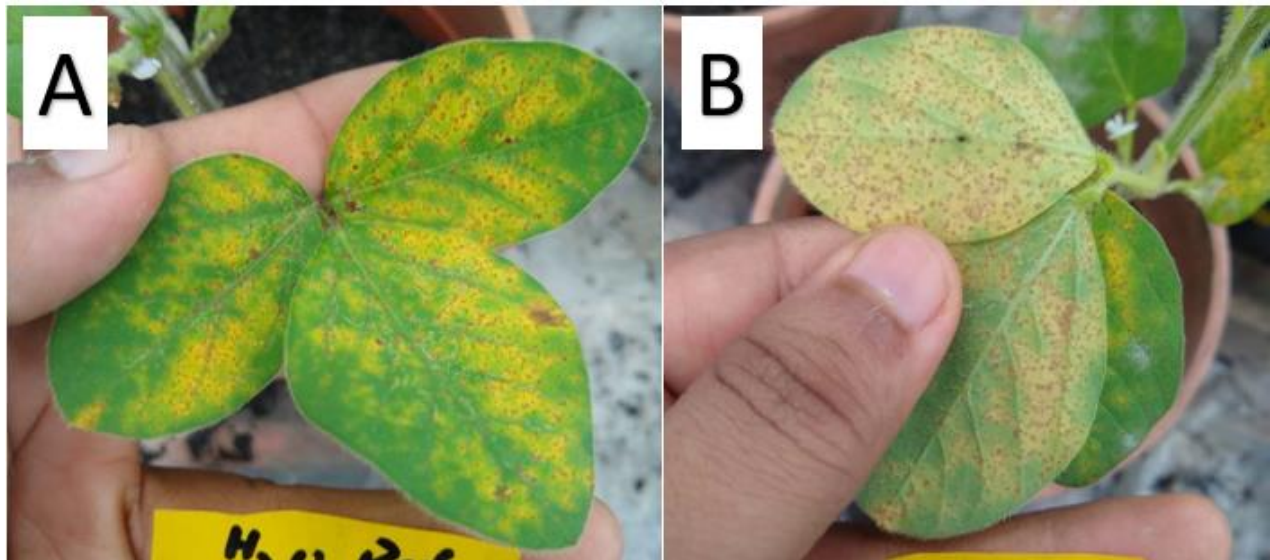


Figura 1 - Face adaxial (A) e abaxial (B) de folhas de soja infectadas por *Phakopsora pachyrhizi* 12 dias após a inoculação.

Fonte: autor (2022).

Com o sucesso da infecção, hifas (de infecção) colonizam o tecido do hospedeiro de forma intercelular, até o momento em que um septo é formado, dando origem a uma nova hifa, chamada hifa primária, que terá como função penetrar a célula para formação do haustório (estrutura especializada na obtenção dos nutrientes para o patógeno). Após sua formação novas hifas são formadas para alcançar novas células e formar novos haustórios, de forma progredir na obtenção dos nutrientes (TREMBLAY, 2011). No intervalo de 5 a 8 dias do início da colonização são formadas as urédias, onde são produzidos os urediniósporos em massa, levando ao rompimento da epiderme, ficando expostos para serem dispersos pelo vento, assim dando início ao ciclo secundário da doença (TREMBLAY, 2011)

Até o momento não é conhecido o macrociclo do fungo *P. pachyrhizi*, sendo apenas os urediniósporos responsáveis pelo surgimento da doença e perdas econômicas. O custo para o manejo da doença na safra 2018/2019 foi de aproximadamente US\$2,8 bilhões, incluindo a perda de produção e gastos com produtos e aplicação (CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2019).

As medidas de manejo adotadas para o controle da doença se baseiam no manejo integrado, utilizando-se métodos de controle cultural (vazio sanitário e semeadura em época recomendada junto ao uso de cultivares precoces), genético (cultivares resistentes) e químico (fungicidas). As cultivares resistentes ainda são escassas para a cultura, logo o uso de fungicidas é o principal método de controle, ainda que práticas culturais sejam adotadas de forma preventiva (GODOY *et al.*, 2020). Até o momento, 120 fungicidas foram registrados para o controle da doença (AGROFIT, 2021), e é recomendado o uso de fungicidas sítio-específicos como triazóis, estrobirulinas e carboxamidas, porém já foram relatados populações menos sensíveis a estes produtos (SCHMITZ *et al.*, 2014; KLOSOWSKI *et al.*, 2016;

SIMÕES *et al.*, 2017), portanto outras estratégias devem ser aliadas a seu uso, como por exemplo a combinação com fungicidas multissítios, aumentando a eficiência do controle químico e potencializando o efeito antiresistência (GODOY *et al.*, 2017).

Ainda que o controle químico seja eficiente contra a ferrugem asiática, a busca por formas alternativas de controle é necessária, principalmente formas que consigam ser igualmente eficientes, menos danosas ao meio ambiente/homem e viáveis economicamente, porém há escassez de informações de eficiência em métodos de controle além do químico para esta doença (MESQUINI *et al.*, 2011). Dentre as formas alternativas já utilizadas em outros patossistemas é possível citar o uso de extratos vegetais, óleos essenciais (GONÇALVES *et al.*, 2009; VENTUROSO, 2009; FONTANA *et al.*, 2017; PERINA *et al.*, 2013) e a indução de resistência, que além de colaborar com o controle de fitopatógenos pode vir aliado a efeitos bioestimulantes (MEHTA *et al.*, 2015; CRUZ, *et al.*, 2013; XING, *et al.*, 2020).

2.3 Indução de resistência

Devido a incapacidade das plantas em se locomoverem, outras formas de lidar contra estresses bióticos e abióticos são necessários. As plantas como forma de defesa utilizam mecanismos que vão desde modificações estruturais até sinalizações bioquímicas e moleculares (LLORENS *et al.*, 2020). A ativação dos mecanismos de defesa das plantas é uma técnica de grande impacto na agricultura moderna, diversos compostos são capazes de induzir as plantas a ativarem suas respostas defensivas antes mesmo do contato com um agente fitopatogênico (LLORENS *et al.*, 2016). Por outro lado, os agentes fitopatogênicos utilizam um vasto arsenal para atacar, no intuito de obter sucesso no processo de infecção dos hospedeiros, que por sua vez utilizam estratégias de defesa, ou em outras palavras, resistem à doença. Segundo Pascholati & Dalio (2018), a resistência de um hospedeiro pode ser definida como a capacidade de uma planta hospedeira em evitar ou atrasar a infecção e/ou subsequente colonização de seus tecidos por um patógeno.

A resistência é um processo dinâmico e coordenado que tem sua efetividade ligada diretamente à expressão dos mecanismos de defesa em uma sequência lógica, além de ter um efeito aditivo, o nível de resistência pode aumentar ou diminuir conforme contribuições de diferentes mecanismos ativados simultaneamente (PASCHOLATI, DALIO, 2018). Os mecanismos são ativados pela planta a partir do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), com ajuda de receptores especiais chamados PRRs (*Pattern recognition receptors*). Com o reconhecimento dos PAMPs ocorre a reprogramação do metabolismo da planta, envolvendo alterações gênicas e levando à ativação de sua defesa (PASCHOLATI, DALIO, 2018).

Os mecanismos de defesa das plantas podem ser de forma passiva ou ativa, mecanismos passivos, também denominados como constitutivos ou pré-formados, são aqueles presentes nas plantas antes do contato com o patógeno, podendo ser divididas entre mecanismos estruturais e bioquímicos (PASCHOLATI, DALIO, 2018). Nos mecanismos estruturais entram componentes existentes na superfície das plantas, como cera, cutícula espessa, tricômas, lenticelas e forma e quantidade de

estômatos, tais estruturas agem como barreiras naturais, impedindo a entrada de patógenos (DURBIN, 1988). Os mecanismos bioquímicos pré-formados envolvem substâncias produzidas e/ou exsudadas pelas plantas, seja por sua parte aérea ou raízes, agindo de forma fungitóxica, inibindo a infecção por parte do patógeno, como exemplo podem ser citadas substâncias como fitoanticipinas e saponinas (PASCHOLATI, DALIO, 2018).

Os mecanismos ativos, denominados induzíveis ou pós-formados, ocorrem após a interação inicial entre patógeno e hospedeiro, podendo assim como os pré-formados serem estruturais ou bioquímicos. Entre os mecanismos estruturais existem as estruturas histológicas e celulares de defesa, as primeiras relacionadas às paredes das células invadidas, enquanto que as estruturas celulares estão relacionadas ao citoplasma da célula invadida (PASCHOLATI, DALIO, 2018). Um exemplo de ambas estruturas são as camadas de cortiça, tiloses e espécies reativas de oxigênio. Os mecanismos pós-formados estão ausentes ou presentes em baixas concentrações antes do ataque de um patógeno, tendo sua produção e ativação aumentada quando em contato com este (AGRIOS, 2004; PASCHOLATI, DALIO, 2018).

Segundo Vallad e Goodman (2004), a indução de resistência pode ser descrita como um estado fisiológico da capacidade defensiva aprimorada, provocada por estímulos específicos, pelo qual as defesas inatas da planta são potencializadas contra agentes bióticos subsequentes. A indução de resistência ocorre de forma sistêmica após o contato com um agente indutor, havendo assim a ativação de genes que codificam respostas de defesa. Esta forma de ativação de mecanismos defensivos não gera alterações na composição genética da planta e ocorre de maneira não-específica, de forma a driblar problemas como a quebra de resistência por parte do patógeno (HAMMERSCHMIDT *et al.*, 2001).

A indução de resistência pode ser dividida em duas categorias: Resistência Sistêmica Adquirida (RSA) ou Resistência Sistêmica Induzida (RSI), ambas tem como objetivo ativar os mecanismos de resistência latentes da planta, seja por meio de agentes bióticos ou abióticos, de forma que a planta venha a se proteger sistemicamente. Ainda que ambos visam induzir a resistência da planta, há diferenças entre si, a RSA consiste na manifestação de um sinal que é liberado a partir do sítio de infecção levando a necrose do tecido e translocação deste mesmo sinal para outras regiões da planta, para que estas se defendam de ataques subsequentes. Já na RSI a defesa é ativada, porém o indutor aplicado não gera lesões ou necrose na planta (STICHER *et al.*, 1997). Ainda que diferentes, ambas as formas de resistência envolvem uma ampla modificação física e bioquímica da planta, como deposição de calose, produção de compostos fenólicos, ácido salicílico ou jasmônico, produção de enzimas relacionados a defesa, etc. (PASCHOLATI *et al.*, 2015; LLORENS *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2008).

O sucesso da resistência induzida depende de um intervalo temporal entre a exposição da planta ao agente indutor e a inoculação do patógeno. Durante o intervalo a planta realiza a síntese e acúmulo de substâncias que virão a atuar como defesa, a duração da defesa é variável, podendo durar poucos dias ou ao longo de todo o ciclo de vida da planta. A aplicação preventiva de indutores de resistência pode

colaborar pré-condicionando a planta contra futuros ataques de patógenos, efeito denominado “*priming*”, que em certos casos pode ser passado de uma geração a outra via sementes (“*priming transgeneracional*”), além disso os indutores apresentam a vantagem de não especificidade com o patógeno, podendo atuar para um amplo espectro de doenças (MAUCH-MANI *et al*, 2017; BALMER *et al*, 2015).

Cada vez mais a indústria agrícola investe em pesquisa e desenvolvimento de produtos visando a indução de resistência, atualmente existem diversos produtos comerciais registrados para a cultura da soja, denominados em ativadores de plantas, os quais baseiam-se em micronutrientes e ativadores químicos ou biológicos (DE PAULA *et al*, 2019).

Os micronutrientes ativadores são aplicados de forma foliar, exemplos de sucesso são o uso de Níquel (EINHARDT *et al*, 2020), silício (CRUZ *et al*, 2013), fosfito de cobre e manganês (BRUZAMARELLO *et al*, 2018). Como ativador químico pode ser citado uso de acibenzolar-S-metil (ASM) (CRUZ *et al*, 2013), composto que já é muito utilizado em fungicidas para diversas culturas e vem demonstrando grande potencial como indutor de resistência. Por fim, há os ativadores biológicos, suspensões de fungos, assim como os filtrados obtidos destes apresentam potencial indutor de resistência em plantas, exemplos de sucesso são *Saccharomyces cerevisiae* (MAPA, 2021), *Metarhizium* sp. (HOLZ *et al*, 2020) e taxtomina A produzida a partir de *Streptomyces* spp. (PAULA, 2019).

Além da taxtomina A, as actinobactérias pertencentes ao gênero *Streptomyces* são amplamente conhecidas devido a sua alta diversidade de metabólitos secundários produzidos dentre eles as fitotoxinas, com valor para a indústria farmacêutica e agroquímica (ABDEL-RAZEK *et al*, 2020).

2.4 *Streptomyces* & fitotoxinas

Fitotoxinas são metabólitos secundários de baixo peso molecular produzidos por microrganismos, insetos fitófagos e plantas, que têm como função principal gerar distúrbios em células vegetais podendo levá-las à morte. Seus efeitos podem ser vistos na forma de sintomas como clorose, necrose, murchas, alterações permeabilidade das membranas, e subdesenvolvimento, (BERESTETSKIY, 2008). Sua natureza química é diversa, podendo ser derivados de aminoácidos, terpenóides, glicosídeos, fenóis, poliacetato e em outros casos uma combinação entre estes grupos. As toxinas apresentam grande importância e aplicações em fármacos, na medicina e na produção de agrodefensivos (THAKUR *et al*, 2018).

Muitas fitotoxinas de fungos estão ligadas ao processo de infecção e estabelecimento de relações parasitárias estáveis, podendo em certas espécies exercer um papel essencial na agressividade e patogenicidade (MOBIUS, HERTWECK, 2009), elas podem ser divididas em dois grupos, as fitotoxinas específicas, aquelas a qual têm efeito apenas sobre plantas hospedeiras de um devido patógeno e as fitotoxinas não específicas, a qual têm um amplo espectro de ação podendo afetar plantas hospedeiras ou não hospedeiras (BERESTETSKIY, 2008).

Quando o assunto é fitotoxina de interesse, as actinobactérias pertencentes ao gênero

Streptomyces se destacam. Estima-se que estas produzem mais de 100 mil compostos antibióticos, que representam entre 70%-80% de todos bioativos aplicados em fármacos e agroquímicos (ABDEL-RAZEK *et al*, 2020). *Streptomyces* produzem uma variedade de produtos naturais com elevada diversidade estrutural, incluindo macrolídeos, tetraciclinas, aminoglicosídeos, glicopeptídeos, ansamicinas e terpenos (ALAM *et al*, 2022), os quais podem apresentar funções variadas como antimicrobianos, antiviróticos, antitumor, antihipersensitivo, antioxidante, imunossupressor, inseticida, herbicida, ação citotóxica e promoção de crescimento em plantas (SINGH, KHAJURIA, 2018; NGUYEN *et al.*, 2020; SALWAN, SHARMA, 2020; PHAM *et al.*, 2021; SHARMA *et al.*, 2021) .

As diversas substâncias produzidas por espécies de *Streptomyces* podem ser classificadas conforme a ação a qual exerce, dentre as antifúngicas pode-se citar a fungicromina, um polieno macrólido a qual tem potencial no controle de *Rhizoctonia solani* em folhas de repolho (SHIH *et al.*, 2003). A frontalamida e micangimicina com potencial controle de *Ophiostoma minus* em pinheiro (CHEVRETTE *et al.*, 2019). Há também casos onde substâncias ainda não identificadas apresentam potencial de controle maior do que métodos já estabelecidos previamente, um exemplo é o filtrado de *Streptomyces globisporus* o qual inibiu *Magnaporthe oryzae* mais eficientemente do que o triciclazol, um fungicida já utilizado contra tal patógeno (NEWITT *et al.*, 2019).

O modo de ação destas substâncias antifúngicas pode também ser variada, partindo desde a inibição da formação da parede celular (Sudhir *et al.*, 2010) e da respiração (Li *et al.*, 2019), ou ainda na inibição de genes relacionados à virulência do patógeno (Kang *et al.*, 2016), entre outros métodos. Esta ampla variedade de modo de ação associada à ampla diversidade de substâncias produzidas é o que leva a atenção dada as actinobactérias do gênero *Streptomyces*.

Um exemplo de fitotoxinas de destaque na agricultura é a taxtomina A, dentre as mais de 500 espécies catalogadas de *Streptomyces* apenas algumas são produtoras de taxtomina A, podendo ser citadas as fitopatogênicas: *S. acidiscabies*, *S. turgidiscabies* e *S. scabies*, sendo estas três as maiores produtoras deste metabólito, além disso *S. scabies* tem grande importância na bataticultura, por ser o causador da doença chamada sarna da batata e em outras espécies como nabo, rabanete e cenoura.

A taxtomina A tem papel importante na virulência destes patógenos, inibindo a síntese de celulose nos tecidos do hospedeiro (BIGNELL *et al*, 2014a), causando hipertrofia celular, necrose dos tecidos e má formação das raízes e caule (LORIA *et al*, 2006). Além das modificações morfológicas, a taxtomina A pode causar alterações a nível celular como mudanças no fluxo de Ca^{2+} e H^+ , redução de celulose cristalina e aumento de pectinas e hemicelulose na parede celular da planta, deposição de calose, lignificação, produção de fitoalexinas e morte celular programada (BIGNELL *et al*, 2014b)

A taxtomina foi primeiramente relatada em 1989, teve sua estrutura caracterizada como uma molécula de 4-nitroindol-3-il contendo um dipeptídeo (2,5-dicetopiperazina), derivado de um

aminoácido triptofano com radical livre e fenilalanina (KING *et al.*, 1989). Existem diferentes taxtominas, diferindo uma da outra a partir da presença ou ausência dos grupos N-metil e hidroxila, sendo a taxtomina A a produzida mais abundantemente entre as várias espécies de *Streptomyces* (JIANG *et al.*, 2018). O nome taxtomina foi dado em homenagem ao fitopatologista Roland Thaxter, responsável pela descoberta dos microrganismos produtores desta substância (KING, KALHOUN, 2009).

O uso da taxtomina na agricultura é muito diversificado, estudos prévios demonstraram ser eficiente para funções como seleção de variedades resistentes a *S. scabies* em batata (WILSON *et al.*, 2009; WILSON *et al.*, 2010), potencial como herbicidas (KING, LAWRENCE, 2001; WOLFE *et al.*, 2016), inibidor na germinação de uredinósporos de *P. pachyrhizi* (PAULA, 2019) e indução de resistência em *Arabidopsis thaliana* contra *Pseudomonas syringae* e *Hyaloperonospora arabidopsidis* (JOGLEKAR *et al.*, 2018) e tangerina (*Citrus sunki*) contra *Phytophthora nicotianae* (BRAND, 2016). Além disso estudos de alterações ultraestruturais e bioquímicos da taxtomina sobre plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*) foram realizados por Garcia (2007), colaborando para maior compreensão do modo de atuação desta fitotoxina, o que deu respostas e perguntas para novos estudos.

2.5 Taxtomina: condições físicas e nutricionais para produção

Fatores nutricionais assim como condições físicas têm grande influência sobre a produção de metabólitos secundários. Devido à diversidade de metabólitos secundários existentes estudos individuais são necessários para se obter um ótimo de produção para cada uma destas substâncias, por exemplo no estudo de diversidade química em fungos filamentosos é recomendado uma composição rica em aminoácidos, vitaminas e metais (FRISVAD, 2012).

A taxtomina A é produzida nos tecidos de plantas no momento da infecção por *Streptomyces* spp. ou *in vitro* isolando-se tais microrganismos em meio de cultura, o uso de meios específicos para bactéria como Luria Bertani ou triptona de soja não induz a produção de taxtomina (LORIA *et al.*, 1995), porém o uso de meio de aveia simples o faz (KING, LAWRENCE, 1996; BABCOCK *et al.*, 1993). *Streptomyces* spp. são microrganismos aeróbicos, químio-organotróficos e necessitam de fonte de carbono orgânica, nitrogênio inorgânico e sais minerais como fontes nutricionais, fontes de nitrogênio orgânica ou inorgânica podem colaborar para maiores produções de componentes antimicrobianos (LEE, KOJIMA, DEMAINE, 1997), maior parte das espécies crescem em temperatura entre 10 – 37°C e pH entre 6,5 a 8,0 (BASÍLIO *et al.*, 2003; SRIVIBOOL *et al.*, 2004).

