

KADIR JOHN MÁRQUEZ DÁVILA

**EXTRATOS ORGÂNICOS DE *Penicillium* spp. E *Talaromyces* spp. COMO
BIOFUNGICIDAS PROTETORES PARA O CONTROLE DE DOENÇAS FOLIARES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Lucas Magalhães de Abreu

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

M357e
2024 Márquez Dávila, Kadir John, 1977-
Extratos orgânicos de *Penicillium* spp. e *Talaromyces* spp.
como biofungicidas protetores para o controle de doenças
foliares / Kadir John Márquez Dávila. – Viçosa, MG, 2024.
1 tese eletrônica (81 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexos.

Orientador: Lucas Magalhães de Abreu.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Fitopatología, 2024.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.332>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Euroliales. 2. Metabólitos. 3. Mancha-alvo - Controle
biológico. 4. Pinta-preta - Controle biológico. I. Abreu, Lucas
Magalhães de, 1979-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Fitopatología. Programa de Pós-Graduação em
Fitopatologia. III. Título.

CDD 22. ed. 632.4

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto Pires CRB-6/2523

KADIR JOHN MÁRQUEZ DÁVILA


**EXTRATOS ORGÂNICOS DE *Penicillium* spp. E *Talaromyces* spp. COMO
BIOFUNGICIDAS PROTETORES PARA O CONTROLE DE DOENÇAS FOLIARES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Aprovada: 20 de junho de 2024.



Kadir John Márquez Dávila
Autor



Lucas Magalhães de Abreu
Orientador

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

DEDICATÓRIA

A meus filhos, Valentina e Kadir Mathew

Quem são minhas motivações que tornam possíveis minhas grandes conquistas;

A minha mãe, Santa Clara Dávila e na memória do meu pai, Glicério Márquez

Por todo amor, ensinamentos sábios e apoio em minhas decisões, dedico.

À minha companheira de vida, Kathy Gonzales Bardales

Pelo amor constante, por me ter dado filhos maravilhosos, pela compreensão, apoio incondicional e por compartilhar minhas alegrias nas conquistas foram fundamentais para o meu sucesso.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Lucas Magalhães de Abreu, agradeço profundamente por me receber em seu laboratório, pela dedicação, paciência, amizade, compreensão e pelo apoio inestimável nos desafios enfrentados ao explorar diversas áreas na construção desta tese.

Aos meus colegas da Unidade de Controle Biológico de Viçosa - UCBV, em especial Hiago Antonio, Amarildo Lima, Ana Carolina Almeida, Iris Carolina, Jessiane dos Santos, Endrio Webers e Kassio, por todo apoio e pela amizade sincera.

Ao Professor Ludwig Heinrich Pfenning, pelo apoio facilitado e acesso à coleção de *Penicillium*.

À empresa UPL pelo financiamento fornecido para a realização da triagem do primeiro capítulo da tese.

À professora Livia Soman de Medeiros, pela contribuição nas análises de LC-HRMS.

Ao Sr. Mário e D. Neuza, por sempre nos acolher com grande bondade e carisma.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar o doutorado.

Ao departamento de Fitopatologia - UFV e todo o corpo docente que contribuíram diretamente para o meu crescimento profissional ao longo destes anos.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ, pelo patrocínio.

Ao governo peruano, por meio da Universidad Nacional Hermilio Valdizan, pelo patrocínio financeiro durante minha estadia em Viçosa-MG.

Às minhas colegas Lilia Vega Jara e Luisa Alvarez Benaute, pelo apoio em minhas atividades laborais enquanto estive em Viçosa-MG.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

BIOGRAFIA

Kadir John Márquez Dávila, filho de Glicerio Márquez Cruz e Santa Clara Dávila Gayoso, nasceu em Margos-Huánuco, Perú, em 23 de setembro de 1977. Em 2002, ingressou no curso de Agronomia na Universidad Nacional Hermilio Valdizán, em Huánuco, Peru. Obteve o título de Eng. Agrônomo em setembro de 2003. Entre 2003 e 2004, realizou o mestrado em Fitopatologia na Universidade Nacional Agrária La Molina, em Lima, Peru. Concluiu o curso e obteve o título de *Mestre Scientiae* em Fitopatologia em dezembro de 2007. Desde abril de 2018, exerce a função de professor auxiliar no Departamento de Agronomia da Universidade Nacional Hermilio Valdizán, em Huánuco, Perú.

Em março de 2020, iniciou o doutorado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa, focando sua pesquisa na área de Controle Biológico.

Defendeu sua tese de doutorado em Fitopatologia em 20 de Junho de 2024.

RESUMO

MÁRQUEZ-DÁVILA, Kadir John, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Junho de 2024. **Extratos orgânicos de *Penicillium* spp. e *Talaromyces* spp. como biofungicidas protetores para o controle de doenças foliares.** Orientador: Lucas Magalhães de Abreu.

O controle biológico de doenças da parte aérea das plantas é um desafio, pois depende da manutenção de altos níveis populacionais de agentes de biocontrole na filosfera por períodos de vários dias entre as aplicações. Agentes de biocontrole que atuam por antibiose são comumente usados para aplicações em parte aérea, gerando a possibilidade do uso direto de misturas de metabólitos secundários (MS) bioativos em formulações para o controle de doenças. Espécies de fungos dos gêneros *Penicillium* e *Talaromyces* são produtoras de uma grande diversidade de MS bioativos, tornando-os bons candidatos na busca de novas fontes de biofungicidas para o controle de doenças foliares. Nesta tese, foram conduzidos dois estudos com o objetivo de investigar o potencial de extratos contendo MS de isolados de *Penicillium* e *Talaromyces* no controle de doenças foliares. No primeiro estudo, a triagem conduzida com extratos orgânicos de isolados de *Penicillium* (N=27), *Talaromyces* (N=9) e *Purpureocillium lilacinum* (N=1), na dose de 10 mg/mL, contra os fitopatógenos *Corynespora cassiicola* (Cc) e *Colletotrichum truncum* (Ct), patógenos da parte aérea da soja, e *Alternaria grandis*, agente etiológico da pinta preta em batata, resultou na seleção de 7 isolados de 6 espécies de *Penicillium*, 2 isolados de *Talaromyces pinophilus* e do isolado UCBV 327 de *P. lilacinum*, que exibiram percentagens de inibição de crescimento dos três patógenos entre 59% e 100%. No segundo estudo, experimentos envolvendo a bioatividade de 4 extratos de *Penicillium* spp., em ensaios de inibição usando diferentes doses contra Cc e Ct e *A. linariae*, patógeno do tomate, resultaram em valores correspondentes à metade da dose efetiva máxima inferiores a 10 µg/mL ($CE_{50} = 3,3 - 7,7 \mu\text{g/mL}$) contra os três patógenos, sendo os extratos dos isolados de *Penicillium brasilianum* UCBV 283 e 287a aqueles com os menores valores absolutos de CE_{50} . Estes dois extratos foram formulados e avaliados em ensaios em casa de vegetação, tendo sido eficazes na redução significativa da severidade da mancha-alvo da soja e da pinta preta do tomate. Na análise química dos extratos dos isolados de *P. brasilianum* foram identificados 12 MS, sendo o ácido penicílico, brasiliamida A e verruculogen detectados em maior abundância. Os resultados obtidos nesta tese evidenciam o potencial do uso da grande diversidade metabólica de fungos da Ordem *Eurotiales* na composição de biofungicidas para o controle de doenças de plantas, sendo uma proposta pioneira na temática do uso de extratos destes fungos para o controle de doenças.

Palavras-chave: Eurotiales, Biocontrole, Metabólitos secundários, Mancha-alvo, Pinta preta.

ABSTRACT

MÁRQUEZ-DÁVILA, Kadir John, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2024. **Organic extracts from *Penicillium* spp. and *Talaromyces* spp. as biofungicides for managing foliar diseases.** Advisor: Lucas Magalhães de Abreu.