Em experimento realizado por Wach e colaboradores (2007), avaliou-se um isolado de *S. acidiscabies* em diferentes meios de cultura, o resultado obtido demonstrou que a síntese de taxtomina não está diretamente ligada à produção de biomassa do microrganismo. Além disso, notou-se que a produção ocorreu apenas em meios que continham substâncias derivadas de tecidos vegetais, principalmente em meio aveia, que tem grande teor de xilana e glucana. Isto é um indicativo de que carboidratos complexos podem ser necessários no reconhecimento pelo microrganismo para assim começarem a produzir a taxtomina.

Ainda que já seja estabelecido o uso de meio farelo de aveia para cultivo de *Streptomyces* spp. com a finalidade de produção de taxtomina, é necessário mais estudo de diferentes fontes de nutrientes que possam vir a aumentar e otimizar a produção da fitotoxina, o que seria um grande avanço devido à importância medicinal e agrícola de tal substância, além de poder ser uma base para aplicação em outros microrganismos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica (LFBF) (ESALQ-USP), no laboratório de biologia molecular e micotoxinas (ESALQ-USP) e em casa de vegetação (ESALQ-USP), sendo o trabalho dividido em três etapas: i) avaliação da produção de taxtomina A oriunda de diferentes isolados da coleção bacteriológica do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica; ii) avaliação de requerimentos físicos e nutricionais em meio de cultura líquida para otimização da produção de taxtomina A pelos isolados de *Streptomyces* spp.; iii) potencial de indução de resistência em plantas tratadas com taxtomina A comercial e por filtrado de isolados de *Streptomyces* spp.

3.1 Obtenção dos isolados de *Streptomyces* spp.

Para o desenvolvimento do trabalho, foram utilizados sete isolados preservados de *Streptomyces* spp. selecionados a partir da bacterioteca do LFBF, sendo eles os seguintes: LFBF1901, LFBF1903, LFBF1906, LFBF1909, LFBF1913, LFBF1926 e IBSBF2507. Os isolados foram recuperados em placas contendo meio aveia-ágar e mantidos a 28 °C em escuro por dez dias em câmara incubadora BOD (Marconi MA 403). Após o crescimento e esporulação, os mesmos foram utilizados nos testes.

3.2 Obtenção dos filtrados de *Streptomyces* spp.

Após o crescimento e esporulação, discos de 10 mm foram cortados das placas de petri e transferidos para frascos do tipo erlenmeyers (250 mL) contendo 100 mL de meio de cultura de extrato de aveia líquido, (meio produzido a partir da cocção de 40 g de farelo de aveia comercial por 20 minutos em água destilada, seguido de filtragem com gaze, adição de água destilada até atingir volume de um litro e ajuste de pH para 7,2 com o uso de solução de NaOH (1 M). Os frascos inoculados foram mantidos sob 28°C, em agitador (Tecnal TE-424) em agitação de 100 RPM, com ou sem a presença de luz, por cinco dias.

Após este período, a filtragem dos meios de cultura foi realizada seguindo metodologia de Garcia (2008) As culturas de cada frasco foram filtradas em gaze, as células bacterianas foram coletadas para pesagem de biomassa seca do isolado, enquanto o material líquido foi transferido para tubos de centrifugação. O líquido foi centrifugado com agitação de 12.500 (RPM) durante 20 minutos em temperatura de 4°C (Sorval Instruments RC5C), O sobrenadante foi transferido para tubos falcon de 15 mL e identificado, sendo armazenado em congelador a -5°C até o momento de uso em bioensaio ou análise.

3.3 Efeito da agitação e luminosidade sobre a biomassa e produção de metabólitos por isolados de *Streptomyces* spp.

Os sete isolados foram submetidos a alterações em requerimentos físicos para avaliação do efeito sobre a biomassa e produção de metabólitos. Os equipamentos, meios líquidos utilizados, assim como os procedimentos para sua fabricação foram os mesmos descritos no item 3.2, as alterações físicas avaliadas foram duas diferentes agitações (150 e 100 RPM) com dois fatores de luminosidade (presença ou ausência de luz). O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial, contendo dois níveis de agitação, dois níveis de luminosidade, sete isolados e quatro repetições por isolado, sendo cada Erlenmeyer considerado uma repetição.

Após os cinco dias de agitação, obteve-se o meio de cultivo parcialmente purificado conforme descrição do item 3.2, durante o processo a biomassa de cada isolado foi coletada com auxílio de espátula e transferida para papel filtro qualitativo Whatman nº 1, o material teve sua massa úmida pesada em balança de precisão (Shimadzu AUY 220). Após, a biomassa foi seca em estufa (Fanem 002 CB) a 60 C° durante 24 horas ou até secagem total do material, a matéria seca foi pesada e a biomassa calculada.

Em relação aos filtrados, os parâmetros avaliados foram, visualização de metabólitos por CCD e quantificação por CLAE (conforme descrição do item 3.5). Para a avaliação das biomassas obtidas, foram utilizadas estatísticas não paramétricas, enquanto para avaliação da produção de taxtomina A foi realizado análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a 5% de significância no software R.

3.4 Efeito da composição nutricional de meio líquido sobre a produção de metabólitos

Os isolados que apresentaram melhores resultados nas análises cromatográficas de camada delgada e líquida de alta eficiência e/ou no bioensaio filtrado x tubérculo de batata foram selecionados e submetidos a meio líquido contendo alterações em sua composição nutricional, a fim de avaliar sua influência sobre a produção de metabólitos, os meios utilizados foram: aveia (controle), aveia + carboximetil celulose (1% g/v), aveia + carboximetil celulose (1% g/v) + glicose (0,5% g/v) e aveia + casca de batata (1% g/v) + glicose (0,5% g/v). A produção dos distintos meios de cultura foram realizados conforme descrição do item 3.2, assim como o processo de filtragem, como parâmetro de avaliação foi realizada a absorvância em comprimento de onda de 400 nm, realizado em espectrofotômetro (Hitachi U-1900), os valores obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste Tukey a 5% de significância no software R.

3.5 Extração, visualização e quantificação da taxtomina A

Para a extração da taxtomina A, 15 mL do filtrado de cada isolado foi descongelado e transferido para um funil de separação. A separação da fitotoxina foi realizada pelo processo de partição líquido-líquido a partir da adição de 25 mL de acetato de etila. Após a adição, a fase contendo acetato de etila (fase orgânica) foi coletada, enquanto que a fase aquosa foi colocada novamente no funil de separação e mais 25 mL de acetato de etila foi adicionado, repetindo o processo para maior aproveitamento da

extração da fitotoxina. Ambas as fases do acetato de etila foram combinadas e desidratadas com aproximadamente 60 g de sulfato de sódio anidro e mantidas em fluxo de exaustão *overnight* para secagem. O pó obtido foi pesado ressuspenso em 1,5 mL de metanol grau CLAE e armazenado em vials a -20°C.

A visualização da taxtomina A foi realizada por cromatografia de camada delgada (CCD). A corrida foi realizada em placas de sílica gel 60 com detector de UV₂₅₄ (Macherey-Nagel), as mesmas passaram por pré-lavagem para retirada de possíveis impurezas. Os tratamentos a serem testados, assim como a taxtomina A comercial utilizada como padrão comparativo, foram colocados no início da placa no volume de 100 µL com auxílio de uma pipeta de precisão. Como fase móvel (eluente) foi utilizado Clorofórmio:metanol (9:1 v/v), após o final da corrida as placas foram visualizadas sob luz com comprimento de onda de 254nm e 364 nm, desta forma o fator de retenção (*rf*) foi obtido para cada uma das substâncias avaliadas.

A quantificação da taxtomina A dos isolados foi realizada no Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos da Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz” a partir de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O equipamento contava com um amostrador automático, e foi utilizada uma coluna cromatográfica CLC-ODS C18, 5 µm, 250 x 4,6 mm da marca Shimadzu®, foram testados dois métodos cromatográficos conforme seu modo de eluição: isocrático e gradiente, o método isocrático consiste no uso de um solvente (ou mistura) em um valor constante ao longo da separação dos compostos, enquanto que o método gradiente consiste no uso de mistura com variações nas concentrações ao longo da separação dos compostos, criando assim um gradiente.

A fim de testar a confiabilidade do método de quantificação da Taxtomina A, foi obtido um padrão analítico de Taxtomina A (C₂₂H₂₂N₄O₆ – pureza ≥ 98 % grau HPLC, Sigma-Aldrich®) e se realizaram os seguintes parâmetros de validação: seletividade, linearidade, limite de quantificação e recuperação.

A seletividade foi realizada com três triplicatas, comparando-se uma matriz com adição do analito (padrão de Taxtomina A com concentração de 10 µg mL⁻¹) e uma matriz sem a adição do analito (metanol grau HPLC). O resultado destas medições foi avaliado considerando-se os tempos característicos de retenção do pico, sendo observado que não há sinal do analito na matriz sem a adição do composto da Taxtomina A.

A linearidade do método foi obtida por padronização externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito de Taxtomina A a ser determinado na amostra real. A equação da reta que relaciona as duas variáveis, área do pico e a concentração da substância, a ser quantificada é expressa pela Eq. 01 (INMETRO, 2007).

$$y=ax+b$$

Eq. (01)

em que:

y: resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

x: concentração;

a: inclinação da curva de calibração = sensibilidade;

b: interseção com o eixo y, quando $x = 0$.

Através da equação da reta, a linearidade foi avaliada levando em consideração o coeficiente de correlação linear ($r^2 \geq 0,99$) como indicador do modelo matemático. Para o ajuste da curva analítica, foi preparado uma solução estoque de Taxtomina A de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, a partir da qual foram preparadas seis soluções de trabalho de Taxtomina A, todas em metanol grau HPLC, com as seguintes concentrações ($1,5; 2,5; 5; 7,5, 10$ e $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), com três triplicatas injetadas em ordem crescente no HPLC.

Como limite de quantificação (LQ) foi considerada a concentração do menor ponto da curva analítica, visto que amostras com concentrações inferiores a esse valor não poderiam ser quantificadas por fugirem da linearidade do método. O ensaio de recuperação foi realizado comparando-se os resultados analíticos da solução padrão de Taxtomina A de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, submetidos ao processo de extração partição líquido-líquido (conforme o item 3.5), com os resultados obtidos com a mesma solução padrão não extraídas. O ensaio de recuperação foi calculado conforme a Eq. 02 (ANVISA, 2017).

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad \text{Eq. (02)}$$

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$ (GARP, 1999).

3.6 Experimentos *in vitro*

3.6.1 Obtenção e preparo de minitubérculos

Para a avaliação do efeito do filtrado do meio de cultura sobre tubérculos de batata foi utilizado o cultivar Ágata, os quais foram obtidos em supermercados. Os tubérculos foram lavados com detergente em água corrente, com auxílio de um furador de rolha foram cortados discos de 2 cm de diâmetro e 5 mm de espessura da parte central dos tubérculos, os discos foram mantidos imersos em solução de hipoclorito de sódio (0,5%) por cinco minutos, enxaguados em água destilada e secos com papel toalha.

3.6.2 Efeito dos filtrados sobre tubérculos de batata

A fim de avaliar a possível presença de taxtomina A nos filtrados de *Streptomyces* spp. produzidos em meio aveia líquido, tubérculos de batata foram utilizados como bioindicadores. Cinco

discos dos tubérculos de batata, previamente cortados, foram colocados em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo papel filtro estéril e umedecido. Para cada tratamento foram utilizadas quatro placas. Com o auxílio de uma pipeta de precisão, 10 µL de cada filtrado foi colocado no centro dos discos. Como controle negativo foi utilizado 10 µL de água, enquanto que para controle positivo foi utilizada uma suspensão de esporos de *Streptomyces* spp. As placas foram vedadas com filme plástico e mantidas a 28° C e avaliadas a cada 24 horas (durante quatro dias). A avaliação realizada foi a metodologia de Alpiste (2018) adaptada, que se baseia na avaliação visual do disco e classificação da produção de taxtomina como baixa, média ou alta conforme tamanho da área necrosada.

3.6.3 Efeito dos filtrados sobre a germinação de esporos de *Phakopsora pachyrhizi*

Os filtrados selecionados foram utilizados para avaliar o efeito inibitório sobre a germinação de esporos da ferrugem-asiática da soja. Foi utilizado o método da gota, uma gota de 50 µL coletada de uma suspensão de esporos com concentração de 5×10^4 por mL foi colocada no centro de placas de poliestireno de 60x15 mm, sobre esta gota foi colocada outra de mesmo volume contendo o filtrado a ser testado, obtendo assim o volume final de 100 µL.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado e cada tratamento foi feito com quatro repetições. Os tratamentos testados foram diferentes concentrações do filtrado dos isolados 1901, 1909 e 1926 em água, sendo elas as seguintes: 100% (v/v), 75% (v/v), 50% (v/v) e 25% (v/v), como controles foram utilizados água destilada (controle positivo) e fungicida Vessarya® recomendado para o patógeno (Controle negativo), as placas foram vedadas com filme plástico, transferidas para bandeja umedecida e alocada em local escuro à 28° C, após seis horas o número de urediniósporos germinados foi contado com auxílio de microscópio óptico, contando-se 100 urediniósporos ao acaso (foram considerados germinados apenas esporos com tubo germinativo maior ou igual ao diâmetro do esporo).

O parâmetro avaliado foi a porcentagem de inibição da germinação dos urediniósporos, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste Tukey a 5% de significância no software R.

3.7 Experimentos *in planta*

3.7.1 Obtenção e manutenção de plantas de soja

A soja utilizada foi a cultivar Monsoy 6410, a qual apresenta suscetibilidade a *Phakopsora pachyrhizi*. A semeadura foi realizada em vasos de um litro contendo substrato comercial (basaplant), sendo semeados duas sementes por vaso, após a semeadura os vasos foram mantidos em casa de vegetação sob condições de temperatura e umidade parcialmente controlados, a irrigação foi realizada regularmente de forma manual, a partir da emissão do primeiro trifólio (V1) fez-se o raleio, deixando apenas uma planta por vaso, as plantas semeadas foram utilizadas tanto para manutenção do inóculo, como para os bioensaios de indução de resistência.

3.7.2 Obtenção e manutenção do inóculo de *Phakopsora pachyrhizi*

O isolado de *Phakopsora pachyrhizi* utilizado foi o PR_ASRO1, o qual é mantido em casa de vegetação no campo experimental do Departamento de Fitopatologia e Nematologia (ESALQ/USP). A manutenção foi feita diretamente em plantas de soja mantidas em caixas de filme plástico contendo umidificadores acoplados às laterais com funcionamento de 15 min. hora⁻¹. As plantas foram inoculadas com auxílio de um borrifador contendo suspensão de esporos na concentração de 5×10^4 urediniósporos mL⁻¹, Tween 0,05% foi utilizado para quebra da tensão superficial e melhorar a distribuição dos esporos em água. Após aparecimento de lesões, as plantas foram mantidas como fonte de inóculo, conforme senescência e queda das folhas, novas plantas foram introduzidas, para que ocorresse novas infecções e a fonte de inóculo fosse renovada, desta forma sempre havendo disponibilidade de inóculo para uso nos bioensaios.

3.7.3 Bioensaio taxtomina A comercial x *Phakopsora pachyrhizi* em soja

3.7.3.1 Seleção do solvente

A fim de selecionar o melhor solvente para formulação de solução com taxtomina A comercial, três foram testados avaliando sua fitotoxidez sobre folhas de soja em estágio V3, sendo eles Dimetilsulfóxido (DMSO), etanol e metanol nas concentrações de 5, 10, 20, 50 e 100% (v/v), como controle foi utilizado água. Os diferentes tratamentos foram pulverizados sobre as folhas até o ponto de escorrimento, então foram mantidas sob condições de casa de vegetação por cinco dias, após o período avaliou-se visualmente as plantas, selecionando-se o solvente menos fitotóxico para uso nas próximas fases.

3.7.3.2 Efeito da taxtomina A comercial aplicada em plantas de soja contra *Phakopsora pachyrhizi*

Para avaliar o potencial como indutor de resistência, taxtomina A comercial (Sigma-Aldrich – CAS 122380-18-1) foi aplicada sobre plantas de soja e avaliados na eficiência do controle de *Phakopsora pachyrhizi* em condições de casa de vegetação.

O experimento foi realizado em delineamento casualizado em blocos, contendo seis tratamentos, sendo eles: taxtomina A comercial + metanol 78% nas concentrações de 2,5 µg/mL, 10 µg/mL e 50 µg/mL, fungicida Vessarya® na concentração de 6 µL/mL (controle positivo), água e metanol 78% (controles negativos). O tratamento contendo taxtomina A comercial foi produzida a partir da dissolução de 1 mg de taxtomina A comercial em 3,75 mL de metanol a 78%, obtendo assim a concentração de taxtomina de 270 µg/mL.

Os tratamentos foram pulverizados sobre as folhas de plantas de soja no estágio V3 até o ponto de escorrimento, sendo o tratamento aplicado apenas no primeiro e segundo trifólio em um total de oito plantas por tratamento, após 72 horas da aplicação. O patógeno foi inoculado na face abaxial das folhas

na concentração de 5×10^4 urediniósporos mL^{-1} e as plantas mantidas sob condição de alta umidade por 48 horas, sendo retornadas para as condições normais de casa de vegetação após esse período. A avaliação foi feita 18 dias após a inoculação. Os parâmetros avaliados foram severidade da doença, avaliada partir de escala diagramática (GODOY, KOGA, CANTERI, 2006) e medição do teor de clorofila a partir de clorofilômetro (Spad-502 Plus, Konika Minolta®).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste Tukey a 5% de significância no software R.

3.8 Bioensaio filtrado x *Phakopsora pachyrhizi* em soja

3.8.1 Teste de fitotoxicidade do filtrado em folhas de soja

Anterior ao teste de eficiência dos filtrados selecionado no controle da ferrugem asiática, os mesmos foram testados em relação ao potencial fitotóxico sobre as folhas de plântulas de soja. Para tal fim, foram avaliadas quatro diferentes concentrações dos filtrados dos isolados 1901 e 1909: 100% (v/v), 75% (v/v), 50% (v/v) e 25%, como testemunha foi utilizado apenas água destilada. Os tratamentos foram realizados em folhas de soja em estágio V1, cada tratamento foi pulverizado sobre as folhas até atingir o ponto de escorrimento e mantidas em casa de vegetação, após cinco dias a fitotoxicidade foi avaliada de forma visual.

3.8.2 Efeito do filtrado na severidade e em respostas bioquímicas em plantas de soja contra *Phakopsora pachyrhizi*

Conforme resultado obtido em teste de fitotoxicidade, ajustes foram realizados nas concentrações (diminuindo as para 10% e 2,5%), de forma que fosse possível avaliar o potencial do filtrado no controle da ferrugem asiática da soja. Foram testadas duas novas concentrações e ambas pulverizadas sobre as folhas de plantas de soja em estágio V2 até o ponto de escorrimento. O tratamento foi aplicado apenas no primeiro trifólio em um total de quatro plantas por tratamento. Após 72 horas da aplicação, o patógeno foi inoculado na face abaxial das folhas na concentração de 5×10^4 urediniósporos mL^{-1} e as plantas mantidas em caixas de filme plástico contendo umidificadores acoplados às laterais com funcionamento de 15 min hora⁻¹. A avaliação foi feita 12 dias após a inoculação. Os parâmetros avaliados foram a avaliação de severidade a partir de escala diagramática (GODOY, KOGA, CANTERI, 2006) e medição do teor de clorofila a partir de clorofilômetro (Spad-502 Plus, Konika Minolta®).

As coletas dos materiais para análises bioquímicas foram realizadas em quatro momentos diferentes no desenvolvimento da planta, sendo eles: Previamente a aplicação dos filtrados (0 h), 72 horas após a aplicação dos filtrados (72h) e cinco dias após a inoculação do patógeno (168h). Em cada momento citado, foi coletado 0,5 g de folhas do primeiro trifólio (V1) de cada tratamento, estas colocadas em envelopes de papel alumínio e transferidas para caixa contendo nitrogênio líquido e levadas para armazenamento em freezer (-5 °C) até o momento da obtenção dos extratos enzimáticos

para a realização das análises bioquímicas. Ambos os dados obtidos (severidade e bioquímicos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste Tukey a 5% de significância no software R.

3.9 Análises bioquímicas

3.9.1 Preparo do extrato enzimático

As amostras coletadas foram maceradas em nitrogênio líquido com auxílio de pistilo e cadinho de porcelana, o pó obtido foi homogeneizado com tampão fosfato de potássio 0,01 M (pH 6,6), na proporção 1:6 (peso/volume), contendo polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (peso/volume). O material final foi centrifugado a 6000 g durante 30 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para tubos Eppendorf de 1,5 mL, sendo este considerado o extrato enzimático, o qual foi armazenado em freezer (-5 °C) até o momento da determinação de proteínas totais, atividade de guaiacol peroxidase e atividade da beta-1-3-glucanases.