Biological control of aerial plant diseases is challenging as it depends on maintaining high population levels of biocontrol agents in the phyllosphere for periods of several days between applications. Biocontrol agents that act through antibiosis are commonly used for aerial part applications, generating the possibility of using mixtures of bioactive secondary metabolites (SM) in formulations for disease control. Species of fungi in the genera *Penicillium* and *Talaromyces* are producers of a great diversity of bioactive SM, making them good candidates in the search for new sources of biofungicides for the control of foliar diseases. In this thesis, two studies were conducted with the aim of investigating the potential of extracts containing SM from isolates of *Penicillium* and *Talaromyces* in the control of foliar diseases. In the first study, screening conducted with organic extracts of *Penicillium* (N=27), *Talaromyces* (N=9) and *Purpureocillium lilacinum* (N=1), tested at 10 mg/mL, against phytopathogens *Corynespora cassiicola* (Cc) e *Colletotrichum truncatum* (Ct), pathogens from the aerial part of soybean, and *Alternaria grandis*, the etiological agent of early blight on potatoes, resulted in the selection of 7 isolates from 6 species of *Penicillium*, 2 isolates of *Talaromyces pinophilus* and the UCBV 327 isolate from *P. lilacinum*, which caused growth inhibition percentages of the three pathogens between 59% and 100%. In the second study, the bioactivity of 4 extracts of *Penicillium* spp. was tested in inhibition assays using different doses against Cc, Ct and *A. linariae*, the tomato early blight pathogen, resulting in values corresponding to half the maximum effective dose of less than 10 µg/mL ($EC_{50} = 3.3 - 7.7$ µg/mL) against the three pathogens, with extracts from isolates of *Penicillium brasilianum* UCBV 283 and 287a having the lowest absolute EC_{50} values. These two extracts were formulated and evaluated in greenhouse trials and were effective in significantly reducing the severity of soybean target spot and tomato early blight. In the chemical analysis of extracts from isolates of *Penicillium brasilianum*, 12 SM were identified, with penicillic acid, brasiliamide A and verruculogen detected in greater abundance. The results obtained in this thesis highlight the potential of using the great metabolic diversity of fungi from the Order *Eurotiales* in the composition of biofungicides for the control of plant diseases, being a pioneering proposal on the topic of using extracts of these fungi to control diseases.

Keywords: Eurotiales, Biocontrol, Secondary metabolites, Target spot, Early blight

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	10
REFERÊNCIAS	13
CAPÍTULO I - Seleção de extratos orgânicos de <i>Penicillium</i> spp. e <i>Talaromyces</i> spp. com atividade antifúngica a fungos fitopatogênicos foliares	17
RESUMO	17
1. INTRODUÇÃO	18
2. MATERIAL E MÉTODOS	20
2.1. Isolados estudados	20
2.2. Isolados dos fungos fitopatogênicos	20
2.3. Identificação molecular	21
2.3.1. Extração de DNA	21
2.3.2. Amplificação de PCR, sequenciamento e filogenia	22
2.4. Extração de metabólitos	22
2.5. Avaliação da bioatividade e seleção de extratos orgânicos	23
2.6. Caracterização química dos extratos orgânicos	24
2.6.1. Preparação de amostras	24
2.6.2. Análise química do Perfil metabólico dos extratos	25
3. RESULTADOS	26
3.1. Identificação filogenética dos isolados	26
3.2. Seleção de extratos orgânicos de <i>Penicillium</i> spp. pela sua bioatividade.	28
3.3. Caracterização química dos extratos	32
4. DISCUSSÃO	33
5. REFERÊNCIAS	37
6. MATERIAL SUPLEMENTAR	43

CAPÍTULO II: Controle de doenças foliares com extratos orgânicos de <i>Penicillium</i> spp. em condições de casa de vegetação	46
RESUMO	46
1. INTRODUÇÃO	47
2. MATERIAL E MÉTODOS	50
2.1. Isolados dos fungos	50
2.2. Isolados de <i>Penicillium</i> spp.	51
2.3. Extração de metabólitos	51
2.4. Estimativa da concentração correspondente à metade do efeito máximo (CE ₅₀)	52
2.5. Controle de pinta preta do tomate (Micro-tom) em casa de vegetação	54
2.6. Controle da mancha-alvo da soja na casa de vegetação	56
2.7. Análise de metabólitos	58
3. RESULTADOS	59
3.1. Teste de sensibilidade para estimar CE ₅₀	59
3.2. Controle de pinta preta do tomate (Micro-tom) em condições da casa de vegetação	60
3.3. Controle da mancha-alvo de soja em condições da casa de vegetação	63
3.4. Análise química dos extratos	65
4. DISCUSSÃO	66
5. REFERÊNCIAS	69
6. MATERIAL SUPLEMENTAR	77

INTRODUÇÃO GERAL

Doenças de parte aérea causadas por fungos estão entre as principais doenças que afetam plantas cultivadas, sejam grandes culturas, hortaliças, frutíferas ou ornamentais. Estas podem ser causadas por parasitas obrigatórios de hábito biotrófico, como as ferrugens e os oídios ou por parasitas não obrigatórios com hábito hemibiotrófico ou necrotrófico, no caso de antracnoses, manchas foliares e podridões (Agrios, 2005). Essas doenças são policíclicas e, muitas vezes, adquirem carácter ‘explosivo’ sob condições favoráveis de ambiente e alta densidade populacional das plantas hospedeira, resultado do curto período de latência e grande capacidade de produção de esporos, que levam ao crescimento vertiginoso da área foliar infectada em pouco tempo. Os principais danos ocorrem nos tecidos foliares, com perda da área fotossintética e desfolha precoce, mas várias destas doenças também afetam caules, flores e frutos, algumas vezes atingindo até sementes (Agrios, 2005).

Como exemplos de doenças de grande impacto em culturas de alto valor comercial no Brasil, há a ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*), a antracnose (*Colletotrichum truncatum*) e as manchas foliares que afetam a mesma cultura, como a mancha alvo (*Corynespora cassiicola*), a septoriose (*Septoria glycines*), a mancha olho de rã (*Cercospora sojina*) e mancha púrpura (*Cercospora kikuchii*) (Godoy et al., 2016; Dias et al., 2019, de Mello et al., 2021, Edwards Molina et al., 2022). Na cultura do algodão, o destaque vai para a mancha de ramulária, causada pelas espécies *Ramulariopsis gossypii* e *R. pseudoglycines* (Mathioni et al., 2021). As alternarioses, manchas foliares causadas por diferentes espécies do gênero *Alternaria*, afetam várias hortaliças de importância econômica, como as aliáceas, batata, cenoura e tomate (Woudenberg et al., 2014). Diversas fruteiras, bem como plantas ornamentais, e até espécies florestais, são afetadas pelo mofo cinzento, doença causada pelo patógeno necrotrófico polífago *Botrytis cinerea* (Hua et al., 2018; Bika et al., 2021).

Na ausência de cultivares resistentes, o controle de doenças de parte aérea em várias culturas é majoritariamente dependente do uso de fungicidas sintéticos. O controle químico é realizado principalmente com fungicidas sistêmicos altamente eficazes e de ação específica sobre rotas metabólicas de fungos, mas também mais propensos à seleção de populações dos patógenos resistentes ou mais tolerantes aos diferentes princípios ativos (Hollomon, 2015). Fungicidas dos grupos das estrobilurinas, triazóis e carboxamidas são formulados em misturas e/ou aplicados em alternância, visando evitar a seleção de populações resistentes,

mas a perda da eficácia de controle dessas moléculas ainda pode ocorrer ao longo das safras (Dalla Lana et al., 2018; de Mello et al., 2021; Mathioni et al., 2021). Como solução paliativa para continuidade do uso de fungicidas modernos, as formulações comerciais trazem em sua composição moléculas de ação inespecífica e perfil toxicológico menos seguro, com destaque para as substâncias mancozeb e clorotalonil (Hollomon, 2015), fungicidas protetores de amplo espectro lançados no mercado há mais de meio século, com alto potencial de contaminação ambiental e riscos à saúde (Runkle et al., 2017).