3.9.2 Quantificação de proteínas totais

As proteínas totais foram determinadas seguindo metodologia proposta por Bradford (1976). Uma curva padrão de BSA foi realizada (Apêndice A), diluindo-se 0,05 g de BSA em 50 mL de água (concentração final de 1000 µg/mL). Esta solução foi diluída novamente (0,1 mL da solução em 3,9 mL de água), obtendo uma concentração de trabalho de 25 µg/mL, a partir desta uma curva foi gerada, a mesma foi utilizada para a determinação das atividades de guaiacol peroxidase e beta-1-3-glucanase.

Para a determinação de proteínas totais nas amostras, em tubos de ensaio foram colocados 100 µL do extrato proteico, seguido da adição de 800 µL de tampão fosfato de potássio 0,01 M (pH 6,6), em seguida foi adicionado 200 µL de reagente de Bradford (Bio-rad Protein Assay) em cada um dos tubos, após 5 minutos, a solução foi agitada e sua absorbância foi mensurada em espectrofotômetro a 595nm.

3.9.3 Atividade de guaiacol peroxidase

A atividade de guaiacol peroxidase foi determinada em espectrofotômetro a 470 nm, a partir da medição da conversão de guaiacol em tetraguaiacol ao longo do intervalo de um minuto (LUSSO, PASCHOLATI, 1999). A reação foi composta pela mistura de 100 µL de extrato proteico diluído e 2,9 mL de solução de reação (250 µL de guaiacol e 306 µL de peróxido de hidrogênio para cada 100 mL de tampão fosfato de potássio 0,01 M (pH 6,6)). Para as amostras que tiveram sua atividade elevada, foi feita a diluição do extrato proteico em tampão de extração (50 µL de extrato em 100 µL de tampão. Para o branco (referência) utilizou-se 2,9 mL de solução de reação e 100 µL do tampão fosfato de potássio 0,01 M (pH 6,6). A solução de reação foi mantida a 30 °C em banho maria para o uso. A atividade da peroxidase foi expressa em $\Delta OD_{470}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína. Os dados foram tabulados e os gráficos plotados para eventual discussão.

3.9.4 Atividade da beta-1-3-glucanase

A atividade da beta-1-3-glucanase foi determinada seguindo metodologia proposta Miller (1959). Inicialmente uma curva padrão de glicose foi produzida a partir da solução mãe de glicose contendo 1mg em 1ml de água, a solução passou por diluição seriada para assim obter os diferentes pontos da curva (Apêndice B). As soluções referentes a cada ponto da curva foram realizadas em tubos de ensaio em duplicata, e a estas adicionados 125 μ L de reagente ADNS (75 mL de água destilada, 2,5 g de ácido 3,5-Dinitrosalicílico, 50 mL de hidróxido de sódio 2M e 75 g de tartarato de sódio e potássio). A solução foi aquecida por 5 minutos a 95 °C, após o período os tubos foram resfriados em gelo, adicionou-se 1250 μ L de água destilada e a leitura de absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm, como branco (referência), foi utilizado a concentração de 0 mg/mL.

Para a quantificação da atividade da beta-1-3-glucanase nas amostras, foi realizado a reação dos extratos enzimáticos (150 μ L de laminarina e 100 μ L de extrato enzimático), e a reação controle (150 μ L de laminarina, 100 μ L de extrato enzimático e 125 μ L de ADNS). Como branco foi utilizado apenas 150 μ L de laminarina. Os tubos de ensaio contendo ambas as reações e amostras foram incubados em banho-maria por 2 horas à 40 °C, após este período foi adicionado 125 μ L de ADNS à reação dos extratos enzimáticos e ao branco, os tubos foram mantidos em banho-maria por 5 minutos a 95 °C, após o período os tubos foram resfriados em gelo. Os tubos foram ajustados para volume de 1,5 mL a partir da adição de água destilada, o material final foi submetido a leitura em espectrofotômetro a 540 nm e expressa em mg de glicose liberada / hora / mg de proteína. Os dados foram tabulados e os gráficos plotados para eventual discussão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito da agitação e luminosidade sobre a biomassa de isolados de *Streptomyces* spp.

O fator ausência ou presença de luz não afetou significativamente a biomassa do mesmo isolado nas diferentes agitações avaliadas, porém, cada isolado demonstrou comportamento diferente perante a exposição a luz, havendo assim diferenças grandes de biomassa produzida, o que é plausível, pela possibilidade de serem espécies diferentes de *Streptomyces*, o que pode ser reforçado por resultados obtidos por Suzani (2020), onde constou-se ampla diversidade morfológica entre estes mesmos isolados.

O fator agitação demonstrou diferença significativa na biomassa dos isolados avaliados em ambas as velocidades avaliadas. Na agitação de 100 RPM os isolados 1926 e 1909 se destacaram por ter uma maior produção de biomassa (Figura 2), os demais isolados não tiveram produções expressivas. Ainda que a luminosidade não tenha sido um fator influente estatisticamente, é possível notar comportamento contrário entre os isolados 1926 e 1909, enquanto o primeiro teve maior produção de biomassa na presença de luz (1,04g/L) o segundo teve uma maior produção quando submetido a ausência desta (0,326g/0,5L).

Para agitação de 150 RPM, os maiores produtores de biomassa foram respectivamente os isolados IB2507 produzindo 0,545g/0,5L e 1909 produzindo 0,286g/0,5L, assim como na agitação de 100 RPM não houve diferença significativa para o fator luminosidade, porém a mesma teve efeito contrário entre os isolados de maior biomassa produzida citados anteriormente (Figura 3).

Quando comparados o papel das agitações sobre a biomassa, nota-se que os isolados 1906, 1909, 1926 e IB2507 são os únicos a terem sua biomassa influenciada pela velocidade de rotação aplicada, sendo que estes três primeiros são mais beneficiados em agitação de 100 RPM, enquanto que o isolado IB2507 o faz na agitação de 150 RPM. Dentre todos os resultados obtidos é importante notar a extrema importância da agitação para os isolados 1926 e IB2507, uma vez que a alteração da agitação levou a produção de biomassa quatro vezes maior (Figura 4).

A agitação, é um requerimento físico fundamental para o desenvolvimento de microrganismos, em processos de fermentação serve para a mistura e oxigenação das fases presentes, mantendo maior homogeneização das condições físicas e químicas (ZHOU *et al*, 2018). Por outro lado, agitações muito ou pouco elevadas, podem ter efeito contrário, levando a alterações morfológicas, baixa produção de metabólitos e danos a estruturas celulares, porém pode também não haver correlação entre biomassa e produção de metabólitos (ZHOU *et al*, 2018).

A maior produção de biomassa aqui obtida foi de 1,09g/L para o isolado IB2507 na agitação de 100 RPM, valor menor ao obtido por Mitrovic e colaboradores (2017) em estudo com *Streptomyces hygroscopicus*, onde agitação de 200 RPM levou a uma biomassa de aproximadamente 2g/L, esta maior agitação colaborou para maior aproveitamento dos nutrientes presentes no meio líquido, enquanto que agitações menores inibiu o desenvolvimento devido à má oxigenação do meio. Os resultados são

contrários, mas diversos fatores podem ter influenciado, como o equipamento, meio de cultura e principalmente o fator genético do microrganismo.

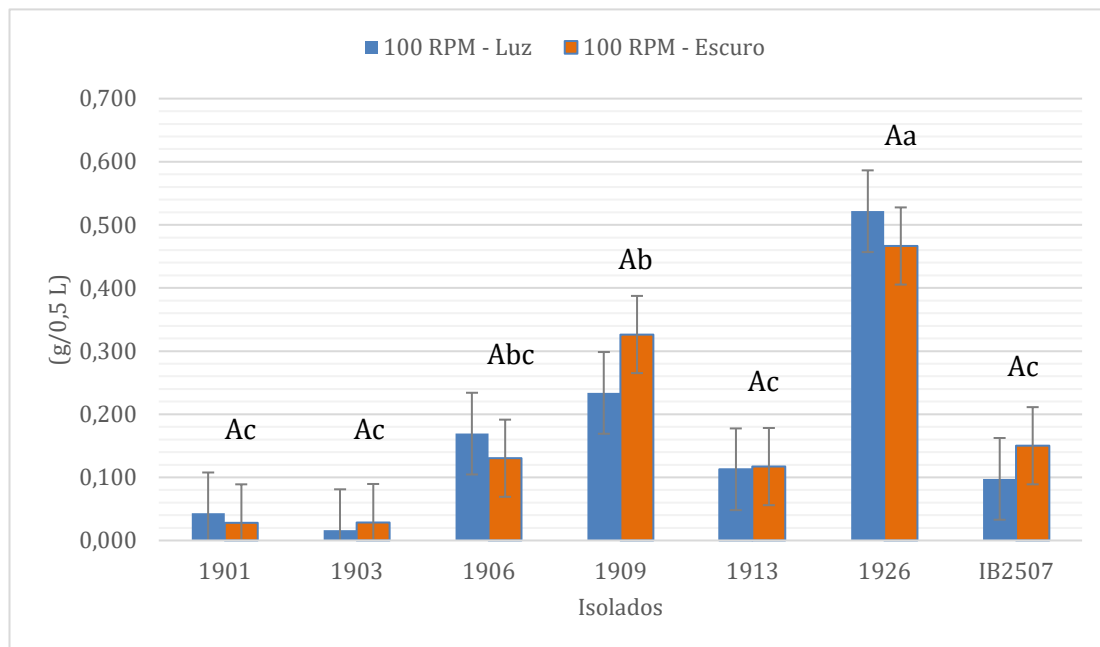


Figura 2 - Biomassa (g) dos isolados após cinco dias em 100 RPM de agitação na presença ou ausência de luz. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (maiúscula - fator luminosidade, minúscula - fator isolado) pelo teste de Tukey a 5%

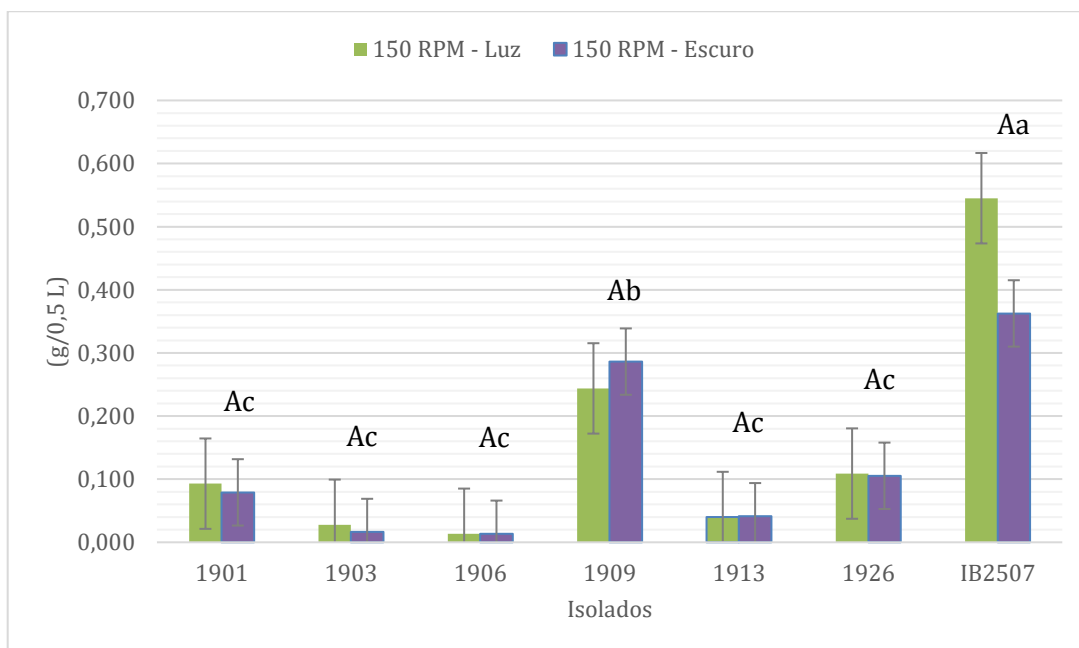


Figura 3 - Biomassa (g) dos isolados após cinco dias em 150 RPM de agitação na presença ou ausência de luz. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (maiúscula - fator luminosidade, minúscula - fator isolado) pelo teste de Tukey a 5%

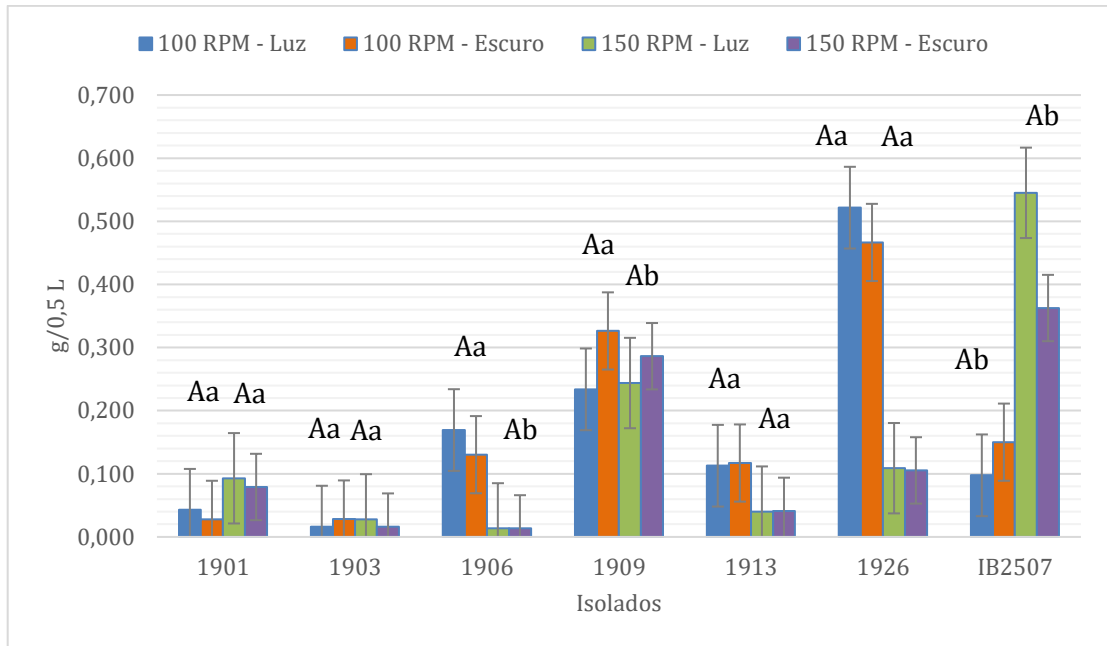


Figura 4 - Biomassa (g) dos isolados após cinco dias em 100 RPM e 150 RPM de agitação na presença ou ausência de luz. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (maiúscula - fator luminosidade, minúscula - fator isolado) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As barras nas colunas representam o erro padrão.

4.2 Efeito da agitação e luminosidade sobre a produção de metabólitos por isolados de *Streptomyces* spp.

Cromatografia de camada delgada

Como parâmetro de avaliação da cromatografia de camada delgada (CCD), recorreu-se ao fator de retenção (r_f), comparando o obtido para cada um dos filtrados com a taxtomina A comercial, o fator de retenção é obtido a partir da divisão da distância percorrida pela substância avaliada e a distância total percorrida pelo solvente. A taxtomina A comercial percorreu uma distância de 3,1 cm e o solvente um total de 15 cm, desta forma, o fator de retenção obtido para a banda de taxtomina A comercial foi de 0,21, valor próximo ao já apresentado na literatura (PAULA, 2019).

Por se tratar de uma solução complexa, os filtrados apresentaram diferentes bandas ao longo da placa, e em certos casos em ambos os comprimentos de ondas a qual foram visualizados, desta forma foi calculado o fator de retenção para cada uma das situações.

O comprimento de onda que mostrou maior quantidade de bandas foi o de 254 nm, o isolado 1901 submetido a 150 RPM no escuro foi o que apresentou maior quantidade de bandas, enquanto que o mesmo isolado quando exposto à luz, em ambas as rotações avaliadas, apresentou quatro bandas. Os isolados 1909 e IB2507 apresentaram apenas uma banda, enquanto que o isolado 1926 apresentou apenas uma banda quando submetido a rotação de 150 RPM no escuro e nenhuma banda a 100 RPM no escuro (Tabela 1). Para o comprimento de onda de 364 nm foram obtidas o máximo de duas bandas para os isolados 1909 e IB2507, enquanto que os demais apresentaram apenas uma banda.

Dentre todos os isolados avaliados, apenas dois apresentaram *rf* próximo ao obtido pela taxtomina A comercial, sendo eles os isolados 1901 e 1926, ambos submetidos a rotação de 150 RPM no escuro, além disso, para o isolado 1901 o mesmo *rf* foi obtido também para produção na presença de luz (Tabela 1). Ainda que tais isolados apresentaram *rf* próximos ao da taxtomina A, não apresentaram a banda com coloração amarela, o que é uma característica típica para a taxtomina A, sendo assim recorreu-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para confirmação da presença de taxtomina A e eventual quantificação.

Tabela 1 - Fator de retenção obtido para a taxtomina A e para os filtrados avaliados em cromatografia de camada delgada.

Spot visível a 254 nm						
Isolado	Rf(S)					
Taxtomina comercial	0.21					
1901 (100 RPM / Luz)	0.59	0.45	0.33	0.12		
1926 (100 RPM / Escuro)						
1901 (150 RPM / Escuro)	0.55	0.43	0.35	0.25	0.19	0.11
1901 (150 RPM / Luz)	0.59	0.43	0.34	0.19		
IB2507 (150 RPM / Escuro)	0.12					
1926 (150 RPM / Escuro)	0.19 0.12					
1909 (150 RPM / Luz)	0.68					
1909 (150 RPM / Escuro)	0.68					
Spot visível a 364 nm						
Isolado	Rf(S)					
2507 (150 RPM / Luz)	0.75	0.65				
1901 (150 RPM / Luz)	0.40					
IB2507 (150 RPM / Escuro)	0.79	0.66				
1906 (100 RPM / Escuro)	0.36					
1909 (150 RPM / Luz)	0.48 0.37					
1909 (150 RPM / Escuro)	0.48 0.37					

Além das bandas comparadas ao *rf* da taxtomina A comercial, alguns isolados apresentaram outras bandas com uma alta intensidade em cor, sendo eles os isolados 19091 e o isolado 1909, nos *rfs* de 0,59 e 0,68 respectivamente. Para o isolado 1901 a banda apresentou coloração amarelada podendo ser vista em luz natural, enquanto que o isolado 1909, a banda só foi visível em comprimento de onda de 254 nm (Figuras 5 e 6).

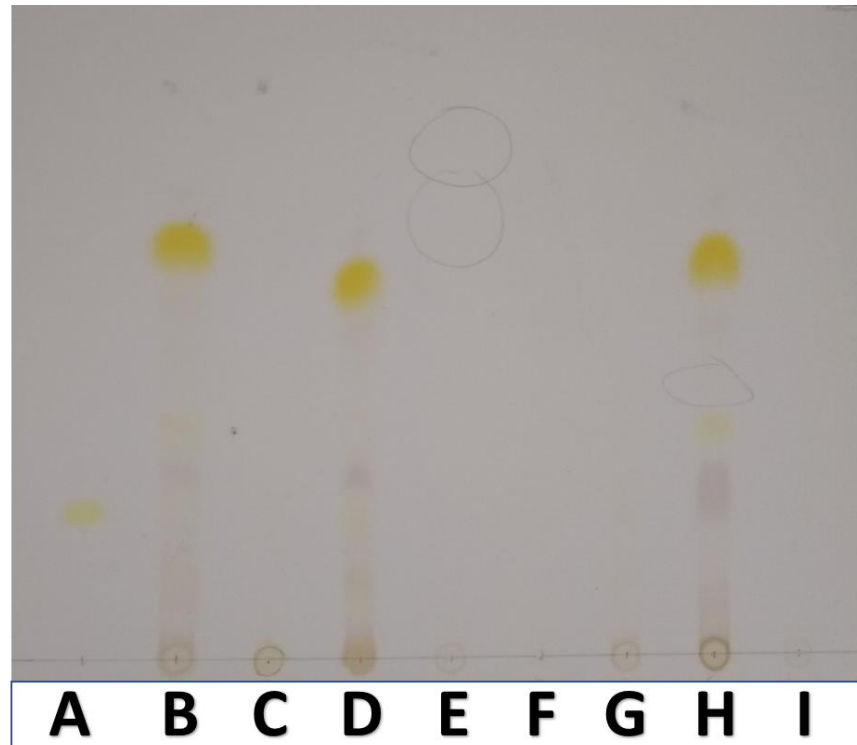


Figura 5 - Cromatografia de camada delgada (TLC) da taxtomina A comercial (A), 1901 a 100 RPM com luz (B), 1926 a 150 RPM com luz (C), 1901 a 150 RPM sem luz (D), IB2507 a 150 RPM com luz (E), 1903 a 100 RPM com luz (F), 1903 a 150 RPM com luz (G), 1901 a 150 RPM com luz (H) e 1903 a 100 RPM sem luz (I) visualizada sob luz natural.