O inconveniente da necessidade do uso dos antigos fungicidas protetores para o manejo das doenças fúngicas de parte aérea, com os possíveis impactos ambientais e custos associados a frequentes aplicações em milhões de hectares, suscita a busca por outras formas de proteção foliar. O controle biológico das doenças de parte aérea, como imaginado convencionalmente, incluiria a aplicação de microrganismos capazes de se estabelecer na filosfera das plantas e de antagonizar o patógeno, seja inibindo a germinação e penetração, seja hiperparasitando-o (e.g. da Silva et al., 2021), ou indiretamente, induzindo a planta a uma resposta mais rápida frente à infecção. O problema desta estratégia é a dependência do estabelecimento dos agentes de biocontrole no ambiente foliar de forma homogênea e duradoura, garantindo uma boa eficácia de controle, algo difícil de ser conseguido utilizando os organismos e métodos de aplicação atualmente disponíveis. Outra maneira de pensar a estratégia de controle de doenças foliares policíclicas ‘explosivas’ inclui a aplicação de formulações enriquecidas com os produtos metabólicos bioativos responsáveis pela inibição das ações do patógeno, sob a forma de extratos padronizados contendo misturas de substâncias ativas (Keswani et al., 2019).

Uma tradicional linha de pesquisa para o controle de patógenos / doenças de parte aérea, normalmente tratada como alternativa, é a do uso de extratos e óleos essenciais vegetais, geralmente à base de plantas medicinais (e.g. Silva et al., 2012; Dalcin et al., 2021). O emprego em grande escala do uso de óleos essenciais vegetais não é fácil de ser realizado e o potencial do seu uso comercial segue pouco explorado. Fungos também são produtores de metabólitos secundários com ação antifúngica contra espécies competidoras (Magan e Aldred, 2008). A investigação do metabolismo secundário de fungos é normalmente focada no isolamento, estudo individualizado de moléculas purificadas, geralmente contra alvos de importância médica, com vistas ao desenvolvimento de fármacos (Bladt et al., 2013). Considerando a facilidade de cultivo em grande escala e purificação parcial de metabólitos na

forma de extratos orgânicos, o emprego de extratos padronizados como formulações fungicidas, à maneira dos extratos e óleos vegetais, parece uma alternativa viável para o controle de doenças de parte aérea. Isolados podem ser cultivados em grande escala em espaço relativamente reduzido e, sob condições controladas, produzirem metabólitos de interesse de forma homogênea, facilitando o processo de extração (Grijseels et al., 2017). O uso de solventes polares, como álcoois de cadeia curta, possibilita a obtenção de extratos solúveis em água ou soluções diluídas de emulsificantes, facilitando a composição de caldas.

O gênero *Penicillium* se encontra na família *Aspergillaceae*, ordem *Eurotiales*, classe *Eurotiomycetes* do Filo *Ascomycota*, e filogeneticamente forma um grupo irmão com os fungos do gênero *Aspergillus*. Na fase assexuada, é caracterizada produção de conídios em cadeia a partir de verticilos das fiálides. Os conídios são unicelulares, esféricos a ovais e apresentam geralmente tons de verde. As fiálides podem se originar diretamente sobre uma estipe não ramificada ou em uma, duas ou três estruturas de células de sustentação: a métula, que sustenta a fiálide e um ou dois râmulos, que conectam o conjunto de fiálides-métula à estipe. Se há apenas um verticilo de fiálides sobre a estipe, o conidióforo é monoverticilado (Visagie et al., 2014). O gênero *Talaromyces* é composto por fungos formadores de estruturas assexuadas muito similares àquelas de *Penicillium*, possuindo conidióforos biverticilados, ou seja, formados por métulas originadas na extremidade da estipe e que, por sua vez, sustentam grupos de grupos fiálides acerosas de tamanho similar às métulas. Essas características justificaram a inclusão das espécies de *Talaromyces* no gênero *Penicillium*, especificamente no então Subgênero *Biverticillium*, até o ano de 2011, quando estas foram segregadas com base em análises filogenéticas que mostraram a polifilia do gênero *Penicillium* quando definido com base em caracteres morfológicos (Samson et al., 2011).

Com aproximadamente 500 espécies descritas, habitantes dos mais diversos locais e substratos do planeta, o gênero *Penicillium* é filogeneticamente dividido nos Subgêneros *Penicillium* e *Aspergilloides*, sendo o primeiro o mais investigado em relação à produção de metabólitos bioativos, e o grupo que contém os mais comuns contaminantes de alimentos e alguns produtores de toxinas (Houbraken et al., 2020). Espécies do subgênero *Aspergilloides* são mais comumente recuperadas do solo e matéria orgânica vegetal. Penicilina, compactina, ácido micofenólico, e griseofulvina são alguns exemplos de metabólitos de espécies de *Penicillium* com aplicação direta na medicina. Já patulina, citrinina e ocratoxina são metabólitos produzidos por espécies contaminantes de alimentos e classificadas como

micotoxinas. Milhares de outras moléculas, com bioatividades diversas, já foram isoladas de *Penicillium* spp., e análises genômicas apontam para uma grande diversidade de moléculas ainda não caracterizadas a partir destes fungos (Nielsen et al., 2017).

Diante da dificuldade do uso direto de microrganismos antagonistas a fitopatógenos como agentes de biocontrole de doenças foliares policíclicas, a proposta deste trabalho de Tese foi a de investigar o potencial de extratos contendo metabólitos secundários de isolados de *Penicillium* e *Talaromyces* no controle de doenças foliares. A hipótese motivadora foi a de que extratos orgânicos padronizados de fungos dos gêneros *Penicillium* e *Talaromyces*, conhecidos por sua riqueza metabólica (Kildgaard et al., 2018), possuem ação fungicida direta contra diferentes fungos fitopatogênicos de importância econômica. Esta linha de investigação é suportada pela recente mudança na legislação brasileira, que passou a permitir a utilização de produtos para controle biológico de doenças de plantas compostos apenas por misturas de metabólitos secundários microbianos, os chamados produtos biológicos com microrganismos inativados (Brasil, 2023).

A presente Tese foi dividida em dois capítulos. O Capítulo 1 traz os resultados de uma triagem da atividade antifúngica de extratos de 36 isolados de *Penicillium* e *Talaromyces* contra *Colletotrichum truncatum* e *Corynespora cassiicola*, patógenos da soja, e *Alternaria grandis*, agente causal da pinta preta da batata. Além dos testes *in vitro*, também foi realizada a identificação dos isolados utilizando filogenia e uma análise comparativa dos perfis de metabólitos entre os melhores extratos. No Capítulo 2, quatro extratos de *Penicillium*, selecionados no primeiro estudo, foram testados em diferentes concentrações para a estimativa do valor correspondente à metade da dose efetiva máxima (CE₅₀) contra os mesmos patógenos da soja e contra *Alternaria linariae*, patógeno do tomateiro. Em seguida, extratos de dois isolados de *Penicillium brasilianum* foram testados como biofungicidas protetores para o controle da mancha alvo da soja e da pinta preta do tomateiro.

REFERÊNCIAS

Agrios, G. N. (2005). Plant pathology. Elsevier.

Bika, R., Baysal-Gurel, F., Jennings, C. (2021). *Botrytis cinerea* management in ornamental production: a continuous battle. Canadian Journal of Plant Pathology, 43(3), 345-365.

Bladt, T. T., Frisvad, J. C., Knudsen, P. B., Larsen, T. O. (2013). Anticancer and antifungal compounds from *Aspergillus*, *Penicillium* and other filamentous fungi. *Molecules*, 18(9), 11338-11376.