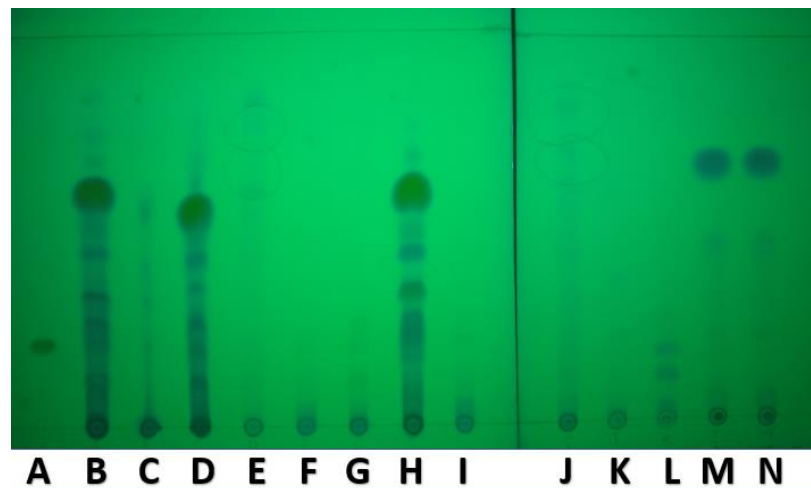


Figura 6 - Cromatografia de camada delgada (TLC) da taxtomina A comercial (A), 1901 a 100 RPM com luz (B), 1926 a 150 RPM com luz (C), 1901 a 150 RPM sem luz (D), IB2507 a 150 RPM com luz (E), 1903 a 100 RPM com luz (F), 1903 a 150 RPM com luz (G), 1901 a 150 RPM com luz (H), 1903 a 100 RPM sem luz (I), IB2507 a 150 RPM sem luz (J), 1906 a 100 RPM sem luz (K), 1926 a 150 RPM sem luz (L), 1909 a 150 RPM com luz (M) e 1909 a 150 RPM sem luz (N) visualizada sob comprimento de onda de 254nm.

O isolado 1901 foi o que apresentou grande destaque entre os filtrados avaliados por produzir uma diversidade de compostos, ainda que este isolado possa não apresentar a taxtomina A, é relevante

que seja realizado a identificação destes compostos, para eventual uso em pesquisas relacionadas ao controle de fitopatógenos. Por outro lado, o isolado IB2507 não demonstrou banda para taxtomina A, resultado contrário ao trabalho realizado por Garcia (2008) levando a crer que o isolado em questão tenha perdido a capacidade de produzi-la.

Quantificação da Taxtomina A parcialmente purificada

Os dois métodos cromatográficos testados, conforme seu modo de eluição (isocrático e gradiente), apresentaram resultados satisfatórios, com picos simétricos e sem interferência de outros compostos, que não seja o analito de interesse Taxtomina A. Desta forma, o método escolhido para realizar a quantificação da Taxtomina A, foi o método com modo de eluição isocrático, por ser um método com um tempo de corrida menor (30 minutos) em relação ao modo de eluição gradiente (52 minutos). Os espectros obtidos no detector DAD, para o princípio ativo taxtomina A em ambos os métodos, foram os mesmos.

Os parâmetros de validação cromatográficos de seletividade, linearidade, limite de quantificação e recuperação, para a análise de Taxtomina A foram satisfatórios. A seletividade apresentou bons resultados, não houve interferência de outros resíduos no método além do solvente metanol grau HPLC e do padrão analítico Taxtomina A, garantido que o pico de resposta é exclusivamente do composto taxtomina A. O tempo de retenção do pico do padrão de Taxtomina A foi de 16,103 min, apresentando simetria no formato do pico. No tempo entre 1 e 5 minutos observou-se outro pico, este é referente a solução da fase móvel água-acetonitrila (75:25 v/v).

A curva analítica da Taxtomina A que expressa a equação da reta e sua linearidade está apresentada na Figura 7.

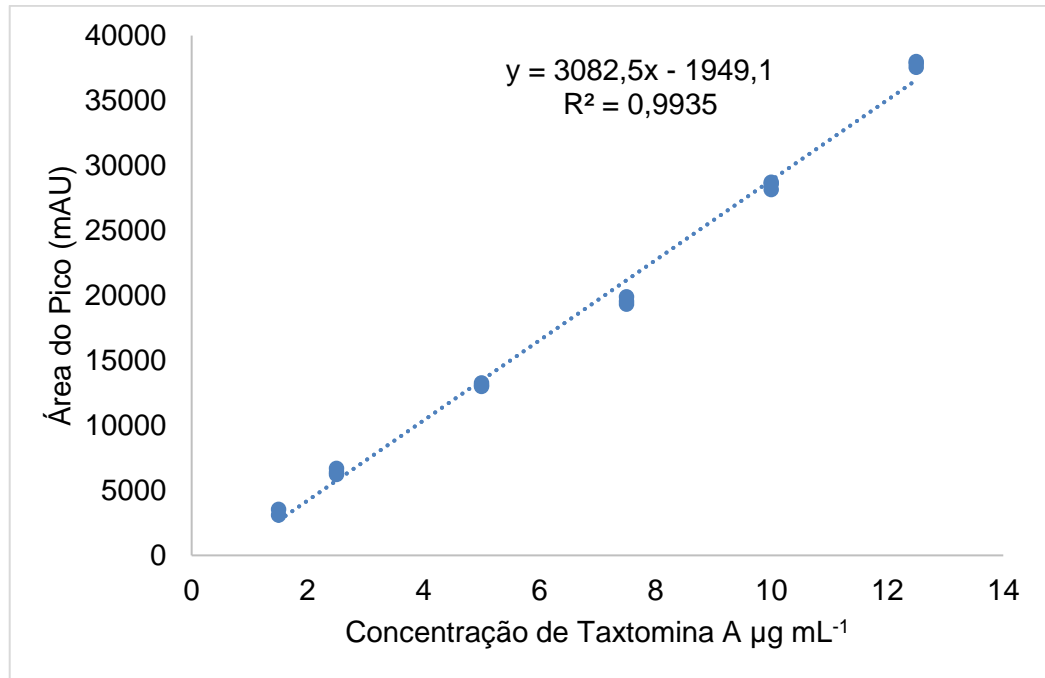


Figura 7 - Curva analítica da concentração de taxtomina A por unidades de área determinada por cromatografia líquida de alta pressão (CLAE).

A linearidade do método apresentou coeficiente de correlação $R^2 = 0,993$, sendo obtido um excelente resultado, estando de acordo com o recomendado pela Anvisa (2017), que define um coeficiente de correlação $\geq 0,99$.

O limite de quantificação foi de $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e a taxa de recuperação encontrada no presente estudo foi de 92,4 %, valor este considerado ideal, estando de acordo com os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos, os quais geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$ (GARP, 1999).

As amostras referentes aos isolados de *Streptomyces* não apresentaram detecção da fitotoxina Taxtomina A (Figura 8) nas amostras analisadas, porém, os isolados 1901 (Figura 9a); 1909 (Figura 9b) e 1926 (Figura 9c) apresentaram picos analíticos referentes a outros compostos próximos a taxtomina A em seus cromatogramas, o que torna necessário o uso de técnicas para identificar tais substâncias.

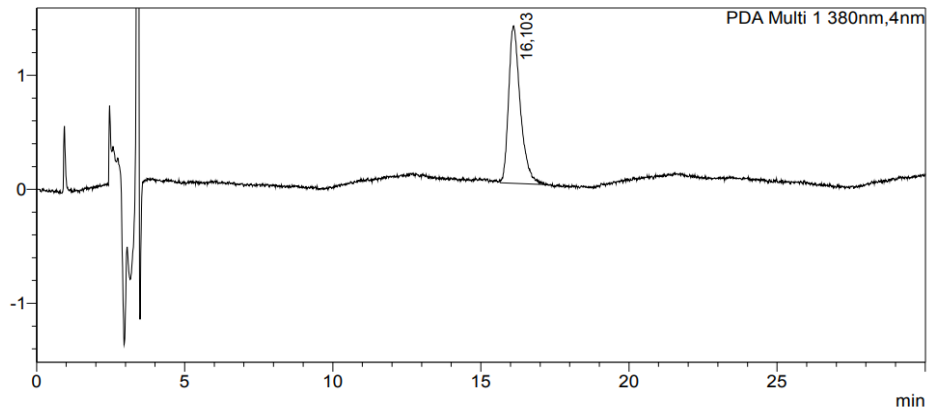
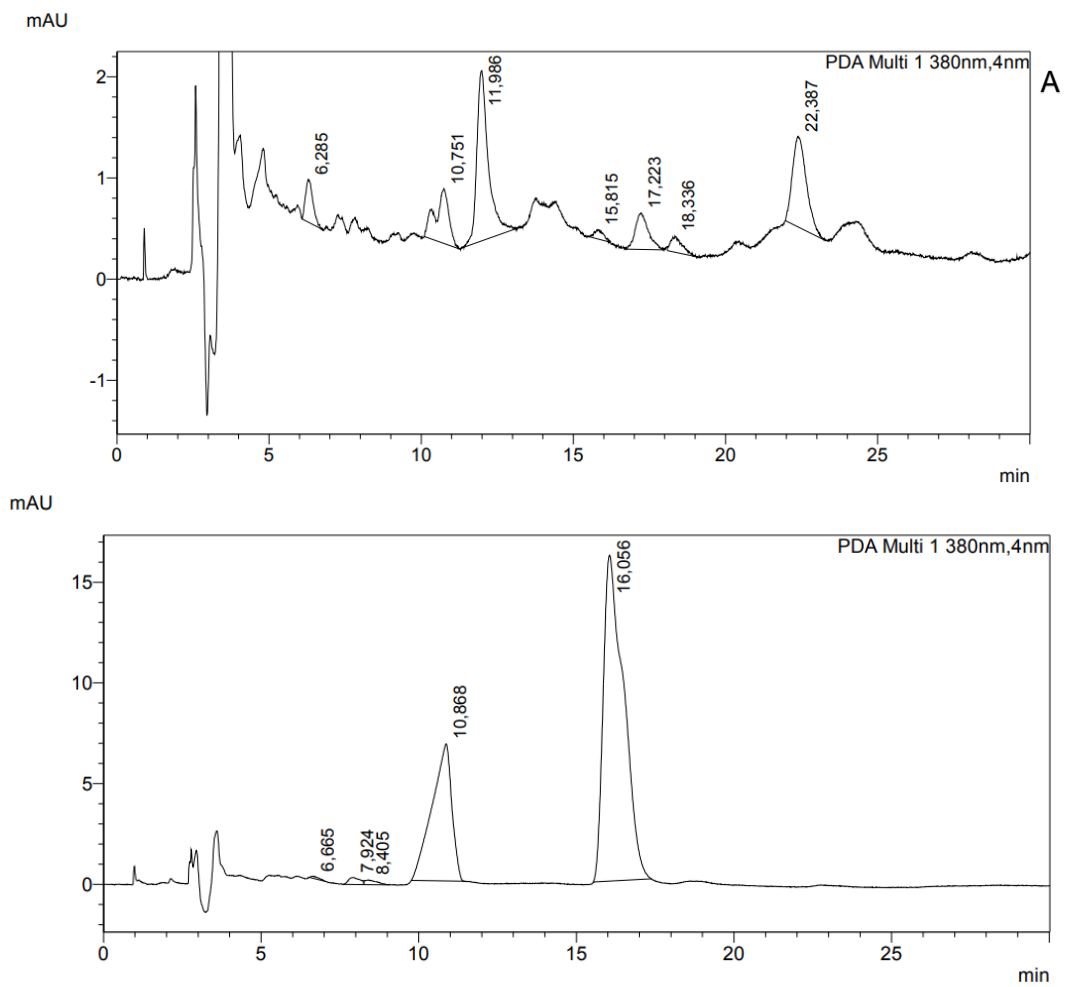


Figura 8 - Cromatograma obtido para taxtomin A comercial no detector DAD – HPLC.



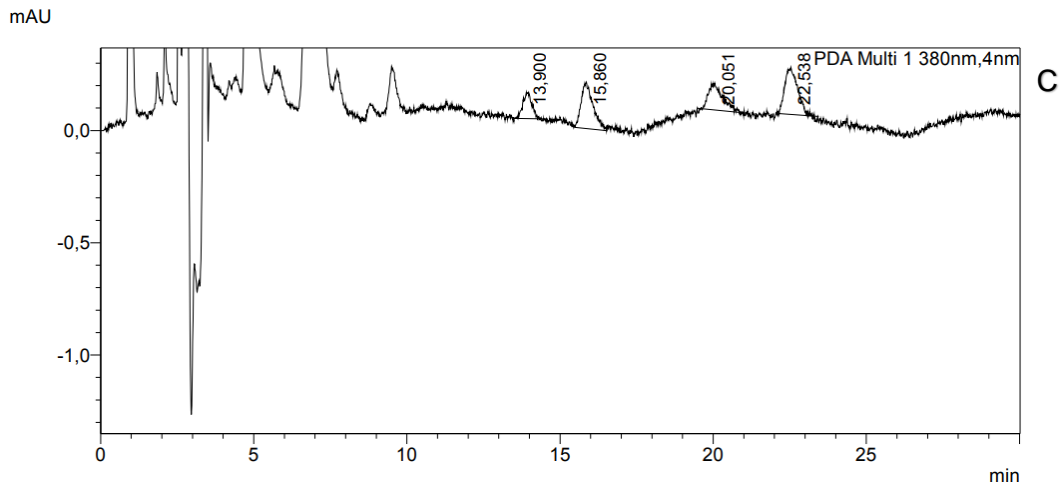


Figura 9 - Cromatogramas obtidos dos isolados de *Streptomyces* no detector DAD – HPLC. a) Isolado 1901. b) Isolado 1909. c) Isolado 1926.

4.3 Efeito da agitação, luminosidade e composição nutricional do meio líquido sobre a produção de metabólitos

Em relação às alterações nos requerimentos físicos para otimização na produção de metabólitos por *Streptomyces* spp. não houve diferença estatística entre todos os tratamentos e fatores avaliados, desta forma a agitação de 100 RPM quanto 150 RPM e a presença ou ausência de luz afetam da mesma forma a absorbância do filtrado avaliado, o que demonstra não haver alterações significativas nos metabólitos produzidos pelo microrganismo (Figura 10).

Os resultados obtidos neste trabalho foram contrários ao realizado por Techapun e colaboradores (2003), onde houve boa produção de metabólitos em agitações abaixo de 150 RPM, acima desta houve reduções drásticas em sua produção.

Os isolados 1901, 1906 e 1909 foram selecionados para avaliação de alterações nos requerimentos nutricionais como forma de otimização de metabólitos, dos três isolados testados, apenas o 1909 apresentou diferença estatística na absorbância para os diferentes meios de cultura, sendo o meio contendo casca de batata o tratamento com maior valor obtido, indicativo de maior concentração de substâncias produzidas pelo microrganismo (Figura 11).

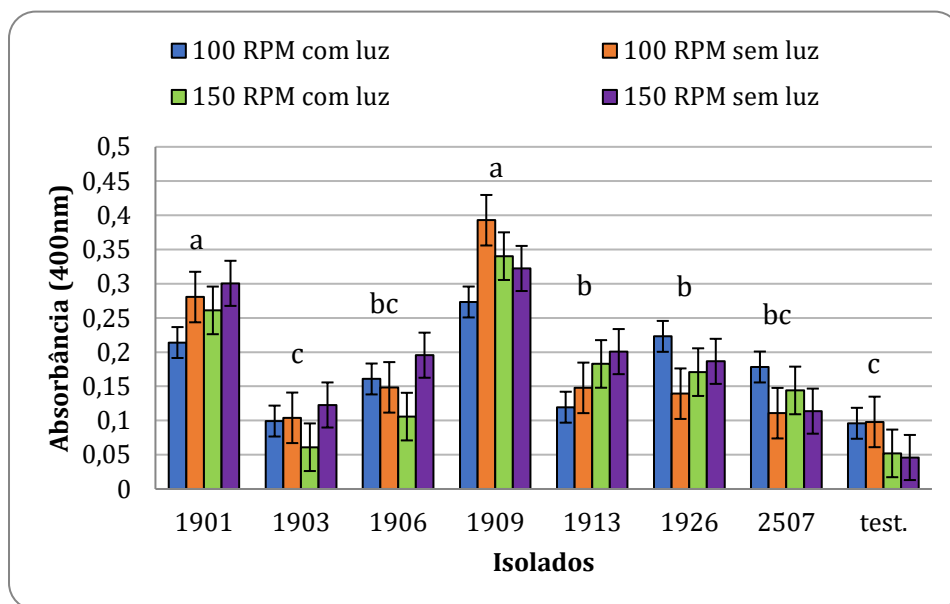


Figura 10 - Efeito da agitação e luminosidade na absorbância de filtrados de *Streptomyces* spp. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As barras nas colunas representam o erro padrão.

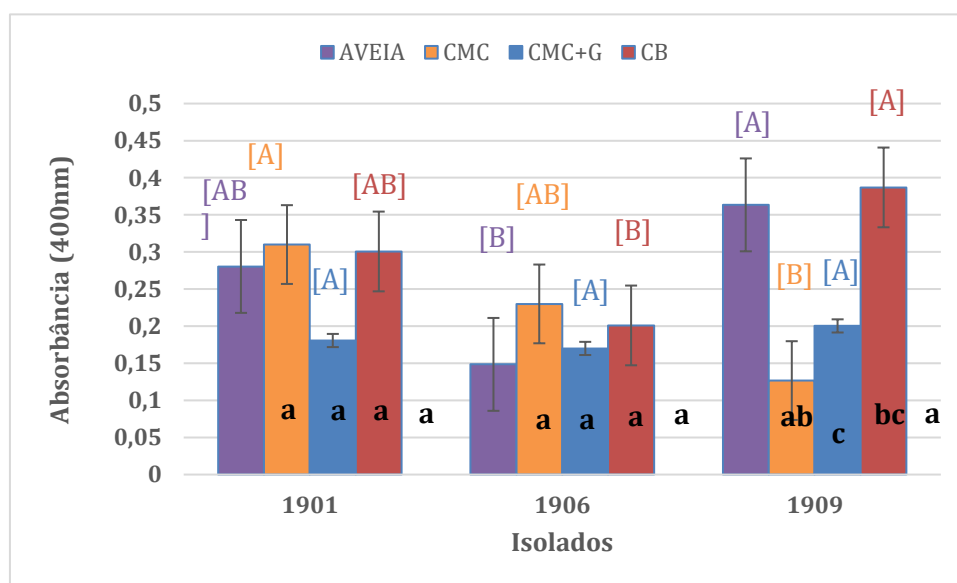


Figura 11 - Efeito de aveia (AV), carboximetil celulose (CMC), Carboximetil celulose mais glicose (CMC + G) e casca de batata (CB) na absorbância de filtrados de *Streptomyces* spp. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (maiúscula – Entre isolados, minúscula – Entre meios de cultura) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As barras nas colunas representam o erro padrão.

4.4 Efeito dos filtrados sobre tubérculos de batata

Em relação a avaliação dos efeitos de filtrados de *Streptomyces* spp., verificou-se diferentes graus de necrose sobre os discos de tubérculo, após 24 horas de aplicação pequenas alterações ocorreram sobre os discos, nos tratamentos com taxtomina A comercial e metanol houve alteração da coloração na área

aplicada, ficando em um leve tom amarronzado, nos tratamentos 1901, 1913 e 1926 apenas uma leve necrose pode ser observada, além disso houve alteração no aspecto dos tubérculos, gerando uma pequena lesão liquefeita sobre os mesmos, nos demais tratamentos não foi verificado necrose ou alterações (Figura 12).