Brasil, 2023. Portaria Conjunta SDA/MAPA – IBAMA – ANVISA N1, de 10 de abril de 2023. Diário Oficial da União, 84, Seção 1, página 7, 04/05/2023. <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-conjunta-sda/mapa-ibama-anvisa-n-1-de-10-de-abril-de-2023-480871674>

da Silva, H. A. O., Teixeira, W. D., Borges, Á. V., Silva Junior, A. L., Alves, K. S., Rodrigues Junior, O. M., de Abreu, L. M. (2021). Biocontrol of potato early blight and suppression of *Alternaria grandis* sporulation by *Clonostachys* spp. *Plant Pathology*, 70, 1677-1685.

Dalcin, M. S., Dias, B. L., Osorio, P. R. A., Cardoso, V. D., de Souza Ferreira, T. P., Tschoeke, P. H., dos Santos, G. R. (2021). Botanical fungicides in the control of soybean leaf diseases. *Brazilian Journal of Development*, 7(4), 37715-37733.

Dalla Lana, F., Paul, P. A., Godoy, C. V., Utiamada, C. M., da Silva, L. H. C., Siqueri, F. V., ... Del Ponte, E. M. (2018). Meta-analytic modeling of the decline in performance of fungicides for managing soybean rust after a decade of use in Brazil. *Plant disease*, 102(4), 807-817.

de Mello, F. E., Lopes-Caitar, V. S., Prudente, H., Xavier-Valencio, S. A., Franzenburg, S., Mehl, A., Marcelino Guimarães, F., Verreet, J., Balbi-Peña, M., Godoy, C. V. (2021). Sensitivity of *Cercospora* spp. from soybean to quinone outside inhibitors and methyl benzimidazole carbamate fungicides in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 46(1), 69-80.

Dias, M. D., Dias-Neto, J. J., Santos, M. D., Formento, A. N., Bizerra, L. V., Fonseca, M. E. N., Boiteux, L. S., Café-Filho, A. C. (2019). Current status of soybean anthracnose associated with *Colletotrichum truncatum* in Brazil and Argentina. *Plants*, 8(11), 459.

Edwards Molina, J. P., Navarro, B. L., Allen, T. W., Godoy, C. V. (2022). Soybean target spot caused by *Corynespora cassiicola*: a resurgent disease in the Americas. *Tropical Plant Pathology*, 1-17.

Godoy, C. V., Seixas, C. D. S., Soares, R. M., Marcelino-Guimarães, F. C., Meyer, M. C., Costamilan, L. M. (2016). Asian soybean rust in Brazil: past, present, and future. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51, 407-421.

Grijseels, S., Nielsen, J. C., Nielsen, J., Larsen, T. O., Frisvad, J. C., Nielsen, K. F., Frandsen, R. J. N., Workman, M. (2017). Physiological characterization of secondary metabolite producing *Penicillium* cell factories. *Fungal Biology and Biotechnology*, 4(1), 1-12.

Hollomon, D. W. (2015). Fungicide resistance: facing the challenge-a review. *Plant protection science*, 51(4), 170-176.

Houbraken, J., Kocsubé, S., Visagie, C. M., Yilmaz, N., Wang, X. C., Meijer, M., ... Frisvad, J. C. (2020). Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series, and species. *Studies in Mycology*, 96(1), 141-153.

Hua, L., Yong, C., Zhanquan, Z., Boqiang, L., Guozheng, Q., Shiping, T. (2018). Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis cinerea* causing post-harvest decay in fruits and vegetables. *Food Quality and Safety*, 2(3), 111-119.

Keswani, C., Singh, H. B., Hermosa, R., García-Estrada, C., Caradus, J., He, Y. W., Mezaache-Aichour, S., Glare, T. R., Borriss, R., Vinale, F., Sansinenea, E. (2019). Antimicrobial secondary metabolites from agriculturally important fungi as next biocontrol agents. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(23), 9287-9303.

Kildgaard, S., de Medeiros, L. S., Phillips, E., Gotfredsen, C. H., Frisvad, J. C., Nielsen, K. F., Abreu, L. M., Larsen, T. O. (2018). Cyclopiamines C and D: epoxide spiroindolinone alkaloids from *Penicillium* sp. CML 3020. *Journal of natural products*, 81(4), 785-790.

Magan, N., Aldred, D. (2008). Environmental fluxes and fungal interactions: maintaining a competitive edge. In *British Mycological Society Symposia Series (Vol. 27, pp. 19-35)*. Academic Press.

Mathioni, S. M., de Mello, F. E., Antunes, R. F., Duvaresch, D. L., Milanesi, D. F., Brommonschenkel, S. H., Pinho, D. B., Rosa, D. D. (2021). Species Determination and CYTB-G143A Monitoring of *Ramulariopsis* spp. Isolated from Cotton in Brazil. *Plant Health Progress*, 23(1), 4-6.

Nielsen, J. C., Grijseels, S., Prigent, S., Ji, B., Dainat, J., Nielsen, K. F., Frisvad, J. C., Workman, M., Nielsen, J. (2017). Global analysis of biosynthetic gene clusters reveals vast

potential of secondary metabolite production in *Penicillium* species. *Nature Microbiology*, 2(6), 1-9.

Runkle, J., Flocks, J., Economos, J., Dunlop, A. L. (2017). A systematic review of Mancozeb as a reproductive and developmental hazard. *Environment International*, 99, 29-42.

Samson, R. A., Yilmaz, N., Houbraeken, J., Spierenburg, H., Seifert, K. A., Peterson, S. W., Varga, J., Frisvad, J. C. (2011). Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. *Studies in Mycology*, 70(1), 159-183.

Silva, A. C. D., Souza, P. E. D., Machado, J. D. C., Silva, B. M. D., Pinto, J. E. B. P. (2012). Effectiveness of essential oils in the treatment of *Colletotrichum truncatum*-infected soybean seeds. *Tropical Plant Pathology*, 37(5), 305-313.

Woudenberg, J. H. C., Truter, M., Groenewald, J. Z., Crous, P. W. (2014). Large-spored *Alternaria* pathogens in section *Porri* disentangled. *Studies in Mycology*, 79, 1-47.

CAPÍTULO I - Seleção de extratos orgânicos de *Penicillium* spp. e *Talaromyces* spp. com atividade antifúngica a fungos fitopatogênicos foliares

RESUMO

Espécies de fungos dos gêneros *Penicillium* e *Talaromyces* são conhecidos por sua capacidade de produzir uma grande diversidade de metabólitos secundários bioativos. Dada essa riqueza química desses fungos e considerando as limitações do uso direto de microrganismos antagonistas contra fitopatógenos para o controle de doenças foliares policíclicas, este estudo teve como objetivo explorar o potencial antifúngico de extratos de *Penicillium* spp. e *Talaromyces* spp., contendo metabólitos secundários, contra os fitopatógenos *Corynespora cassicola* e *Colletotrichum truncam*, patógenos da parte aérea da soja, e *Alternaria grandis*, agente etiológico da pinta preta em batata. Além dos testes de inibição micelial *in vitro*, também foi realizada a identificação dos isolados utilizando filogenia com sequências do gene RPB2 e uma análise comparativa dos perfis de metabólitos entre os melhores extratos. Dentre os 37 isolados investigados, 27 foram identificados como *Penicillium* spp., 9 como *Talaromyces* spp., e um isolado com morfologia divergente como *Purpureocillium lilacinum*. Desse total, os extratos de sete isolados de seis espécies de *Penicillium*, dois isolados de *Talaromyces pinophilus* e o do isolado UCBV 327 de *P. lilacinum* apresentaram percentagens de inibição de crescimento entre 59% e 100% contra os três patógenos testados. O extrato do isolado UCBV 283 de *Penicillium brasilianum* inibiu completamente o crescimento dos três patógenos em todos os ensaios realizados. Observou-se que a inibição dos extratos está associada a diferentes grupos de metabólitos específicos de cada espécie. Os resultados deste estudo fornecem informações do potencial dos isolados de *Penicillium* e *Talaromyces* como fontes de metabólitos secundários, na busca de novas fontes de biofungicidas para o controle de doenças foliares.

Palavras-chave: Biofungicida, Metabólitos secundários, Doença foliar.

1. INTRODUÇÃO

A adoção do controle biológico de pragas e doenças tem experimentado um crescimento significativo no Brasil. Atualmente, mais de 600 bioprodutos estão registrados no país, sendo que 65% destes são compostos por microrganismos, especialmente fungos e bactérias, utilizados no controle de insetos, nematóides e doenças, principalmente aquelas causadas por fungos. O emprego de microrganismos antagonistas aos patógenos do solo configura uma estratégia de manejo de doenças amplamente adotada no âmbito comercial. No Brasil, os produtos comerciais registrados para esse propósito são predominantemente constituídos por fungos do gênero *Trichoderma* e bactérias do gênero *Bacillus*, com produtos aplicados tanto no tratamento de sementes quanto no sulco de plantio, visando principalmente à erradicação do inóculo presente na área (Bettiol et al., 2019; Meyer et al., 2019; MAPA, 2023).

No caso de doenças que afetam a parte aérea das plantas, o controle biológico é predominantemente realizado através do uso de estirpes de *Bacillus*, que produzem metabólitos secundários com ação antifúngica e sobrevivem na forma de endósporos (Crane et al., 2013; Silva Júnior et al., 2023). No entanto, o controle biológico das doenças foliares enfrenta diversos desafios, especialmente no que se refere ao estabelecimento e manutenção de altas populações de agentes de biocontrole na filosfera. Esses agentes atuam formando uma barreira sobre a superfície foliar, prevenindo a infecção por patógenos. O sucesso do estabelecimento desses agentes de biocontrole é afetado pela baixa disponibilidade de nutrientes e pela necessidade de suportar condições ambientais adversas, como exposição à radiação solar (ultravioleta), excesso de chuvas e variações de temperatura (Vorholt, 2012; Essiedu et al., 2020; da Silva et al., 2021).

Considerando as limitações do uso direto de microrganismos antagonistas contra fitopatógenos para o controle de doenças foliares policíclicas, e o fato de que a antibiose é um mecanismo comum de biocontrole na filosfera, uma alternativa ao uso tradicional do biocontrole inclui a utilização dos metabólitos secundários bioativos responsáveis pela ação antagonista, sendo estes previamente produzidos durante o cultivo em meio de cultura, concentrados e utilizados, na forma de extratos, como biofungicidas químicos de origem biológica (Cortês et al., 2014; Silva Júnior et al., 2023). Neste contexto, a fonte de extratos bioativos não precisa ser limitada aos organismos tipicamente antagonistas usados no controle biológico de doenças, mas pode ser expandida para outros grupos de fungos e bactérias com

reconhecida capacidade metabólica, como bactérias do filo Actinobacteria e ascomicetos da ordem Eurotiales, principalmente dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces* (Frisvad, 2015; Al-Shaibani et al., 2021).

O gênero *Penicillium* se encontra na família *Aspergillaceae*, ordem *Eurotiales*, classe *Eurotiomycetes* do Filo *Ascomycota*, e filogeneticamente forma um grupo irmão com os fungos do gênero *Aspergillus*. O gênero *Talaromyces* é composto por fungos formadores de estruturas assexuadas muito similares àquelas de *Penicillium*, características justificaram a inclusão das espécies de *Talaromyces* no gênero *Penicillium*, especificamente no então Subgênero *Biverticillium*, até o ano de 2011. Atualmente, o gênero *Talaromyces* é classificado na família *Trichocomaceae* (Visagie et al., 2014; Houbraken et al., 2020). Estes três gêneros de fungos são caracterizados por sua riqueza metabólica, com cerca de 4000 metabólitos já descritos, muitos bioatividade comprovada, sejam antibióticos (e.g. penicilinas), antifúngicos (e.g. griseofulvina), inibidores da síntese de colesterol (e.g. lovastatina), imunossupressores (e.g. ácido micofenólico), dentre outros, além de vários compostos tóxicos classificados como micotoxinas (e.g. aflatoxina, ocratoxina, citrinina, verruculogen, roquerfortina, etc) (Frisvad et al., 2004; Frisvad e Larsen, 2015). Dezenas de metabólitos secundários são comumente produzidos por isolados de uma dada espécie, sendo esta produção consistente sob condições padrão de cultivo, o que dá base para o conceito de quimiotaxonomia aplicado a estes organismos, bem como demonstra a possibilidade de se obter, de forma consistente, extratos orgânicos enriquecidos com as mesmas classes de metabólitos em bateladas de cultivo sucessivas (Frisvad, 2015; Grijseels et al., 2017).

Considerando a riqueza química das espécies de fungos dos gêneros *Penicillium* e *Talaromyces* (Kildgaard et al., 2018), surge a hipótese de que a mistura de metabólitos secundários produzidos durante o cultivo desses fungos, concentrada na forma de extratos orgânicos, possui ação fungicida direta contra fungos fitopatógenos foliares, tornando-os candidatos promissores na busca por novas fontes de biofungicidas para o controle de doenças foliares. Este estudo teve como objetivo explorar o potencial de extratos contendo metabólitos secundários de isolados de *Penicillium* e *Talaromyces* na inibição do crescimento de *Colletotrichum truncatum* e *Corynespora cassiicola*, patógenos da parte aérea da soja e *Alternaria grandis*, agente causal da pinta preta da batata. Além dos testes *in vitro*, também foi realizada a identificação dos isolados utilizando filogenia e uma análise comparativa dos perfis de metabólitos entre os melhores extratos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Isolados estudados

A triagem foi realizada com 27 isolados de *Penicillium* spp. e nove isolados de *Talaromyces* spp., e um isolado de *P. lilacinum*, provenientes de diferentes localidades e substratos (solo, sedimento marinho, plantas secas, serapilheiras, plantas vivas como endófitos) do Brasil (Tabela 01) e preservadas na coleção de microrganismos da Unidade de Controle Biológico de Viçosa (UCBV), do Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa (DFP-UFV) - Brasil. Desses, 17 isolados pertencem à Coleção Micológica de Lavras (CML), do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras. As réplicas dos isolados estão preservadas na UCBV da UFV.

2.2. Isolados dos fungos fitopatogênicos

Os testes de inibição micelial foram feitos com os fitopatógenos *Alternaria grandis* Ag588, *Corynespora cassicola* UCBV 332 e *Colletotrichum truncatum* UCBV 259, preservados na coleção de microrganismos da UCBV, do DFP-UFV, Brasil. O isolado Ag588 de *A. grandis* foi fornecido pelo Laboratório de Biologia de populações (Biopop) do DFP-UFV. O isolado UCBV 259 de *C. truncatum* foi isolado de folhas da soja com lesões características de antracnose coletadas de lavouras comerciais no município de Três Passos, no estado de Rio Grande do Sul-Brasil, em 2022. Enquanto o isolado UCBV 332 de *C. cassicola* foi cedido pela empresa Vale Ouro Biotec.

Tabela 01. Isolados avaliados na inibição *in vitro* contra *C. truncatum*, *C. cassicola* e *A. grandis*.