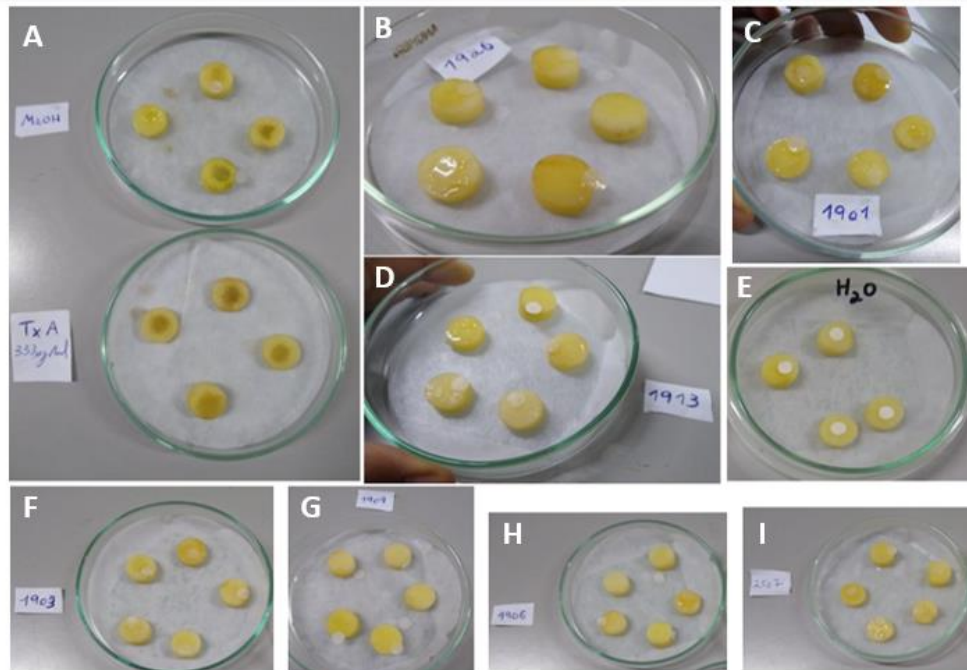


Figura 12- Discos de tubérculos 24 horas após aplicação de controles (A e E), filtrados 1926 (B), 1901 (C), 1913 (D), 1903 (F), 1909 (G), 1906 (H) e IB2507 (I).

Após 96 horas da aplicação, todos os tratamentos demonstraram necrose em diferentes quantidades de discos e em grau de intensidade (Tabela 2), os filtrados que demonstraram maior efeito sobre os tubérculos foram 1901, 1903 e 1926, com necrose de 95%, 80% e 75% dos discos de tubérculo respectivamente. O controle positivo (Taxtomina A comercial) demonstrou necrose sobre 100% dos discos tratados, enquanto que os controles negativos (água e metanol) não demonstraram alteração alguma (Figura 13).

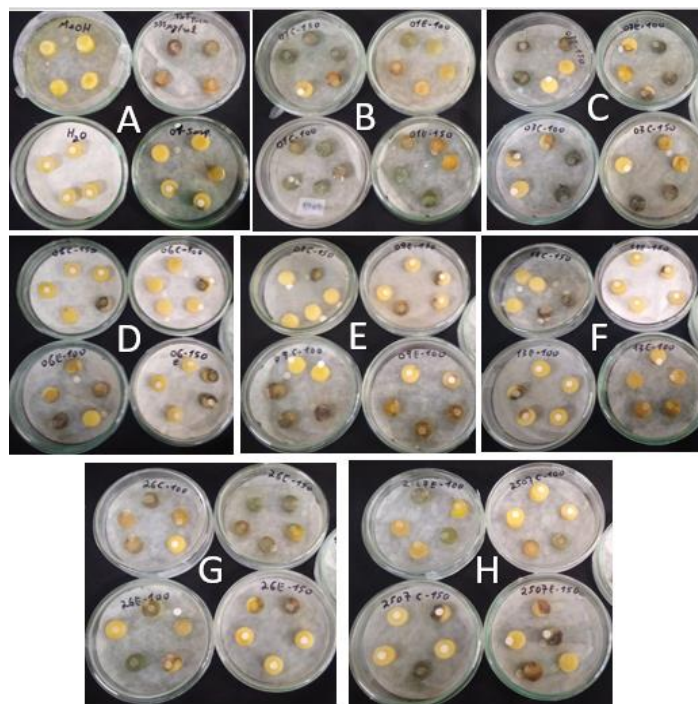


Figura 13- Discos de tubérculos 96 horas após aplicação dos controles (A) e dos filtrados 1901 (B), 1903 (C), 1906 (D), 1909 (E), 1913 (F), 1926 (G) e IB2507 (H).

Tabela 2 - Porcentagem de discos de tubérculos necrosados e grau de necrose 96 horas após a aplicação dos filtrados de *Streptomyces* spp.

ISOLADO	TUB. NECROSADOS (96H)	% DISCOS NECROSADOS	GRAU DE NECROSE
1901 SUSP	3	60	alto
1901	19	95	alto
1903	16	80	alto
1906	8	40	baixo
1909	11	55	médio
1913	10	50	baixo
1926	15	75	alto
2507	13	65	médio
MeOH	0	0	-
ÁGUA	0	0	-
Taxtomina A	5	100	alto

*Escala de necrose dos isolados: (Alto) – discos totalmente necrosados e deformados; (médio) – Discos parcialmente necrosados e/ou levemente deformados; (Baixo) – Disco levemente necrosado.

O surgimento de lesões necróticas no centro dos discos serviu como um indicador da presença de substâncias bioativas nos filtrados. Estas substâncias causam reações de hipersensibilidade sobre a área aplicada, levando à morte celular e conseqüentemente ao colapso do tecido, dando o aspecto liquefeito aos discos. Um maior grau de necrose pode estar relacionado à quantidade e/ou concentração de

substâncias produzidas pelos isolados, desta forma nota-se que os isolados 1901, 1903 e 1926 se destacaram devido à alta necrose dos discos de tubérculos após cinco dias (96 horas).

Resultados similares foram obtidos por Ismail e colaboradores (2020) e Alpiste (2018), onde respectivamente cinco e dez dias após a inoculação de diferentes isolados de *Streptomyces* spp. em discos de tubérculos, foi observado o surgimento de lesões necróticas em diferentes tamanhos e intensidade de acordo com cada isolado, demonstrando possíveis diversidade de substâncias e concentrações produzidas.

A necrose causada nos tubérculos ocorre devido a decomposição das substâncias formadoras do tecido do tubérculo, que são quebradas em moléculas menores, estas por sua vez servem como sinalizadores, ativando genes do patógeno responsáveis pela produção da mesma substância. A quantidade inicial pode afetar diretamente a quantidade produzida ao longo do tempo, o que leva a maior ou menor agressividade do patógeno. Um exemplo deste processo foi demonstrado por Lerat e colaboradores (2011), onde foi demonstrado a importância da suberina como um ativador de genes ligados à produção de metabólitos secundários por *Streptomyces*.

4.5 Efeito dos filtrados sobre a germinação de esporos de *Phakopsora pachyrhizi*

Conforme os resultados das avaliações anteriores, dos sete filtrados selecionou-se aqueles que apresentaram melhores resultados, estes foram submetidos a teste de germinação in vitro, a fim de avaliar seu potencial inibitório na germinação dos urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*.

Os isolados selecionados foram 1901, 1909 e 1926, os três isolados avaliados demonstraram efeito inibitório na germinação dos urediniósporos (Tabela 3), a aplicação do filtrado puro (100%) ainda que diferente entre os isolados foi a que mostrou maior inibição. Dentre os isolados, o filtrado 1901 teve grande destaque, em todas as concentrações avaliadas, o mesmo reduziu drasticamente a germinação dos urediniósporos, inibindo 100% quando aplicado na maior concentração e 96,77% na menor concentração (25%) (Figura 14).

O isolado 1926 obteve sucesso apenas quando aplicado puro, reduzindo a germinação em 99,03%, enquanto que as outras concentrações avaliadas reduziram as germinações em 23,22%, 23,22% e 20% (concentrações de 75%, 50% e 25% respectivamente). O isolado 1909 demonstrou melhores resultados nas duas maiores concentrações aplicadas, chegando a seu maior potencial inibitório quando aplicado puro, reduzindo a germinação em 76,45%, por outro lado, as duas menores concentrações foram altamente inefetivas, inibindo menos do que 20% da germinação dos urediniósporos.

A alta capacidade inibitória obtida pelo isolado 1901 demonstrou que este apresenta ação direta sobre urediniósporos, tal informação, aliada aos resultados dos testes cromatográficos e bioensaio com discos de tubérculos, deixaram claro a existência de uma substância ou o sinergismo entre várias, sendo efetivo no controle direto de *P. pachyrhizi*.

Paula (2019) em experimento verificou o potencial de taxtomina A parcialmente purificada

obtida de *Streptomyces* na inibição da germinação de urediniósporos, obtendo valores significativos porém menores àqueles obtidos aqui com isolado 1901, o que corrobora para a conclusão deste ser um isolado altamente diverso e/ou eficiente na produção de metabólitos secundários bioativos.

Ainda que seu potencial inibitório tenha sido obtido, não é possível relatar o modo de ação pelo qual os filtrados inibem a germinação dos urediniósporos, segundo a literatura diversos modos podem vir a afetar os microrganismos como: inibição de síntese de ergosterol, proteínas, ácidos nucleicos, mitose, respiração, síntese de parede celular, e disruptores de função da membrana plasmática (Carlile et al. 2001).

A descrição do modo de ação de um metabólito secundário é algo desafiador, devido a fatores como a multiplicidade de sítios moleculares de ação em potencial e complexidade de substâncias produzidas pelos microrganismos (TREMACOLDI, SOUZA FILHO, 2006), desta forma análises mais específicas precisam ser executadas para se afirmar em qual modo os filtrados avaliados se encaixam.

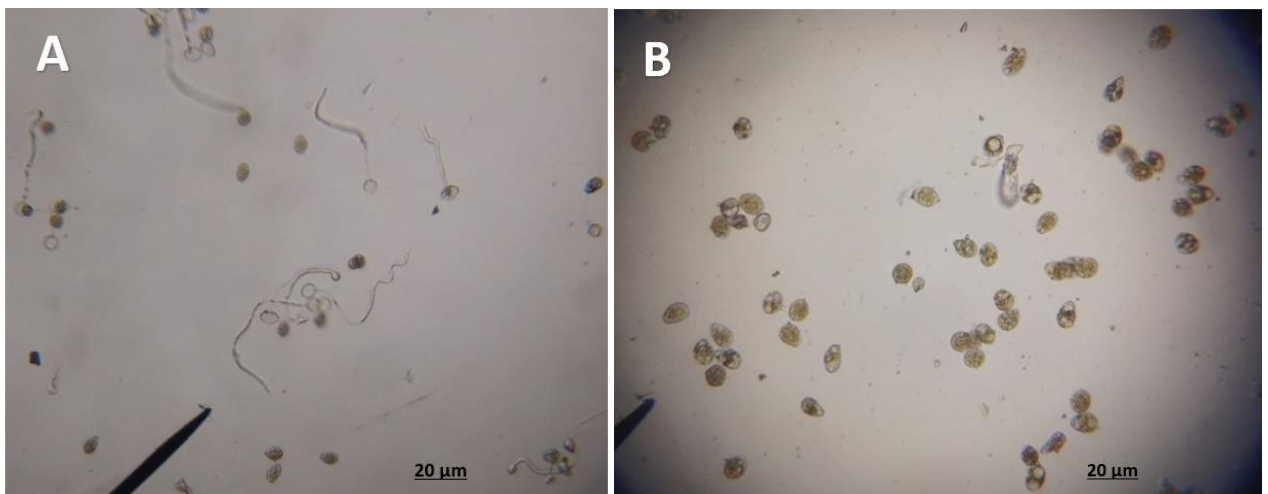


Figura 14 - Urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi* após 6 horas em contato com água (A) e filtrado 1901 em concentração de 25% (B). Aumento de 20 x.

Tabela 3 - Porcentagem de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi* germinados após 6 horas de contato direto com filtrados dos isolados 1901, 1909 e 1926 nas concentrações de 100, 75, 50 e 25%. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si no teste de Tukey a 5%

Tratamento	Germinação (%)	Inibição da germinação (%)
Água	100	0 d
Fungicida	0.00	100 a
Filtrado 1901 (100%)	0.00	100 a
Filtrado 1901 (75%)	0.48	99.51 a
Filtrado 1901 (50%)	1.61	98.38 a
Filtrado 1901 (25%)	3.23	96.77 a
Filtrado 1909 (100%)	23.55	76.45 b
Filtrado 1909 (75%)	37.58	62.41 b
Filtrado 1909 (50%)	82.26	17.74 cd
Filtrado 1909 (25%)	81.61	18.38 cd
Filtrado 1926 (100%)	0.97	99.03 a
Filtrado 1926 (75%)	76.77	23.22 c
Filtrado 1926 (50%)	76.77	23.22 c
Filtrado 1926 (25%)	80.00	20 c
CV% = 14,83%		

4.6 Bioensaio taxtomina A comercial x *Phakopsora pachyrhizi* em soja

4.6.1 Seleção do solvente

Para a aplicação dos filtrados sobre folhas de soja de forma a cobrir toda a superfície e garantir adesão do material aplicado nas folhas foi realizado teste com diferentes solventes, a fim de selecionar aquele que apresentasse melhores resultados sem apresentar fitotoxicidade ao tecido vegetal. Dentre os solventes avaliados, o que apresentou melhor resultado foi o metanol, sendo que as plantas pulverizadas com este solvente não demonstraram nenhuma fitotoxicidade em nenhuma das concentrações avaliadas, o etanol demonstrou leves sintomas de fitotoxidez, o qual diminuiu conforme redução nas concentrações do solvente, nas concentrações de 5 e 10% não houveram lesões. Por fim o dimetilsulfóxido (DMSO) foi o que teve maior fitotoxidez nas plantas, levando a morte total destas em quase todas as concentrações avaliadas, assim como etanol menores concentrações levaram a lesões menores, porém ainda levaram a queda das folhas (Figura 15).

A partir dos resultados visuais obtidos, decidiu-se pela seleção do metanol como solvente para a diluição do padrão de taxtomina A, tal seleção se deve ao fato deste solvente ser o único a não causar nenhuma fitotoxidez quando aplicado puro (100%) e apresentar boa adesão as folhas, etanol e DMSO

foram capazes de causar fitotoxidez.

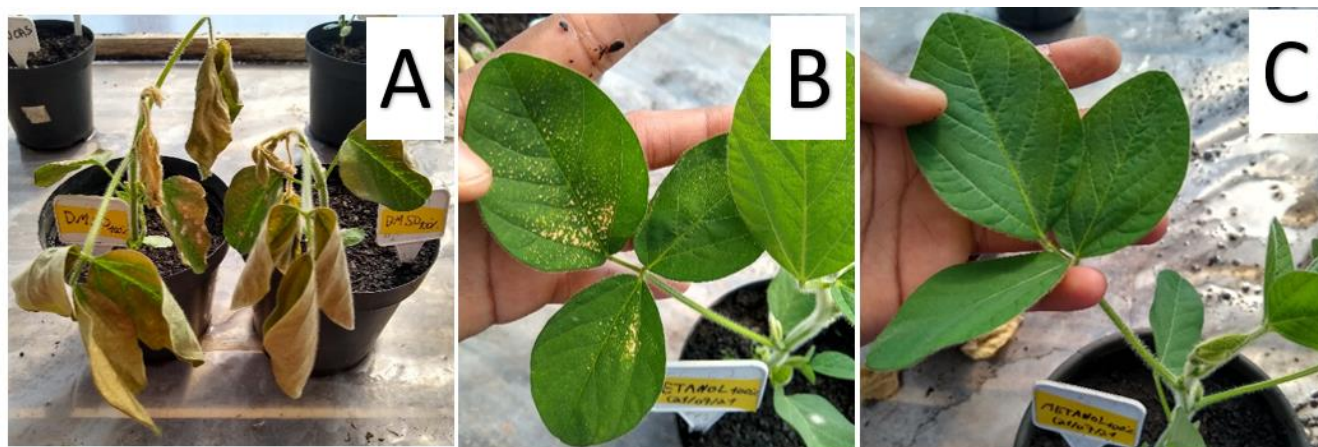


Figura 15 - Efeito da aplicação de Dimetil sulfóxido (A), etanol (B) e metanol (C) nas concentrações de 100% em folhas de soja 5 dias após aplicação.

Fonte: autor (2022).

4.6.2 Efeito da taxtomina A comercial aplicada em plantas de soja contra *Phakopsora pachyrhizi*

A taxtomina A comercial teve comportamento diferente conforme o trifólio a qual foi aplicado, em todas as plantas no segundo trifólio (V2) houve fitotoxidez, que foram mais intensas conforme maior concentração de taxtomina A comercial aplicada, em algumas plantas a intensidade foi tão alta que levou à queda precoce das folhas, inviabilizando sua avaliação (figura 16 e figura 17).

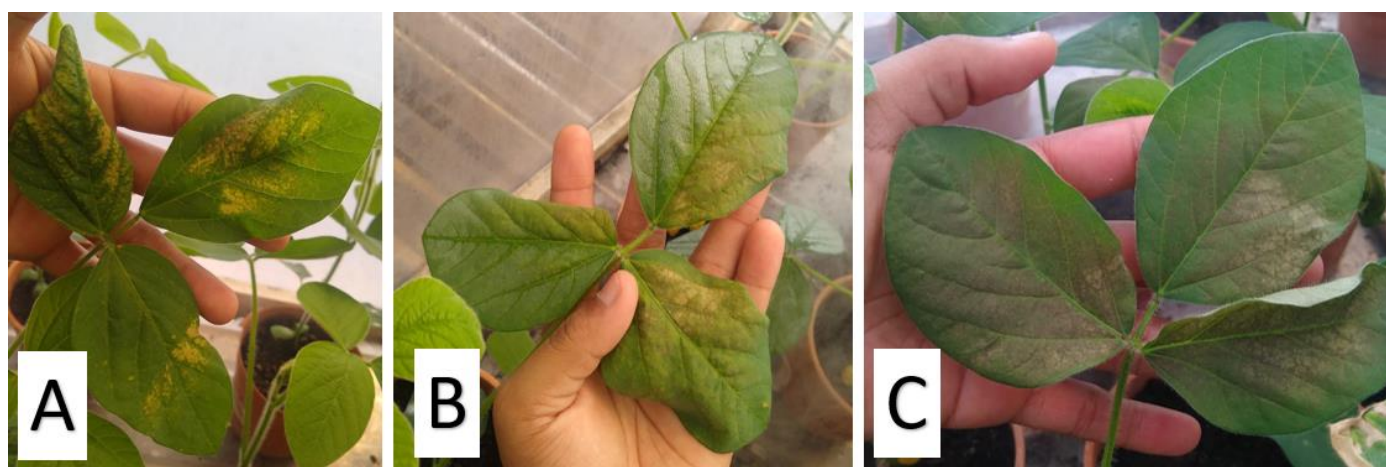


Figura 16- Fitotoxidez em trifólio "V2" de soja, sete dias após a aplicação de taxtomina A nas concentrações de 2,5 µg/mL (A), 10 µg /mL (B) e 50 µg /mL (C).

Fonte: autor (2022).



Figura 17 - Fitotoxidez em trifólio “V2” de soja, 12 dias após a aplicação de taxtomina A nas concentrações de 2,5 µg/mL (A), 10 µg /mL (B) e 50 µg /mL (C).
Fonte: autor (2022).

Em relação ao primeiro trifólio (V1), não houve fitotoxidez para nenhuma das concentrações avaliadas, todas elas apresentaram efeito positivo na diminuição da severidade da doença aos 18 dias após a inoculação, não demonstrando diferença significativa estatística entre os tratamentos e o controle positivo, a severidade obtida foi de 0.12, 1,01., 0.18 e 0 para as concentrações de 50 µg /mL, 10 µg /mL e 2,5 µg /mL respectivamente, enquanto que para água e metanol as severidades foram de 42.92 e 40 (Figura 18).