Código UCBV	Outro código	Novo nome	Substrato	Localidade	Referência
UCBV 136a		<i>Talaromyces pinophilus</i>	Contaminante	Viçosa, MG	Este estudo
UCBV 173	CML 3012	<i>Penicillium</i> sp.1	Solo, Mata Atlântica	Parque Estadual Carlos Botelho, São Miguel Arcanjo, SP	Este estudo
UCBV 174	CML 3020	<i>Penicillium</i> sp.1	Solo, Mata Atlântica	Parque Estadual Carlos Botelho, São Miguel Arcanjo, SP	Este estudo
UCBV 240	CMLD 18	<i>Penicillium setosum</i>	Swinglea glutinosa, endófito	São Paulo, SP	Carvalho et al. 2022
UCBV 260		<i>Penicillium rubens</i>	Contaminante de <i>C. cassicola</i>	Viçosa, MG	Este estudo
UCBV 262		<i>Penicillium brevicompactum</i>	Fruto de mamão	Viçosa, MG	Este estudo
UCBV 265	CML 1232	<i>Talaromyces pinophilus</i>	Solo, plantio de algodão	Montividiu, GO	Este estudo
UCBV 267	CML 1238	<i>Talaromyces amestolkiae</i>	Solo, plantio de algodão	Montividiu, GO	Este estudo
UCBV 269	CML 1685	<i>Penicillium rubens</i>	Cacau, endófito	Ilhéus, BA	Este estudo
UCBV 274a		<i>Penicillium rubens</i>	Contaminante	Viçosa, MG	Este estudo
UCBV 279a		<i>Talaromyces aculeatus</i>	Contaminante	Viçosa, MG	Este estudo
UCBV 283	CML 2691	<i>Penicillium brasilianum</i>	<i>Melia azedarach</i> , endófito	São Carlos, SP	Cardoso et al. 2021
UCBV 286a		<i>Penicillium rubens</i>	Contaminante	Viçosa, MG	Este estudo
UCBV 287a		<i>Penicillium brasilianum</i>	Contaminante	Viçosa, MG	Este estudo
UCBV 290	CML 2716	<i>Penicillium tanzanicum</i>	Solo, Mata Atlântica	Estação Ecológica de Assis, Assis, SP	Cardoso et al. 2021
UCBV 292a		<i>Talaromyces stollii</i>	Contaminante	Viçosa, MG	Este estudo
UCBV 294a		<i>Talaromyces amestolkiae</i>	Contaminante	Viçosa, MG	Este estudo
UCBV 295a		<i>Penicillium rubens</i>	Contaminante	Viçosa, MG	Este estudo
UCBV 299	CML 2829	<i>Penicillium daleae</i>	Solo, Mata Atlântica	Estação Ecológica de Assis, Assis, SP	Cardoso et al. 2021
UCBV 302	CML 2965	<i>Penicillium flavigenum</i>	Solo, caverna	MG	Cardoso et al. 2021
UCBV 304	CML 3011	<i>Penicillium</i> sp.2	Solo, Mata Atlântica	Parque Estadual Carlos Botelho, São Miguel Arcanjo, SP	Este estudo
UCBV 307	CML 3016	<i>Penicillium meliponae</i>	Solo, Mata Atlântica	Parque Estadual Carlos Botelho, São Miguel Arcanjo, SP	Este estudo
UCBV 310	CML 3021	<i>Penicillium adametzi</i>	Solo, Mata Atlântica	Estação Ecológica de Assis, Assis, SP	Este estudo
UCBV 314a		<i>Talaromyces amestolkiae</i>	Contaminante	Viçosa, MG	Este estudo
UCBV 315a		<i>Talaromyces amestolkiae</i>	Contaminante	Viçosa, MG	Este estudo
UCBV 316	CML 3991	<i>Penicillium</i> sp.3	Solo	Nova Lima, MG	Este estudo
UCBV 317	CML 3992	<i>Penicillium</i> sp.4	Solo	Nova Lima, MG	Este estudo
UCBV 318	CML 3993	<i>Penicillium</i> sp.5	Solo	Nova Lima, MG	Este estudo
UCBV 319	CML 3994	<i>Penicillium amphipolaria</i>	Solo	Nova Lima, MG	Este estudo
UCBV 320	CML 3995	<i>Penicillium wotroi</i>	Solo	Nova Lima, MG	Este estudo
UCBV 323	P01	<i>Penicillium citrinum</i>	Escleródio de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Viçosa, MG	Este estudo
UCBV 324	P07	<i>Penicillium pulvillorum</i>	Soja, restos de cultura	Viçosa, MG	Este estudo
UCBV 325	P13	<i>Talaromyces stollii</i>	Musgo	Serra Fina, Passa Quatro, MG	Este estudo
UCBV 326	P15	<i>Penicillium frei</i>	Musgo	Serra Fina, Passa Quatro, MG	Este estudo
UCBV 327	P16	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	Musgo	Serra Fina, Passa Quatro, MG	Este estudo
UCBV 328	P19	<i>Penicillium</i> sp.4	Musgo	Serra Fina, Passa Quatro, MG	Este estudo
UCBV 329	P20	<i>Penicillium coprophilum</i>	Musgo	Serra Fina, Passa Quatro, MG	Este estudo

2.3. Identificação molecular

2.3.1. Extração de DNA

Os isolados foram cultivados em placas com extrato de malte ágar coberto com plástico celofane no escuro por cinco dias a 25°C. A biomassa dos fungos foi colhida em tubos de 2 mL e submetida à extração de DNA genômico usando o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, EUA). A qualidade do DNA foi avaliada através da eletroforese, colocando uma mistura de 3 µL de tampão de corrida com adição de gelred e 2 µL de DNA.

2.3.2. Amplificação de PCR, sequenciamento e filogenia

Os primers sintéticos fRPB2-5F e fRPB2-7cr foram utilizados para amplificação parcial do gene da segunda maior subunidade do gene da RNA polimerase II (*RPB2*) (Liu et al., 1999). As reações de PCR foram realizadas em uma mistura de 12,5 µL contendo os reagentes do kit GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (Promega), mais 0,5 µL de cada primer e 1 µL de DNA genômico, e conforme as condições descritas por Liu et al. (1999). Os produtos de PCR foram purificados usando o reagente ExoSAP-IT™ (Applied Biosystems) para eliminar o excesso de primers e nucleotídeos não incorporados. As amostras purificadas foram enviadas para sequenciamento na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

Os eletroferogramas foram analisados no programa SeqAssem (Hepperle, 2004). As sequências consenso foram comparadas com o banco de dados do NCBI, utilizando a ferramenta BLAST e, com base nos resultados, sequências de RPB2 de isolados de referência de espécies de *Penicillium*, *Talaromyces* e *Purpureocillium lilacinum* foram copiadas e usadas para a composição de um alinhamento múltiplo, utilizando a ferramenta MUSCLE, implementada no programa Mega 11 (Tamura et al., 2021). A análise filogenética por Inferência Bayesiana foi conduzida com o programa Mr. Bayes 2.7.3, como implementado no portal CIPRES (<https://www.phylo.org/>), utilizando o modelo evolutivo GTR+I+G, em até 5×10^6 interações, com duas análises concomitantes e descarte de 25% das árvores iniciais. A árvore consenso gerada foi visualizada no programa FigTree (Rambaut, 2009) e editada no programa Inkscape (<https://inkscape.org>).

2.4. Extração de metabólitos

Os isolados foram cultivados em meio extrato de malte ágar durante cinco dias no escuro a 25 °C. Em câmara de fluxo laminar, três plugs de agar com crescimento e esporulação foram transferidos para tubo de Eppendorf de 1,5 mL contendo 1 mL de água destilada estéril mais Tween 80 (0,05%). O conteúdo de cada tubo (1 mL de suspensão de conídios) foi transferido para béquer de plástico de 2 L contendo 100 g de arroz parboilizado e 60 mL de água destilada estéril; o béquer foi coberto com plástico e acondicionado em temperatura ambiente do laboratório da UCBV, em torno de 25 °C, por sete dias. Depois, o plástico foi trocado por papel de filtro esterilizado e os frascos foram acondicionados por mais três dias para a secagem.