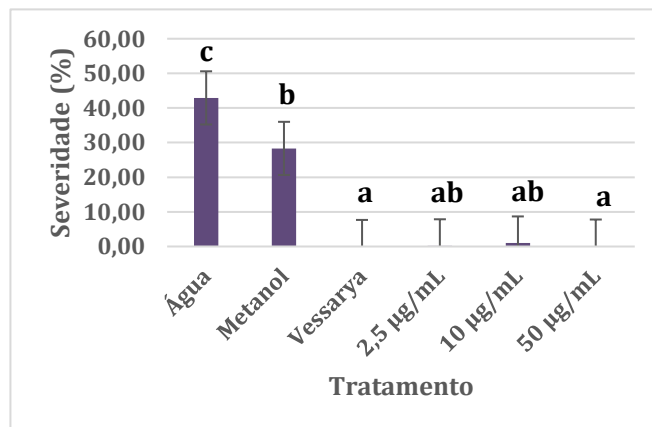


Figura 18 - Severidade em trifólio “V1” de soja, 18 dias após a aplicação de taxtomina A nas concentrações de 2,5 µg /mL (A), 10 µg /mL (B) e 50 µg /mL (C). Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As barras nas colunas representam o erro padrão.

A ocorrência de fitotoxidez no segundo trifólio e ausência no primeiro trifólio, pode ser explicada pela ação da taxtomina A à nível celular e de expressão gênica, estudos anteriores demonstraram a capacidade da taxtomina A em inibir a síntese de celulose (KING, CALHOUN, 2009).

A redução em sua produção leva a expressão de genes que ativam a síntese de outros polissacarídeos, como pectina e hemicelulose como forma de compensar a falta de produção de celulose, e tal alteração ativa uma cascata de reações nas plantas, acarretando a uma resposta de defesa, a qual ocorre pela morte programada das células (MCP), deforma a evitar maiores danos aos tecidos próximos (DUVAL *et al*, 2005).

No presente estudo, o que aparenta ser fitotoxidez é a ocorrência da morte celular programada ocorrendo após a aplicação da taxtomina, o fato dela ocorrer apenas no segundo trifólio é devido ao estágio de desenvolvimento da planta, o tecido não estava completamente formado no momento da aplicação, ou seja, a síntese de celulose ainda estava sendo realizada neste trifólio, que acabou sendo inibida pela taxtomina, por outro lado, no primeiro trifólio não é visto nenhum sintoma de MCP, pois neste o tecido foliar se encontra totalmente desenvolvido e a síntese de celulose já foi finalizada, desta forma não sendo afetado pela taxtomina.

4.7 Bioensaio filtrados x *Phakopsora pachyrhizi* em soja

4.7.1 Teste de fitotoxicidade dos filtrados em folhas de soja

A partir da avaliação visual das plantas tratadas com as diversas concentrações dos filtrados, observou-se aumento de fitotoxidez proporcional à concentração aplicada, em todas as plantas. Foi possível notar pequenas pontuações necróticas e escurecimento das nervuras, nas maiores concentrações (100% e 75%) houve amarelecimento do tecido foliar, o que foi pouco expressivo na concentração de 50% e ausente na de 25% (Figura 19).

Por se tratar de um filtrado bruto, há uma ampla diversidade de metabólitos secundários, portanto torna-se inviável afirmar qual ou quais os responsáveis pela reação de fitotoxidez existente, uma hipótese é que as substâncias presentes aparentam ser absorvidas e transportadas a curtas distâncias na folha, agindo sobre a atividade fotossintética da planta e apresentar efeito de contato com o tecido foliar, uma vez que levaram ao escurecimento das nervuras, coloração amarelada das folhas e necrose do limbo foliar respectivamente. A fim de avaliar a eficiência do filtrado de forma a não afetar a integridade do tecido foliar, optou-se por reduzir as concentrações para 10% e 2,5%

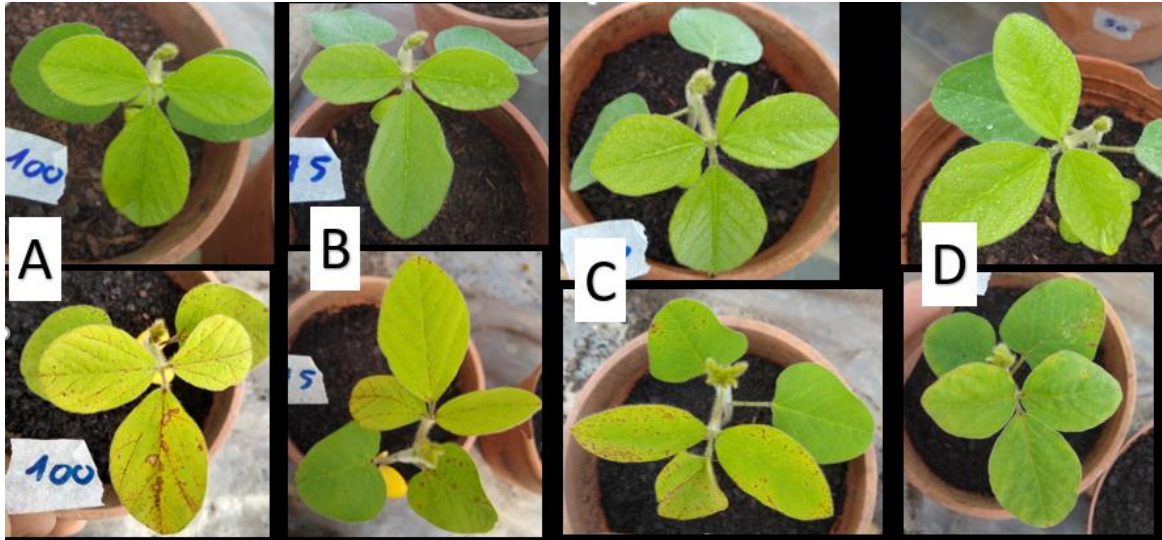


Figura 19 - Efeito de filtrado 1901 nas concentrações de 100% (A), 75% (B), 50% (C) e 25% (D), cinco dias após a aplicação.

4.7.2 Efeito do filtrado na severidade e em respostas bioquímicas em plantas de soja contra *Phakopsora pachyrhizi*

Para o bioensaio *in planta*, foram selecionados apenas os isolados 1901 e 1909, pelo fato de serem os filtrados com maior atividade inibitória no teste de germinação realizado, conforme teste de fitotoxicidade realizado anteriormente, foi decidido avaliar as concentrações de 10% e 2,5%, devido ao fato de concentrações elevadas levarem a clorose e necrose das folhas.

4.7.2.1 Severidade

Os filtrados de ambos os isolados testados se mostraram eficientes no controle da severidade da doença de maneira indireta, o tratamento que demonstrou maior eficiência foi o isolado 1909 a 2,5% de concentração, o qual reduziu em três vezes a severidade da doença comparado ao tratamento controle (severidades de 2,5% e 8% respectivamente). Os outros tratamentos avaliados se mostraram estatisticamente iguais entre si, com valores pouco abaixo do controle, sendo de 7,75%, 6,65% e 6,5% para os filtrados 1901 a 2,5%, 1901 a 10% e 1909 a 10% respectivamente. (Figura 20).

Em relação à clorofila, não houve alterações expressivas em seus valores, resultado que demonstra não haver interferência positiva ou negativa dos filtrados sobre este parâmetro (Figura 21).

Para o isolado 1901 é possível observar uma relação inversa entre concentração e severidade. A severidade decaiu com o aumento da concentração do filtrado, o que apresenta um sentido lógico, uma vez que maiores concentrações tendem a apresentar maiores quantidades de substâncias, por outro lado, o isolado 1909 mostrou ter maior eficiência na menor concentração avaliada reduzindo a severidade duas vezes mais do que a maior concentração.

Os resultados aqui obtidos são diferentes os obtidos para o teste de germinação *in vitro*, demonstrando que o isolado 1901 aparenta ter maior eficiência quando em contato direto com os esporos

do patógeno, sendo menos eficiente na ativação de mecanismos de defesa da planta. O isolado 1909 por outro lado, apresentou menor inibição da germinação dos esporos, porém em dose baixa colaborou na diminuição da severidade, resultado interessante, pois apresenta alta eficiência de controle direto e indireto sobre o patógeno.

Fatores que podem ter colaborado para a menor eficiência dos filtrados sobre a severidade são a luminosidade e temperatura, em condições de casa de vegetação ocorre uma ampla variação nestes fatores abiótico, o que pode ter interferido diretamente nos filtrados, assim como no desenvolvimento e respostas da planta frente a aplicação dos produtos.

Paula (2019) obteve resultados similares no uso de taxtomina parcialmente purificada sobre a ferrugem asiática da soja, apresentando eficiência nos testes *in vitro*, porém sem sucesso em casa de vegetação e campo. Diversos estudos demonstraram a eficiência de metabólitos produzidos por *Streptomyces* como indutor de resistência, dentre elas a taxtomina quando aplicado em outros patossistemas (GARCIA, 2008; BRAND, 2016), observa-se que sua eficiência é variável em função do patossistema, condições e concentrações a qual é aplicado (Brand, 2016)

Desta forma, mediante o potencial já identificado da taxtomina e outras substâncias produzidas por *Streptomyces* em diversos patossistemas e *in vitro* para *P. pachyrhizi*, alterações pontuais como controle de fatores abióticos, bem como das dosagens aplicadas são necessárias para compreensão e melhores resultados em condições de casa de vegetação.

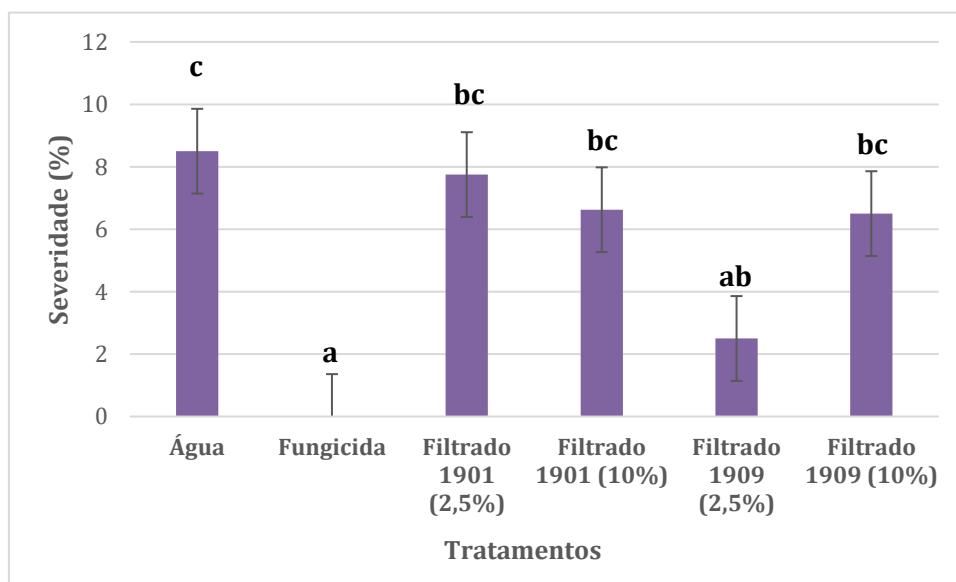


Figura 20 - Severidade em trifólio “V1” de soja, 12 dias após a aplicação dos filtrados dos isolados 1901 e 1909 nas concentrações de 2,5% (v/v) e 10% (v/v). Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As barras nas colunas representam o erro padrão.

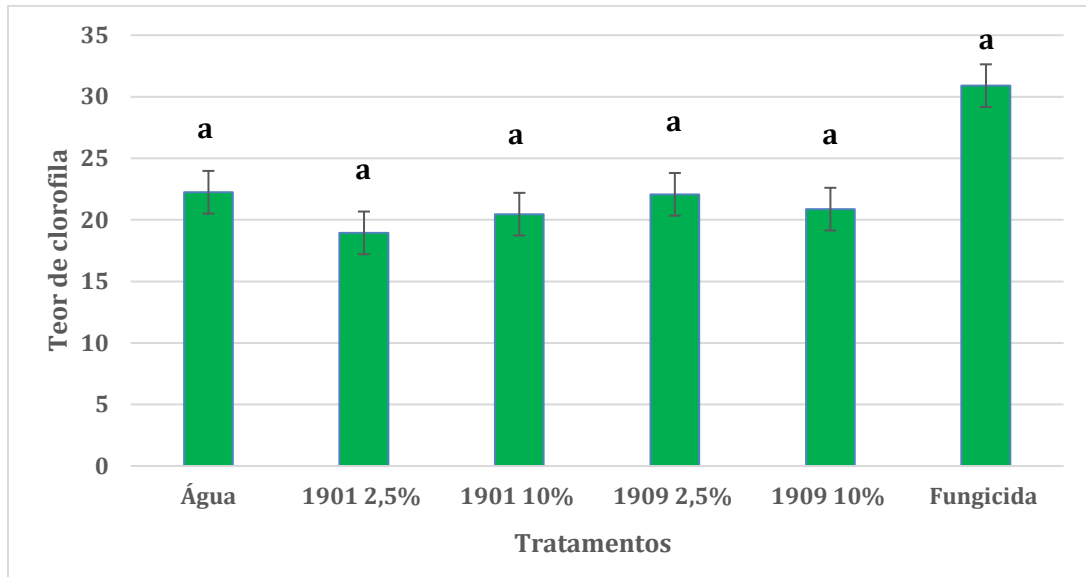


Figura 21 - Teor de clorofila em trifólio “V1” de soja, 12 dias após a aplicação dos filtrados dos isolados 1901 e 1909 nas concentrações de 2,5% (v/v) e 10% (v/v). Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As barras nas colunas representam o erro padrão.

4.7.2.2 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas de forma preliminar, com a finalidade de avaliar possíveis efeitos dos filtrados sobre a atividade e respostas bioquímicas da planta após exposição aos tratamentos, nenhuma análise estatística foi realizada durante tais avaliações, desta forma vale salientar que estudos mais aprofundados devem ser realizados futuramente para afirmar diferenças significativas dos efeitos dos diferentes tratamentos.

Atividade de guaiacol peroxidase

Referente à atividade de guaiacol peroxidase, apenas o filtrado do isolado 1901 apresentou resultado expressivo anterior à inoculação do patógeno, sendo quase o dobro da atividade obtida pela água (controle) no momento em questão. Além disso, o mesmo apresentou maior atividade da enzima ao longo do intervalo de tempo avaliado após a inoculação do patógeno, aumentando em quatro vezes ao final do tempo avaliado, para o isolado 1909 houve também aumento da atividade da peroxidase, porém esta se demonstrou praticamente neutra durante as 72 horas iniciais de avaliação, iniciando seu aumento apenas após este intervalo de tempo, alcançando valor superior ao do controle (água) e inferior ao do isolado 1901 (Figura 22).

Ainda que análises estatísticas não tenham sido realizadas, é possível observar uma diferença do isolado 1901 previamente à inoculação da *P. pachyrhizi* comparado aos valores obtidos para a água, demonstrando assim haver efeito deste sobre a atividade da peroxidase. Esta enzima é responsável por diversas reações nas plantas, dentre elas a lignificação dos tecidos infectados da planta, criando uma barreira física que dificulta o acesso do fungo patogênico, retardando ou até inibindo o sucesso do seu

processo de infecção. O aumento da atividade da peroxidase significa maior ativação das defesas da planta, concedendo-lhe assim resistência ao ataque dos patógenos (CAMPOS, SILVEIRA, 2003)

O aumento da atividade da peroxidase observada para o isolado 1901 pode ter sido o fator que contribuiu para a redução da severidade do patógeno, porém não parece estar relacionada à redução da mesma para o filtrado do isolado 1909, indício de que este último está envolvido na ativação de outros mecanismos de defesa da planta. Garcia e colaboradores (2008), assim como Paula (2019), verificaram o aumento da atividade de peroxidase em sorgo e soja (respectivamente), após tratadas com taxtamina parcialmente purificada, substância esta que não foi encontrada nos isolados avaliados neste experimento, o que colabora para a hipótese de que outras substâncias produzidas por espécies de *Streptomyces* podem também induzir a ativação de mecanismos de defesa das plantas. Ainda que os resultados demonstrem ser promissores, trata-se de um experimento preliminar, desta forma estudos mais aprofundados devem ser feitos para confirmação dos resultados obtidos.

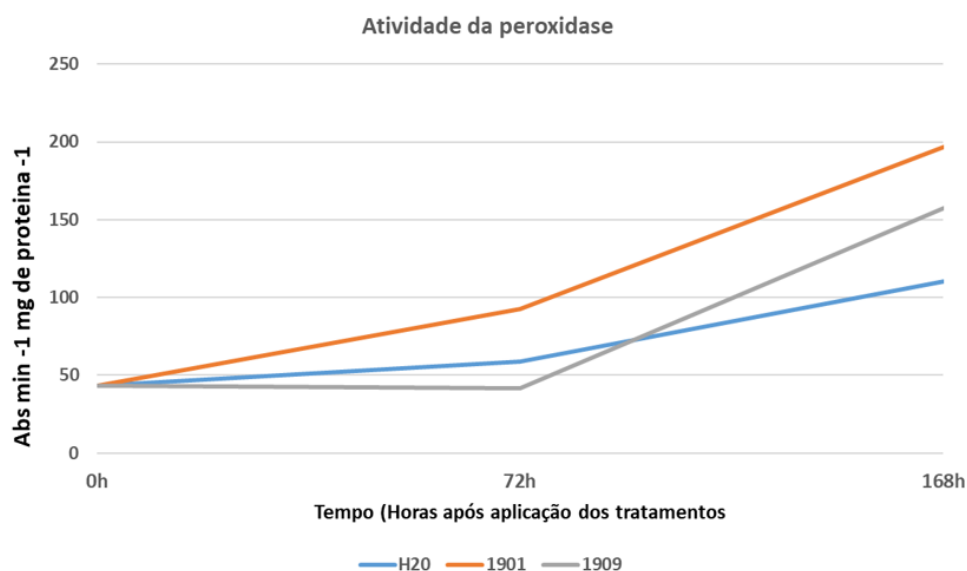


Figura 22 - Atividade de guaiacol peroxidase quantificada em folhas de soja mantidas em casa de vegetação e pulverizadas com diferentes filtrados e inoculação de urediniósporos de *P. pachyrizhi* 72 horas após aplicação dos tratamentos.

Atividade da beta-1-3-glucanase

A atividade da enzima beta-1-3-glucanase apresentou similaridade entre os isolados 1901 e 1909, porém comportamento inverso ao tratamento água, ambos os filtrados demonstraram aumento de atividade do momento inicial até o momento da inoculação do patógeno, quando então começa a decrescer e estabilizar (Figura 23).

Ainda que ambos os filtrados aparentam ter um padrão de aumento e estabilização na atividade da enzima beta-1-3-glucanase, observa-se que o filtrado 1901 apresenta uma ativação das reações catalisadoras de forma mais eficiente, ou seja, uma maior quantidade da enzima é ativada no mesmo período de tempo, o que pode colaborar para maior defesa da planta nos momentos iniciais da aplicação

do filtrado em específico.

As enzimas beta-1-3-glucanase atuam hidrolisando as ligações glicosídicas de glucanas lineares ou parcialmente ramificadas, estas que estão presentes em diversos organismos, entre eles os fungos e leveduras, sendo um material constituinte de sua parede celular responsável por lhe proporcionar rigidez e integridade. A degradação realizada pela enzima sobre estes polímeros de açúcar acarreta na liberação de oligossacarídeos, que servem como elicitores, que virão a ser reconhecidos como um padrão molecular associado ao patógeno (PAMP), levando a uma cascata de sinalização por ativação da defesa sistêmica da planta (FESSEL, ZUCCARO, 2016).

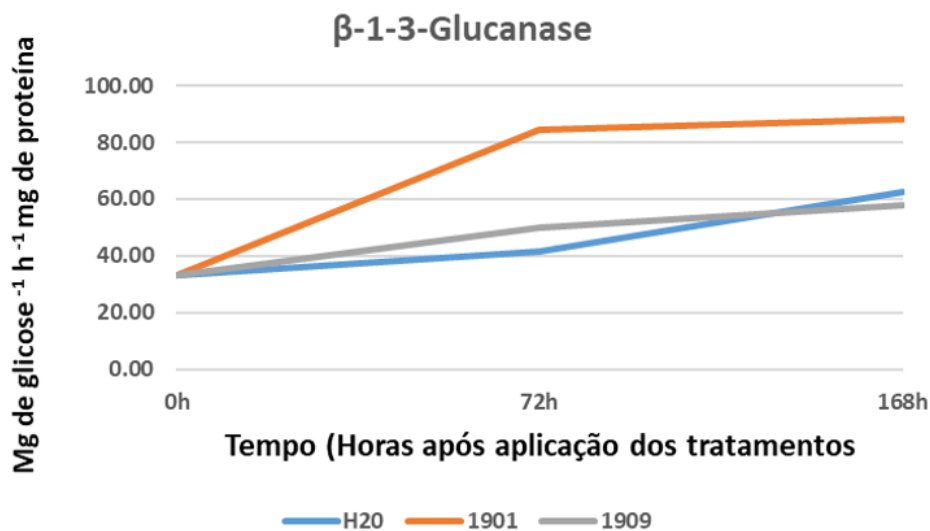


Figura 23 - Atividade de beta-1-3-glucanase quantificada em folhas de soja mantidas em casa de vegetação pulverizadas com diferentes filtrados e inoculação de *P. pachyrizhi* 72 horas após aplicação dos tratamentos.