A extração dos metabólitos foi etanólica a partir de 100 g de arroz colonizado. A cada bquer com arroz colonizado com fungo foram adicionados 60 mL de etanol (99,5%), seguido de agitação por 1 hora, a 180 rpm e 25 °C. O material foi filtrado em tecido voil e transferido para tubos Falcon de 50 mL para centrifugação a 3000 rpm/5 minutos - velocidade 7 (Centrífuga Excelsa II, modelo 206 BL); o sobrenadante foi transferido para um erlenmeyer. O arroz colonizado foi submetido a uma nova extração com mais 60 mL de etanol por mais 1 hora, repetindo-se o processo de filtragem e centrifugação, juntando-se ao final os sobrenadantes (extrato). Ao final, os extratos foram concentrados em um evaporador rotativo a 40 °C. O material concentrado foi levado para liofilização.

Os extratos concentrados foram submetidos a uma nova extração. Uma alíquota de extrato seco foi transferida para um eppendorf de 1,5 mL e adicionada de 500 µL de uma mistura de metanol e acetato de etila [MeOH:AcOEt (2:1)] e ácido fórmico 1%. Este foi dissolvido com o auxílio de um vórtex e depois os tubos eppendorf de 1,5 mL contendo a mistura foram colocados em um banho ultrassônico por 30 min, seguido de centrifugação a 10.000 rpm, durante 10 min (Centrífuga 5424 eppendorf, modelo 205N). O sobrenadante foi transferido para novos tubos eppendorf e colocados para secar a temperatura ambiente.

2.5. Avaliação da bioatividade e seleção de extratos orgânicos

A bioatividade dos extratos orgânicos foi avaliada na inibição do crescimento micelial de *C. cassiicola*, *A. grandis* e *C. truncatum*. Os extratos (500 mg) foram dissolvidos em 2,5 mL de Metanol (CH₃OH) contendo uma gota de tween 80. Cada extrato concentrado (200 mg/mL) foi misturado com 50 mL de meio batata dextrose ágar (BDA) mais antibiótico cloranfenicol (0,01%), fazendo uma concentração final do extrato de 10 mg/mL no meio de cultivo.

O meio de cultura com o extrato foi distribuído em quatro placas de 60 mm de diâmetro. Um disco do meio com o inóculo dos fitopatógenos *C. cassiicola*, *A. grandis* e *C. truncatum* foi inoculado nas placas (4 placas/patógeno). Como controles, foram utilizados 2,5 mL de Metanol (controle negativo) e o fungicida Elatus (Azoxistrobina 300 mg/g + Benzovindiflupir 150 mg/g) a 0,025 mg/mL de Azoxistrobina + 0,00125 mg/mL de Benzovindiflupir (controle positivo). As placas foram mantidas a 25 °C, fotoperíodo de 12 h por um período de sete dias. Foram avaliados os diâmetros das colônias com auxílio de um paquímetro digital. A porcentagem de inibição de micélio foi calculada com base na equação

1, sendo o diâmetro da colônia do tratamento controle (sem extrato) menos o diâmetro da colônia dos tratamentos dividido por o diâmetro da colônia do tratamento controle e multiplicado por 100:

$$\% \text{ Inibição micelial} = (\emptyset_{\text{controle}} - \emptyset_{\text{tratamento}} / \emptyset_{\text{controle}}) \times 100 \quad (1)$$

Com os dados de percentagem da inibição do crescimento micelial *in vitro* de cada fitopatógeno avaliado foram feitas as análises estatísticas. A homogeneidade das variâncias foi testada pelo teste de Levene e a distribuição normal de resíduos foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. A ANOVA foi feita por meio da função `aov()` e as médias de inibição obtidas para cada extrato foram comparadas pelo Scott Knott no nível $p < 0,05$ por meio da função `SK()` com auxílio do pacote `ScottKnott` no R versão 4.1.2 (R Core Team, 2022).

Uma análise estatística multivariada também foi realizada com os dados médios de inibição do crescimento micelial *in vitro* de 37 extratos contra três fungos fitopatogênicos e dois ensaios diferentes. A visualização dos resultados foi feita através de um mapa de calor (Heatmap) para identificar padrões e relações entre as variáveis. O mapa de calor foi feito por meio da função `Heatmap()` com auxílio do pacote `ComplexHeatmap` no R versão 4.1.2 (R Core Team, 2022).

2.6. Caracterização química dos extratos orgânicos

2.6.1. Preparação de amostras

Os extratos foram obtidos seguindo a metodologia descrita no item 2.3 e foram submetidos a uma nova extração com o seguinte protocolo: Uma pequena alíquota do extrato seco (50 mg) foi transferida para um eppendorf de 1,5 mL, ao qual foram adicionados 100 μL de uma mistura de MeOH:AcOEt (2:1). Os tubos eppendorf de 1,5 mL contendo a mistura foram colocados em um banho ultrassônico por 30 min, seguido de centrifugação a 10.000 rpm, durante 10 min. O sobrenadante foi transferido para novos tubos eppendorf e colocados para secar a temperatura ambiente.

A análise do perfil metabólico foi realizada a partir de alíquotas do extrato orgânico bruto dissolvidas em MeOH e centrifugadas a 13.000 rpm por 10 min. Alíquotas de 5 μL foram injetadas em um sistema de cromatografia líquida Nexera (Shimadzu) com um detector UV-visível de arranjo de diodos SPD M20A e acoplado a um analisador de massa

MicroTOF-QII Quadrupole-Time-of-Flight (QTOF), equipado com uma fonte de ionização por eletrospray (Bruker Daltonics).

A cromatografia foi realizada em coluna analítica Kinetex C18 (100 x 2,1 mm, 2,6 µm) (Phenomenex) mantida a 50 °C e sob fluxo contínuo de 0,35 mL/min. A fase móvel foi composta por água deionizada e acetonitrila grau HPLC, ambos solventes continham 0,1% de ácido fórmico. Para cada corrida, uma eluição isocrática com 15% de acetonitrila entre 0 e 2 min foi seguida por um gradiente de 15% - 95% entre 2 e 12 min, e uma segunda eluição isocrática com 95% entre 12 e 17 minutos.

O espectrômetro de massa foi operado no modo positivo de ionização e o intervalo massa-carga selecionado foi m/z 50 - 1500. A calibração interna do sistema foi feita com uma solução de formato de sódio. A fragmentação induzida por colisão para a geração de íons produzida por MS foi feita automática, com energias de colisão variando de 20 a 65 eV e coletando até cinco íons precursores por ciclo.

2.6.2. Análise química do Perfil metabólico dos extratos

Os dados de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (LC-MS) dos 10 melhores extratos selecionados nos testes de atividade antifúngica foram processados e calibrados no software Bruker Compass DataAnalysis 4.2 (Bruker Daltonics). Os arquivos gerados foram transformados para o formato mzML com o programa MSConvert do pacote Proteowizard (Chambers et al., 2012) e analisados no programa Mzmine3 (Schmid et al., 2023), seguindo protocolos padrão para a detecção, comparação e filtragem de "molecular features" correspondentes aos metabólitos presentes nos cromatogramas (Damiani et al., 2023). Com exceção do extrato do isolado UCBV 323, todos os extratos foram avaliados em duplicatas.

A tabela contendo a distribuição e a intensidade relativa das molecular features (i.e. metabólitos) detectadas nos 29 arquivos processados no Mzmine3 foi usada para uma análise de rede molecular, realizada no site do Global Natural Product Social Molecular Network (GNPS) (<https://gnps.ucsd.edu/>), utilizando os parâmetros recomendados para este tipo de análise (Aron et al., 2020). Os resultados da rede molecular serviram de base para a análise de coordenadas principais (PCoA) realizada automaticamente pelo algoritmo do GNPS, onde os extratos foram agrupados de acordo com a sua composição de metabólitos. O gráfico de

PCoA foi visualizado no site qiime2.org e editado no programa Inkscape (<https://inkscape.org>).