A aplicação de taxtomina parcialmente purificada sobre folhas de *A. thaliana* demonstrou alteração sobre diversos parâmetros bioquímicos da planta, como na atividade de enzimas como a peroxidase, quitinase e beta-1-3-glucanase, além de mudanças no influxo de Ca^{2+} e morte celular programada (TEGG *et al*, 2005). A aplicação da substância em tecidos jovens da planta resulto na rápida resposta imunológica desta, o que é um fator crucial para o sucesso da defesa das plantas frente a interação contra patógenos (TEGG *et al*, 2005).

Por se tratar de um filtrado bruto, não é possível definir as substâncias atuando nas respostas bioquímicas neste experimento, porém o resultado do teste preliminar aqui realizado é um indicativo da existência de uma ou mais substâncias com potencial indução de resistência. Desta forma, torna-se necessário a identificação das substâncias atuantes, bem como realização de novos experimentos para observação de dosagens mais eficientes em alterações bioquímicas em plantas de soja.

5. CONCLUSÕES

Os sete isolados avaliados neste trabalho apresentaram um grau de necrose sobre discos de tubérculo de batata, sendo que os isolados 1901, 1903 e 1926 apresentaram maior grau, o isolado 1901 foi o de maior destaque por apresentar incidência de necrose similar a taxtomina A comercial, que foi de 100%.

Para o parâmetro biomassa a agitação teve influência apenas para os isolados 1906, 1909, 1926 e IB2507, sendo que estes três primeiros apresentaram maior quantidade de biomassa na agitação de 100 RPM, enquanto que o isolado IB2507 foi na agitação de 150 RPM, o fator luminosidade não afetou estatisticamente nenhum dos isolados.

A agitação, a luminosidade e os meios de cultura testados não demonstraram aumento na produção de metabólitos secundários levando-se em conta a absorbância obtida para cada isolado e tratamento, sendo necessário avaliações com novas alterações na composição nutricional como forma de otimização.

A partir das avaliações cromatográficas realizadas (CCD e CLAE) foi possível concluir que nenhum dos isolados produz a fitotoxina taxtomina A. Os isolados 1901, 1909 e 1926 de *streptomyces* spp. apresentaram bandas e picos com tempo de retenção similar ao da taxtomina A, porém o espectro obtido revelou ser outra substância.

Os isolados 1901, 1909 e 1926 apresentaram efeito inibitório na germinação de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*, sendo o isolado 1901 o de maior destaque, por inibir fortemente a germinação em quase todas as concentrações avaliadas.

As atividades de enzimas relacionadas à defesa da planta aparentam ter sido aumentadas quando a aplicação dos filtrados foi realizada, porém estudos mais aprofundados devem ser realizados a fim de concluir seu real potencial relacionado a bioquímica das plantas.

A taxtomina A comercial diminuiu drasticamente a severidade da *Phakopsora pachyrhizi* em folhas de soja em casa de vegetação, porém em altas concentrações levou a clorose, necrose e desfolha prematura das folhas. Os filtrados 1901 e 1909 dos isolados de *Streptomyces* spp. reduziram a severidade da doença, sendo o isolado 1909 na concentração de 2,5% o mais eficiente.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAZEK, A. S.; EL-NAGGAR, M. E.; ALLAM, A.; MORSY, O. M.; OTHMAN, S. I.. Microbial natural products in drug discovery. **Processes**, v. 8, 19 p., 2020. (DOI: 10.3390/pr8040470)
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA); Resolução RE nº 166,de 24/07/2017.
- AGRIOS, G. N. Plant Pathology. **Academic Press**, 5 ed, 922 p., 2004.
- AGROFIT. Sistemas de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em:
<http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acessado em 20 de julho de 2021.
- ALAM, K.; MAZUMBER, A.; SIKDAR, S.; ZHAO, Y-M.; HAO, J.; SONG, C.; WANG, Y.; SARKAR, R.; ISLAM, S.; ZHANG, Y.; LI, A. *Streptomyces*: The biofactory of secondary metabolites. **Frontiers in Microbiology**, 2022. (DOI: 10.3389/fmicb.2022.968053)
- ALPISTE, M. C. **Avaliação da agressividade de *streptomyces* spp. em cultivares de batata e quantificação da taxtomina a produzida por diferentes espécies do gênero**. 74f. Dissertação (Mestrado em sanidade, segurança alimentar e ambiental no agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, São Paulo, 2018.
- ALVES, S. A. M.; FURTADO, G. Q.; BERGAMIN FILHO, A. Influência das condições climáticas sobre a ferrugem da soja. In: ZAMBOLIM, L. (Eds). Ferrugem asiática da soja. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, p. 37-59, 2006.
- BABCOCK, M. J.; ECKWALL, E. C.; SCHOTTEL, J. L. Production and regulation of potato-scab-inducing phytotoxins by *Streptomyces scabies*. **Journal of General Microbiology**, v. 139, n. 7, p. 1579–1586, jul. 1993.
- BALMER, A.; PASTOR, V.; GAMIR, J.; FLORS, V.; MAUCH-MANI, B. The ‘prime-ome’: towards a holistic approach to priming. **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 7, p. 443–452, jul. 2015. (DOI: 10.1016/j.tplants.2015.04.002)
- BASILIO, A.; GONZALEZ, I.; VICENTE, M. F.; GORROCHATEGUI, J.; CABELLO, A.; GONZALES, A.; GENILLOU, O. Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 4, p. 814–823, out. 2003. (DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.02049.x)
- BERESTETSKIY, A. O. A review of fungal phytotoxins: from basic studies to practical use. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 453–465, set. 2008. (DOI: 10.1134/S0003683808050013)
- BIGNELL, D. R. D.; FRANCIS, I. M; FRYANS, J. K.; LORIA, R. Thaxtomin A Production and Virulence Are Controlled by Several *bld* Gene Global Regulators in *Streptomyces scabies*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 27, n. 8, p. 875–885, ago. 2014. (DOI: 10.1094/MPMI-02-14-0037-R)
- BIGNELL, D. R. D.; FYANS, J. K.; CHENG, Z. Phytotoxins produced by plant pathogenic *Streptomyces* species. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 2, p. 223–235, fev. 2014.

BISCHOFF, V.; COOKSON, S. J.; WU, S.; SCHEIBLE, W. Thaxtomin A affects CESA-complex density, expression of cell wall genes, cell wall composition, and causes ectopic lignification in *Arabidopsis thaliana* seedlings. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 3, p. 955–965, mar. 2009. (DOI: 10.1093/jxb/ern344)

BOUBAKRI, H. Priming-Mediated Stress and Cross-Stress Tolerance in Crop Plants: Induced resistance to biotic stress in plants by natural compounds: Possible mechanisms. **Academic Press**, p. 79-99, 2020. (DOI:10.1016/B978-0-12-817892-8.00005-2)

BRADFORD M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye. **Analytical biochemistry**, v. 72, p.248, 1976.

BRAND, S. C. **Taxtomina A e Piriformosa indica no controle de *Phytophthora nicotianae* em citros e *Phytophthora pluviosa* em faia (*Fagus sylvatica*)**.137f. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

BRUZAMARELLO, J.; FRANCESCHI, V. T.; DALACOSTA, N. L.; GONÇALVES, I.; MAZARO, S. M.; REIS, E. Potencial de fosfitos na indução de resistência em plantas de soja. **Cultura Agrônômica**, v.27, n.3, p.263-273, 2018.

CAGLIARI, C. L. **Momentos para a primeira aplicação de fungicidas associados a multissítios na cultura da soja**. 34f. TCC (Graduação) – Curso de Agronomia, Universidade Federal da Fronteira do Sul, Cerro Largo. 2019.

CARLILE, M. J.; WATKINSIN, S. C.; GOODAY, G. W. Fungal cells and vegetative growth. In CARLILE, M. J.; WATKINSIN, S. C.; GOODAY, G. W (eds) *The Fungi*, 2 ed. **Academic Press**, p. 85-184, 2001.

CHEVRETTE, M. G.; CARLSON, C. M.; ORTEGA, H. E.; THOMAS, C.; ANANIEV, G. E.; BARNS, K. J.; ET AL. The antimicrobial potential of *Streptomyces* from insect microbiomes. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 11 p., 2019. (DOI: 10.1038/s41467-019-08438-0)

CHUNG, G.; SINGH, R. J. Broadening the Genetic Base of Soybean: A Multidisciplinary Approach. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 27, n. 5, p. 295–341, 25 set. 2008. (DOI: 10.1080/07352680802333904)

COMPANHIA DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Análise mensal soja setembro 2020**. Companhia Nacional de Abastecimento, Brasília, 2020. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-soja/item/14206-soja-analise-mensal-setembro-2020>>. Acessado em 19 de maio de 2021.

COMPANHIA DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira: Grãos safra 2020/21, 11º levantamento**. Companhia Nacional de Abastecimento, Brasília, 2021. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/gaos/boletim-da-safra-de-gaos> >. Acessado em 15 de agosto de 2021.

CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL (CNA), CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA (CEPEA). **PIB do agronegócio brasileiro**. 2022. Disponível em: < <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>>. Acessado em 13 de outubro de 2022.

CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM. **Conheça a ferrugem: Custo ferrugem asiática soja.** Disponível em

<http://acacia.cnpso.embrapa.br:8080/cferrugem_files//764411951/Tabela_resumo_ferrugem_atual.pdf> Acessado em 12 de agosto de 2021.

CRUZ, M. F. A. da; RODRIGUES, F. A.; POLANCO, L. R.; CURVELO, C. R. da S.; NASCIMENTO, K. J. T.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Inducers of resistance and silicon on the activity of defense enzymes in the soybean-*Phakopsora pachyrhizi* interaction. **Bragantia**, v. 72, n. 2, p. 162–172, 29 jul. 2013. (DOI:10.1590/S0006-87052013005000025)

DURBIN, R.D. The mechanisms for self-protection against bacterial phytotoxins. **Annual Review of Phytopathology**, v. 26, p. 313-329, 1988.

DUVAL, I.; BROCHU, V.; SIMARD, M.; BEAULIEU, C.; BEAUDOIN, N. Thaxtomin A induces programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension-cultured cells. **Planta**, v. 222, p. 820-831, 2005. (DOI: 10.1007/s00425-005-0016-z)

EINHARDT A. M.; FERREIRA S.; HAWERROTH C.; VALADARES S. V.; RODRIGUES F. A. Nickel potentiates soybean resistance against infection by *Phakopsora pachyrhizi*. **Plant Pathology**, v. 69, n. 5, p. 849–859, 2020. (DOI:10.1111/ppa.13169)

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. Stages of soybean development. Ames: Iowa State University of Science and Technology, p. 11, 1977. (Special Report, 80)

FESEL P.H., ZUCCARO A. β -Glucan: Crucial Component of the Fungal Cell Wall and Elusive MAMP in Plants. **Fungal Genetics and Biology**, v. 90, p. 53 – 60, 2016. (DOI: 0.1016/j.fgb.2015.12.004)

FONTANA, D. C.; KULCZYNSKI, S. M.; TREVISAN, R.; SCHMIDT, D.; CARON, B. O.; PINHEIRO, M. V. M.; PRETTO, M. M.; DIEL, M. I. Uso de extratos vegetais no controle alternativo da podridão parda do pessegueiro. **Revista cultivando o saber**, v. 10, n. 2, p. 148 – 165, 2017.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **The future of food and agriculture – Trends and challenges.** Rome: 2017. Disponível em: < <http://www.fao.org/3/i6583e/i6583e.pdf>>. Acessado em 17 de junho 2021.

FRISVAD, J. C. Media and Growth Conditions for Induction of Secondary Metabolite Production. In: KELLER, N.; TURNER, G. (eds) Fungal Secondary Metabolism. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), v. 944, p. 47 – 58, 2012.

FURTADO, G. Q.; MORAES, S. R. G.; ALVES, S. A. M.; AMORIM, L.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. M. The

Infection of Soybean Leaves by *Phakopsora pachyrhizi* during Conditions of Discontinuous Wetness. **Journal of Phytopathology**, v. 159, n. 3, p. 165–170, mar. 2011. (DOI: 10.1111/j.1439-0434.2010.01742.x)

GAONKAR, V.; ROSENTRATER, K. A. Soybean. In: PAN, Z.; ZHANG, R.; ZICARI, S. (eds) Integrated

Processing Technologies for Food and Agricultural By-Products, Academic Press, Ames – Iowa, p. 73 – 104. 2019. (DOI: 10.1016/B978-0-12-814138-0.00004-6)

GARCIA, E. O.; PASCHOLATI, S. F.; ALMEIDA, M. Potencial eliciador de fitoalexinas e mecanismos de ação da fitotoxina taxtomina A em sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, Lavras, v. 32, p. 246, 2007. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 40., Maringá, 2007.

GARCIA, E. O. **Resistência de cultivares de batata (*Solanum tuberosum*) à sarna comum (*Streptomyces* spp.) e mecanismo de ação da fitotoxina taxtomina A em sorgo (*Sorghum bicolor*): aspectos bioquímicos e ultraestruturais**. 93f. Dissertação (Mestrado em fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

GARP. ASSOCIAÇÃO GRUPO DE ANALISTAS DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS. MANUAL DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM ALIMENTOS (APOSTILA), 1999.

GODOY, C.V.; KOGA, L.J.; CANTERI, M.G. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 063-068, 2006.

GODOY, C. V.; ALMEIDA, A. M. R.; COSTAMILAN, L. M.; MEYER, M. C.; DIAS, W. P.; SEIXAS, C. D. S.; SOARES, R. M.; HENNING, A. A.; YORINORI, J. T.; FERREIRA, L. P.; SILVA, J. F. V. Doenças da soja. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Eds). Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 5ª. ed. Editora Agronômica Ceres, v. 2, p. 657-675, 2016.

GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; SOARES, R. M.; MEYER, M. C.; COSTAMILAN, L. M.; ADEGAS, F. S. Boas práticas para o enfrentamento da ferrugem-asiática da soja. Embrapa soja, 2017. 6p (Embrapa soja. Comunicado técnico 92).

GODOY, C. V.; CAMPOS, H. D.; MEYER, M. C.; LOPES, I. de O. N. Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2017/2018: Resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Embrapa soja, 2018. 8p (Embrapa soja. Circular Técnico 138)

GODOY, C.V.; UTIAMADA, C.M.; MEYER, M.C.; CAMPOS, H.D.; LOPES, I. de O. N.; DIAS, A. R.; DEUNER, C. C.; PIMENTA, C. B.; JACCOUD FILHO, D.S.; MOREIRA, E. N.; BORGES, E.P.; ANDRADE, E.R.; SIQUERI, F.V.; JULIATTI, F.C.; JULIATTI, F.C.; FAVARO, F.; FEKSA, H.R.; ARAÚJO JUNIOR, I. P.; GRIGOLLI, J.F.J.; NUNES JUNIOR, J.; BELUFI, L.M.R.; CARNEIRO, L.C.; SILVA, L.H.C.P.; SATO,

L.N.; CANTERI, M.G.; VOLF, M.R.; GOUSSAIN, M.; DIAS, M. B.; DEBORTOLI, M.P.; MARTINS, M.C.; BALARDIN, R.S.; FURLAN, S.H.; MADALOSSO, T.; CARLIN, V.J.; VENANCIO, W.S. **Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2017/2018: Resultados sumarizados dos ensaios cooperativos**. Embrapa soja, 2018. 8p (Embrapa soja. Circular Técnico 138).

GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; MEYER, M. C.; SOARES, R. M. **Ferrugem asiática da soja: bases para o manejo da doença e estratégias antirresistência**. Embrapa soja, 2020. 40p. (Embrapa soja. Documento 428).

GONÇALVES, G. G.; MATTOS, L. P. V. de; MORAIS, L. A. S. de; DE MORAIS. Óleos essenciais e extratos vegetais no controle de fitopatógenos de grãos de soja. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, 6 p, 2009.

HARTMAN, G. L.; SIKORA, E. J.; RUPE, J. C. Rust. In: HARTMAN, G. L.; RUPE, J. C.; SIKORA, E. J.; DOMIER, L. L.; DAVIS, J. A.; STEFFEY, K. L. (Ed.) **Compendium of soybean diseases**. 5th. ed. APS Press, p. 56-59, 2015.

HIRAKURI, M. H.; LAZZAROTTO, J. J. **O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro**. Embrapa soja, 2014. 37p. (Embrapa soja. Documento 349).

HAMMERSCHIMIDT, R.; METRAUX, J. P.; VAN LOON, L. C. Inducing Resistance: A Summary of Papers Presented at the First International Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases. **European Journal Plant of Pathology**, v. 107, p. 1-6, 2001.

HOLZ, S. Potencial de isolados de *Metarhizium* spp. no controle alternativo da ferrugem-asiática da soja. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, universidade de São Paulo, Piracicaba, 2020. (DOI: 10.11606/D.11.2020.tde-01102020-130757)

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO): Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2007

ISARD, S. A.; DUFAULT, N. S.; MILES, M. R.; HARTMAN, G. L.; RUSSO, J. M.; DE WOLF, E. D.; MOREL, W. The Effect of Solar Irradiance on the Mortality of *Phakopsora pachyrhizi* Urediniospores. **Plant Disease**, v. 90, n. 7, p. 941–945, jul. 2006. (DOI: 10.1094/PD-90-0941)

ISMAIL, S.; JIANG, B.; NASIMI, Z.; INAM-UL-HAQ, M.; YAMAMOTO, N.; OFORI, A. D.; KHAN, N.; ARSHAD, M.; ABBAS, K.; ZHENG, A. Investigation of *Streptomyces scabies* Causing Potato Scab by Various Detection Techniques, Its Pathogenicity and Determination of Host-Disease Resistance in Potato Germplasm. **Pathogens**, v. 9, 26 p., 2020. (DOI: 10.3390/pathogens9090760)

JIANG, G.; ZHANG, Y.; POWELL, M. M.; ZHANG, P.; ZUO, R.; ZHANG, Y.; KALLIFIDAS, D.; TIEU, A. M.; LUESCH, H.; LORIA, R.; DING, Y. High-Yield Production of Herbicidal Thaxtomins and Thaxtomin Analogs in a Nonpathogenic *Streptomyces* Strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 11, jun. 2018.

JOGLEKAR, S.; SULIMAN, M.; BARTSCH, M.; HALDER, V.; MAINTZ, J.; BAUTOR, J.; ZEIER, J.; PARKER, J. E.; KOMBRIK, E. Chemical Activation of EDS1/PAD4 Signaling Leading to Pathogen Resistance in Arabidopsis. **Plant and Cell Physiology**, v. 59, n. 8, p. 1592–1607, ago. 2018. (DOI: 10.1093/pcp/pcy106)

JUHÁNZ, A. C. P.; PÁDUA, G. P. de; WRUCK, D. S. M.; FAVORETO, L.; RIBEIRO, N. R.; Desafios fitossanitários para produção de soja. **Informe agropecuário**, v. 34, n. 276, p. 66 – 75. 2013.

KANG, J. E., HAN, J. W., JEON, B. J., AND KIM, B. S. Efficacies of quorum sensing inhibitors, piericidin A and glucopiericidin A, produced by *Streptomyces xanthocidicus* KPP01532 for the control of potato soft rot caused by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. **Microbiology. Research**, v. 184, p. 32–41, 2016. (DOI: 10.1016/j.micres.2015.12.005)

KASHIWA, T.; MURAKI Y.; YAMANAKA, N. Near-isogenic soybean lines carrying Asian soybean rust resistance genes for practical pathogenicity validation. **Nature: Scientific Reports**, v.10, 7 p., 2020. (DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70188-7>)

KING, R. R.; CALHOUN, L. A. The thaxtomin phytotoxins: Sources, synthesis, biosynthesis, biotransformation and biological activity. **Phytochemistry**, v. 70, n. 7, p. 833–841, maio 2009.

KING, R. R.; LAWRENCE, C. H. Characterization of New Thaxtomin A Analogues Generated *in Vitro* by *Streptomyces scabies*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 4, p. 1108–1110, jan. 1996.

KING, R. R.; LAWRENCE, C. H.; CLARK, M. C.; CALHOUN, L. A. Isolation and characterization of phyroroxins associated with *Streptomyces scabies*. **Chemical Community**, Ottawa, v. 13, p. 849-850, 1989.

KING, R. R.; LAWRENCE, C. H.; GRAY, J. A. Herbicidal Properties of the Thaxtomin Group of Phytotoxins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 2298–2301, maio 2001. (DOI: 10.1021/jf0012998)

KLOSOWSKI, A. C.; MAY DE MIO, L. L.; MIESSNER, S.; RODRIGUES, R.; STAMMLER, G. Detection of

the F129L mutation in the cytochrome *b* gene in *Phakopsora pachyrhizi*. **Pest Management Science**, v. 72, p. 1211-1215, 2016. (DOI: 10.1002/ps.4099)

KOESTER, R. P.; SKONECZKA, J. A.; CARY, T. R.; DIERS, B. W.; AINSWORTH, E. A. Historical gains in

soybean (*Glycine max* Merr.) seed yield are driven by linear increases in light interception, energy conversion, and partitioning efficiencies. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 12, p. 3311–3321, jul. 2014. (DOI: 10.1093/jxb/eru187)

LAW, J. W-F.; SER, H-L.; KHAN, T. M.; CHUAH, L-H.; PUSPARAJAH, P.; CHAN, K-G.; GOH, B-H.; LEE, L-H. The Potential of *Streptomyces* as Biocontrol Agents against the Rice Blast Fungus, *Magnaporthe oryzae* (*Pyricularia oryzae*). **Frontiers in microbiology**, v. 8, 10 p., 2017.

LEE, M. S.; KOJIMA, I.; DEMAÏN, A. L. Effect of nitrogen source on biosynthesis of rapamycin by *Streptomyces hygroscopicus*. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 19, p. 83 – 86, 1997.

LI, Y.; KONG, L.; SHEN, J.; WANG, Q.; LIU, Q.; YANG, W.; ET AL. Characterization of the positive SARP family regulator PieR for improving piericidin A1 production in *Streptomyces piomogeeus* var. *Hangzhouwanensis*. **Synthetic and Systems Biotechnology**, v. 4, p. 16–24, 2019. (DOI: 10.1016/j.synbio.2018.12.002)

LERAT, S.; FOREST, M.; LAUZIER, A.; GRONDIN, G.; LACELLE, S.; BEAULIEU, C. Potato Suberin Induces Differentiation and Secondary Metabolism in the Genus *Streptomyces*. **Microbes and Environment**, v. 27, n. 1, p. 36–42, 2012. (DOI: 10.1264/jsme2.ME11282)

LI, Z.; HUANG, P.; WANG, M.; WANG, X.; WANG, L.; KONG, D.; NIU, G. Stepwise increase of thaxtomins production in *Streptomyces albidoflavus*J1074 through combinatorial metabolic engineering. **Metabolic engineering**, v. 68, p. 187-198, 2021. (DOI: 10.1016/j.ymben.2021.10.008)

LLORENS, E.; GARCÍA-AGUSTÍN, P.; LAPENÑA, L. Advances in induced resistance by natural compounds: towards new options for woody crop protection. **Scientia Agricola**, v. 74, n. 1, p. 90–100, fev. 2016. (DOI: 10.1590/1678-992X-2016-0012)

LLORENS, E.; GONZALEZ-HERNANDEZ, A. I.; SCALSCHI, L.; FERNANDEZ-CRESPO, E.; CAMANES, G.; VICEDO, B.; GARCÍA-AGUSTÍN, P. Priming-Mediated Stress and Cross-Stress Tolerance in Crop Plants: Concepts and opportunities. **Academic Press**, p. 1-20, 2020. (DOI: 10.1016/B978-0-12-817892-8.00001-5)

LORENZETTI, E.; STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; PORTZ, R. L. Indução de resistência à *Macrophomina phaseolina* em soja tratada com extrato de alecrim. **Summa Phytopatologica**, v. 44, n. 1, p. 45-50, 2018. (DOI: 10.1590/0100-5405/176895)

LORIA, R.; BUKHALID, R. A.; CREATH, R. A.; LEINER, R. H.; OLIVIER, M.; STEFFENS, J. C. Differential production of thaxtomin by pathogenic *streptomyces* species *In Vitro*. **Biochemistry and cell biology**, v. 85, n. 5, p. 537 – 541, 1995.

LORIA, R.; BUKHALID, R. A.; FRY, B. A.; KING, R. R. Plant pathogenicity in genus *Streptomyces*. **Plant Disease**, v. 81, n. 8, p. 836-846, 1997.

LORIA, R.; KERS, J.; JOSHI, M. Evolution of plant pathogenicity in *Streptomyces*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 469 – 487, set. 2006. (DOI: 10.1146/annurev.phyto.44.032905.091147)

LUSSO, M. F. G., PASCHOLATI, S. F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. **Summa Phytopatologica**, v. 25, p. 244 – 249, 1999.

MAPA. Mapa registra recorde de 95 defensivos de controle biológico em 2020. Disponível em <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/Mapa-registra-recorde-de-95-defensivos-biologicos-em-2020>>. Acessado em 17 de abril de 2023.

MASCARENHAS, H. A. A.; TANAKA, R. T.; WUTKE, E. B.; KIKUTI, H. Nitrogênio: a soja aduba a lavoura da cana. **O Agrônomo**. Campinas, v. 1, n. 57, 2005.

MAUCH-MANI, B.; BACCELLI, I.; LUNA, E.; FLORS, V. Defense Priming: An Adaptive Part of Induced Resistance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 68, n. 1, p. 485–512, abr. 2017. (DOI: 10.1146/annurev-arplant-042916-041132)

MEHTA, Y. R.; MARANGONI, M. S.; MATOS, J. N.; MANDARINO, J. M. G.; GALBIERI, R. Systemic

Acquired Resistance of Soybean to Soybean Rust Induced by Shale Water. **American Journal of Plant Sciences**, v. 06, n. 14, p. 2249–2256, 2015. (DOI: 10.4236/ajps.2015.614227)

MESQUINI, R. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; VIEIRA, R. A.; NASCIMENTO, J. F. Controle e progresso temporal da ferrugem asiática da soja sob controle alternativo em campo. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 1, p. 24–29, mar. 2011.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n.3, p. 426-428, 1959.

MITROVIC, I. Z.; GRAHOVAC, J. A.; DODIC, J. M.; GRAHOVAC, M. S.; DODIC, S. N.; VUCUROVIC, D. G.; VLAJKOV, V. R. Effect of agitation rate on the production of antifungal metabolites by *Streptomyces hygroscopicus* in a lab-scale bioreactor. **Acta periodica tecnologica**, v. 48, p. 231-244, 2017)

MOBIUS, N.; HERTWECK, C. Fungal phytotoxins as mediators of virulence. **Current opinion in plant biology**, v. 12, p. 390 – 398. Jul. 2009. (DOI: 10.1016/j.pbi.2009.06.004)

NEWITT, J. T.; PRUDENCE, S. M. M.; HUTCHINGS, M. I.; WORSLEY, S. F. Biocontrol of cereal crop diseases using *streptomyces*. **Pathogens**, v. 8, n. 2, 25 p., 2019. (DOI: 10.3390/pathogens8020078)

- NGUYEN, C. T.; DHAKAL, D.; PHAM, V. T. T.; NGUYEN, H. T.; SOHNG, J.-K. Recent advances in strategies for activation and discovery/characterization of cryptic biosynthetic gene clusters in *Streptomyces*. **Microorganisms**, v. 8, 18 p., 2020. (DOI:10.3390/microorganisms8040616)
- NLEYA, T.; SEXTON, P.; GUSTAFSON, K.; MILLER, J. M. Soybean growth stages. In: CLAY, D. E.; CARLSON, C. G.; CLAY, S. A.; WAGNER, L.; DENEKE, D. L.; HAY, C. H. (eds) iGrow Soybean: Best Management Practices for Soybean Production, South Dakota Soybean Research and Promotion Council, Brookings – South Dakota, p. 25 – 36. 2019.
- O'BRIEN, P. A. Biological control of plant diseases. **Australasian Plant Pathology**, v. 46, n. 4, p. 293–304, jul. 2017. (DOI: 10.1007/s13313-017-0481-4)
- OERKE, E. C. Crop losses to pests. **The Journal of Agricultural Science**, v. 144, n. 1, p. 31–43, fev. 2006. (DOI: 10.1017/S0021859605005708)
- PASCHOLATI, S. F.; DALIO, R. J. D. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (eds) Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos, 5ª ed. Editora Agronômica Ceres, Piracicaba, p. 420 – 450, 2018.
- PASCHOLATI, S. F.; MELO, T. A. de; DALIO, R. J. D. Indução de resistência contra patógenos: Definição e perspectiva de uso. **Visão agrícola**, v. 13, p. 110 – 112. 2015.
- PAULA, S. de. **Taxtomina parcialmente purificada e preparações de *Streptomyces scabies* na indução de resistência em soja à *Phakopsora pachyrhizi***. 100f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019. (DOI: 10.11606/D.11.2019.tde-22072019-115643)
- PELIN, C.; WORDELL FILHO, J. A.; NESI, C. N. Ferrugem asiática da soja: etiologia e controle. **Agropecuária Catarinense**, v. 33, n. 3, p. 18–21, 30 dez. 2020.
- PERINA, F. J.; ALVES, E.; PEREIRA, R. B.; LUCAS, G. C.; LABORY, C. R. G.; CASTRO, H. A. de. Essential oils and whole milk in the control of soybean powdery mildew. **Ciência Rural**, v. 43, n. 11, p. 1938– 1944, nov. 2013.
- PHAM, V. T. T.; NGUYEN, C. T.; DHAKAL, D.; NGUYEN, H. T.; KIM, T.-S.; SOHNG, J. K. Recent Advances in the Heterologous Biosynthesis of Natural Products from *Streptomyces*. **Applied. Sciences**, v. 11, n. 4, 21 p., 2021. (DOI: 10.3390/app11041851)
- POPP, J.; PETŐ, K.; NAGY, J. Pesticide productivity and food security. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 33, n. 1, p. 243–255, jan. 2013. (DOI: 10.1007/s13593-012-0105-x)
- SAATH, K. C.O.; FACHINELLO, A. L. Crescimento da demanda mundial de alimentos e restrições do fator terra no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 56, n. 2, p. 195–212, jun. 2018. (DOI: 10.1590/1234-56781806-94790560201)
- SALVADORI, J.R.; BACALTCHUK, B.; DEUNER, C. C.; LAMAS, JÚNIOR, G. L. R.; RIZZARDI, M. A.; LANGARO, N. C.; ESCOSTEGUY, P. A. V.; BOLLER, W. Indicações Técnicas para a Cultura da Soja no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina, safras 2016/2017 e 2017/2018. UPF editora, Passo Fundo, p. 102, 2016.

SALWAN, R.; SHARMA, V. Bioactive compounds of *Streptomyces*: Biosynthesis to applications. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 64, p. 467–491, 2020. (DOI: 10.1016/B978-0-12-817903-1.00015-2)

SCHMITZ, H. K.; MEDEIROS, A. C.; CRAIG, I. R.; STAMMLER, G. Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* towards quinone-outside-inhibitors and demethylation-inhibitors, and corresponding resistance mechanisms. **Pest Management Science**, v. 7, p. 378-388, 2014. (DOI: 10.1002/ps.3562)

SHARMA, V.; KAUR, R.; SALWAN, R. *Streptomyces*: Host for refactoring of diverse bioactive secondary metabolites. **3 Biotech**, v, 11, 32 p., 2021. (DOI: 10.1007/s13205-021-02872-y)

SHIH, H.-D.; LIU, Y.-C.; HSU, F.-L.; MULABAGAL, V.; DODDA, R.; HUANG, J.-W. Fungichromin: A substance from *Streptomyces padanus* with inhibitory effects on *Rhizoctonia solani*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 95–99, 2003. (DOI: 10.1021/jf025879b)

SILVA, R. A. da; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F. L.; **Defesa de planta contra o ataque de fitopatógenos**. Embrapa agrobiologia, 2008. 56p. (Embrapa Agrobiologia. Documento 250)

SIMÕES, K.; HAWLIK, A.; REHFUS, A.; GAVA, F.; STAMMLER, G. First detection of a SDH variant with reduced SDHI sensitivity in *Phakopsora pachyrhizi*. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 125, n. 1, p. 21-26, 2018. (DOI: 10.1007/s41348-017-0117-5)

SINGH, S., KHAJURIA, R.. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. **Elsevier**, 2018.

SLAMINKO, T. L.; MILES, M. R.; FREDERICK, R. D.; BONDE, M. R.; HARTMAN, G. L. New Legume Hosts of *Phakopsora pachyrhizi* Based on Greenhouse Evaluations. **Plant Disease**, v. 92, n. 5, p. 767–771, maio 2008. (DOI: 10.1094/PDIS-92-5-0767)

SRIVIBOOL, R.; KURAKAMI, K.; SUKCHOTIRATANA, M.; TOKUYAMA, S. Coastal Soil Actinomycetes: Thermotolerant Strains Producing *N*-Acylamino Acid Racemase. **ScienceAsia**, v. 30, p. 123-126, 2004.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; METRAUX J. P. Systemic acquired resistance. **Annual review of phytopatology**, v. 35, p. 235 – 270. 1997.

SUDHIR, P. V.; RANJAN, D. S.; GANPAT, A. N.. Antifungal agents, WO2009025733. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 20, n. 1, p. 137–143, 2010. (DOI:10.1517/13543770903338768)

SUZANI, M. R. de P. ***Streptomyces* spp. como potencial agente bio-herbicida contra *Spermacoce verticillata*, *Eleusine indica* e *Lolium multiflorum***. 60f. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências biológicas). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2020.

TECHAPUN, C.; POOSARAN, N.; WATANABE, M.; SASAKI, K. Optimization of aeration and agitation rates to improve cellulose-free xylanase production by thermotolerant *Streptomyces* sp. Ab106 and repeated fed-batch cultivation using agricultural waste. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 95, p. 298-301, 2003.

TEGG, R. S.; MELIAM, L.; WILSON, C. R.; SHABALA, S. Plant cell growth and ion flux responses to the Streptomycete phytotoxin thaxtomin A: calcium and hydrogen flux patterns revealed by the non-invasive MIFE technique. **Plant Cell Physiology**., v. 46, p. 638-648, 2005. (DOI: 10.1093/pcp/pci069)

THAKUR, A.; THAKUR, A.; SHARMA, V.; SHARMA, V. Phytotoxins – A mini Review. **Journal of pharmacology and phytochemistry**, v. 7, n. 6, p. 2705 – 2708. Out. 2018.

TREMACOLDI, C. R.; SOUZA FILHO, A. P. da S. Toxinas Produzidas por Fungos Fitopatógenos: Possibilidades de Uso no Controle de Plantas Daninhas. Embrapa Amazônia Oriental, 2006, 24 p. (Documento 274)

TREMBLAY, A. Soybean Molecular Aspects of Breeding - Soybean rust: Five years of research. **Intech**, p. 293-334, 2011. (DOI: 10.5772/15121)

VALLAD, G. E.; GOODMAN, R. M. Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture. **Crop Science**, v. 44, n. 6, p. 1920-1934, 2004. (DOI: 10.2135/cropsci2004.1920)

VENTUROSO, L. R. **Extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos à soja**. 99f. Dissertação (Mestrado em produção vegetal) – Universidade Federal da Grande Dourados, Mato Grosso do Sul, 2009.

WACH, M. J.; KRASNOFF, S. B.; LORIA, R.; GIBSON, D. M. Effect of carbohydrates on the production of thaxtomin A by *Streptomyces acidiscabies*. **Archives of Microbiology**, v. 188, n. 1, p. 81–88, 12 jun. 2007.

WALTERS, D. R.; RATSEP, J.; HAVIS, N. D. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 5, p. 1263–1280, mar. 2013. (DOI:10.1093/jxb/ert026)

WILSON, C. R.; LUCKMAN, G. A.; TEGG, R. S.; YUAN, Z. Q.; WILSON, A. J.; EYLES, A.; CONNER, A. J. Enhanced resistance to common scab of potato through somatic cell selection in cv. Iwa with the phytotoxin thaxtomin A. **Plant Pathology**, v. 58, n. 1, p. 137–144, fev. 2009. (DOI: 10.1111/j.1365-3059.2008.01903.x)

WILSON, C. R.; TEGG, R. S.; WILSON, A. J.; LUCKMAN, G. A.; EYLES, A.; YUAN, Z. Q.; HINGSTON, L. H.; CONNER, A. J. Stable and Extreme Resistance to Common Scab of Potato Obtained Through Somatic Cell Selection. **Phytopathology**, v. 100, n. 5, p. 460–467, maio 2010. (DOI: 10.1094/PHYTO-100-5-0460)

WOLFE, J. C.; NEAL, J. C.; HARLOW, C. D.; GANNON, T. W. Efficacy of the Bioherbicide Thaxtomin A on Smooth Crabgrass and Annual Bluegrass and Safety in Cool-Season Turfgrasses. **Weed Technology**, v. 30, n. 3, p. 733–742, set. 2016. (DOI: 10.1614/WT-D-15-00158.1)

WU, W.; YU, Q.; VERBURG, H. P.; YOU, L.; YANG, P.; TANG, H. How Could Agricultural Land Systems Contribute to Raise Food Production Under Global Change? **Journal of Integrative Agriculture**, v. 13, n. 7, p. 1432–1442, jul. 2014. (DOI: 10.1016/S2095-3119(14)60819-4)

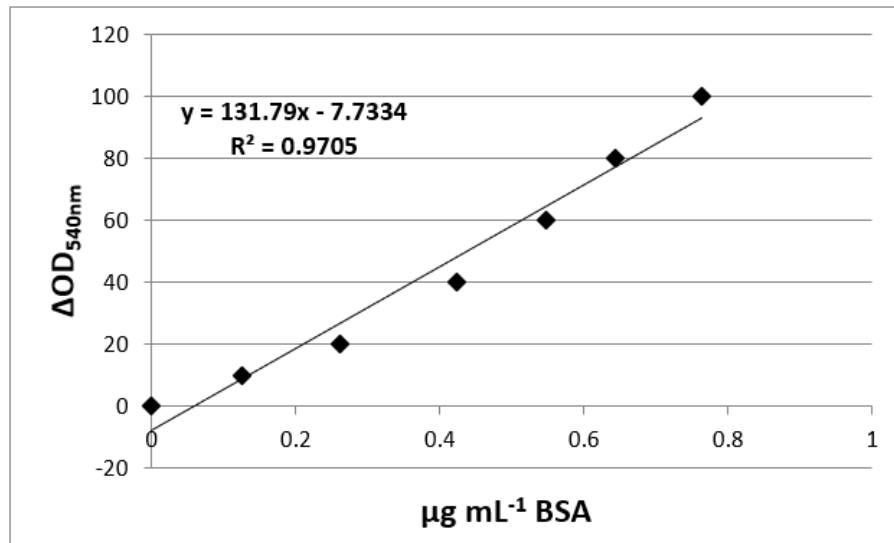
XING, Z.; WU, X.; ZHAO, J.; ZHAO, X.; ZHU, X.; WANG, Y.; FAN, H.; CHEN, L.; LIU, X.; DUAN, Y. Isolation and identification of induced systemic resistance determinants from *Bacillus simplex* Sneb545 against *Heterodera glycines*. **Nature: Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 11586, dez. 2020. (DOI: /10.1038/s41598-020-68548-4)

YORINARI, J. T.; NUNES JÚNIOR, J.; LAZZAROTO, J. J. **Ferrugem “asiática” da soja no Brasil: evolução, importância econômica e controle.** Embrapa soja, 2004. 40p. (Embrapa soja. Documento 247).

ZHOU, Y.; HAN, LI-R.; HE, H-W.; SANG, B.; YU, D-L.; FENG, J-T.; ZHANG, X. Effects of Agitation, Aeration and Temperature on Production of a Novel Glycoprotein GP-1 by *Streptomyces kanasensis* ZX01 and Scale-Up Based on Volumetric Oxygen Transfer Coefficient. **Molecules**, v. 23, n. 1, 14 p., 2018. (DOI: 10.3390/molecules23010125)

APÊNDICES

Apêndice A. Curva padrão para a dosagem de proteínas através do método de Bradford (1976)



Apêndice B. Curva padrão para a dosagem de glicose através do método de Miller (1959)