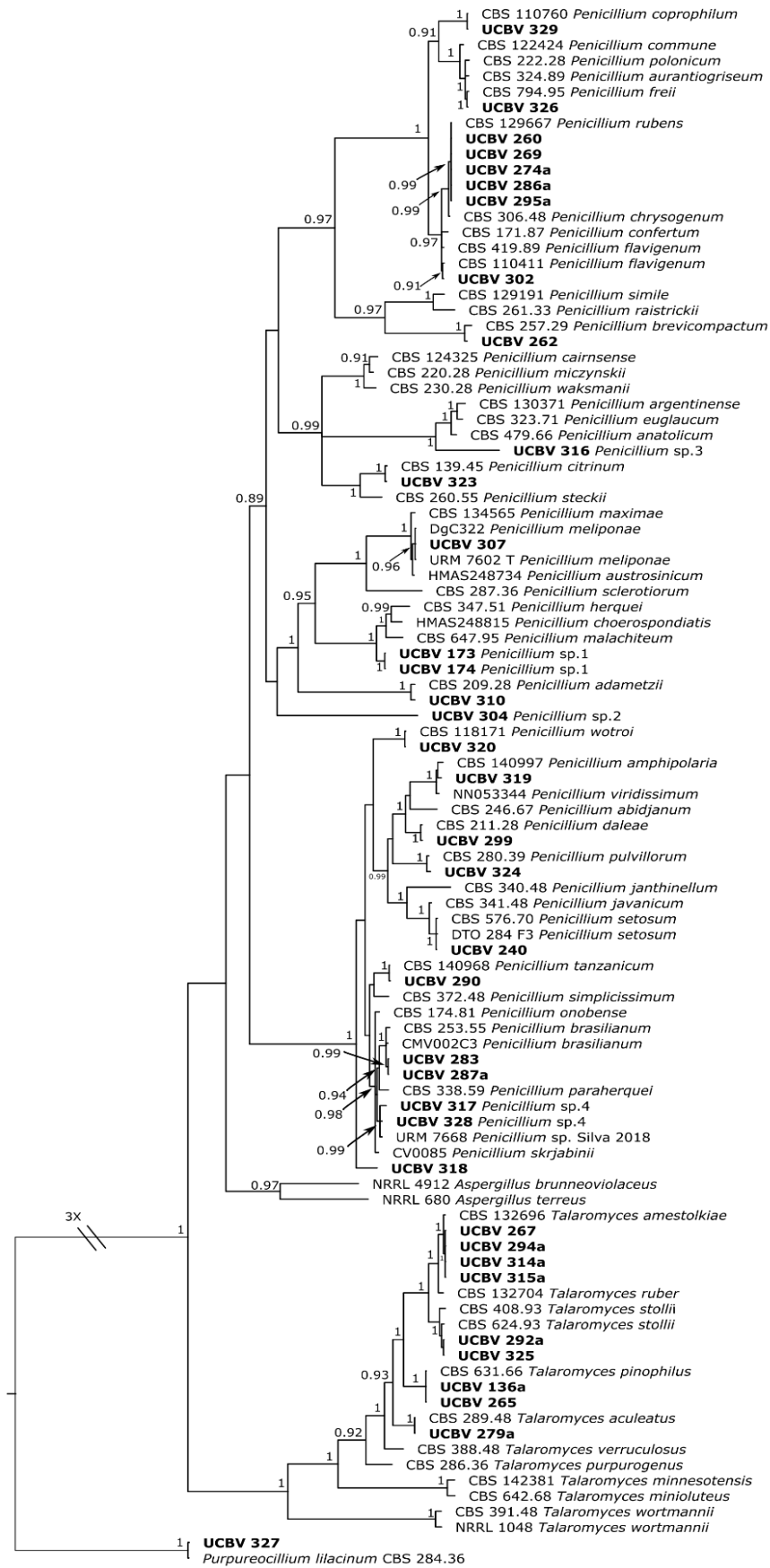
3. RESULTADOS

3.1. Identificação filogenética dos isolados

Quatro isolados de *Penicillium* incluídos neste estudo já haviam sido identificados por Cardoso et al. (2021) e o isolado UCBV 240 foi identificado como *P. setosum* por Carvalho et al. (2023). Os demais isolados foram identificados neste estudo, através da análise filogenética da sequência parcial do gene RPB2 (Figura 1). Do total de 37 isolados investigados, 27 pertencem ao gênero *Penicillium* e nove a *Talaromyces*. O isolado UCBV 327 foi identificado como pertencente à espécie *P. lilacinum* (Família Ophiocordycipitaceae) e usado como outgroup na árvore filogenética de RPB2 (Figura 1).

Dezenove espécies de *Penicillium* foram identificadas, sendo cinco pertencentes ao Subgênero *Penicillium*: *P. brevicompactum* (Seção *Brevicompacta*), *P. coprophilum* (*Robsamsonia*), *P. flavigenum* (*Chrysogena*), *P. frei* (*Fasciculata*) e *P. rubens* (*Chrysogena*). Das 15 espécies do Subgênero *Aspergilloides* identificadas, duas pertencem à Seção *Citrina* (*P. citrinum*, *Penicillium* sp. 3), três à Seção *Sclerotiorum* (*P. adametzi*, *Penicillium* sp.1, *P. meliponae*) e nove à Seção *Lanata-Divaricata* (*P. amphipolaria*, *P. brasilianum*, *P. daleae*, *P. pulvillorum*, *P. setosum*, *Penicillium* sp.4, *Penicillium* sp.5, *P. tanzanicum*, *P. wotroi*). O isolado UCBV 304 (*Penicillium* sp. 2) possivelmente pertence à Seção *Gracilenta*, já que sua sequência de *rpb2* tem 92% de identidade com o isolado ex-tipo de *P. sichuanense*, descrito por Wang et al. (2023).

P. rubens foi a espécie com maior número de isolados (N=4), seguida por *P. brasilianum*, *Penicillium* sp.1 e *Penicillium* sp. 4, com dois isolados cada; as demais espécies foram representadas por apenas um isolado. Dentro do gênero *Talaromyces*, foram identificadas quatro espécies pertencentes à Seção *Talaromyces*, *T. aculeatus* (N=1 isolado), *T. amestolkiae* (N=4), *T. pinophilus* (N=2) e *T. stollii* (N=2).



0.3

Figura 1. Árvore filogenética, obtida por inferência Bayesiana, com sequências parciais do gene *rpb2* de 37 isolados de fungos usados neste estudo e isolados de referência de espécies de *Penicillium*, *Talaromyces* e *Purpureocillium*. Valores de probabilidade posterior são mostrados próximos aos nós. A espécie *P. lilacinum* (isolados UCBV 327 e CBS 248.36) foi usada como grupo externo.

3.2. Seleção de extratos orgânicos de *Penicillium* spp. pela sua bioatividade.

Realizaram-se ensaios *in vitro* para avaliar a bioatividade de 27 extratos orgânicos de *Penicillium* spp., nove de *Talaromyces* spp. e um de *P. lilacinum* na inibição do crescimento micelial dos patógenos *A. grandis*, *C. cassiicola* e *C. truncatum*. Cada ensaio *in vitro* com os patógenos foi repetido, totalizando seis ensaios. Em cada um, as médias de inibição do crescimento micelial por cada extrato foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, após a análise de variância. O efeito inibitório dos extratos, avaliados a 10 mg/mL, teve uma ampla variação, de 0% a 100%, nos diferentes ensaios (Tabelas S1-S3).

No primeiro ensaio de bioatividade dos extratos contra *A. grandis*, os extratos foram classificados em 13 grupos distintos (a-m) e, no segundo ensaio, em 17 grupos (a-q). Onze extratos e o tratamento com o fungicida Elatus inibiram o crescimento micelial em pelo menos 75% no ensaio 1 e quatorze no ensaio 2. Nos dois ensaios, os extratos UCBV 329, UCBV 327, UCBV 304 e UCBV 283 inibiram completamente o crescimento micelial de *A. grandis*, enquanto o extrato UCBV 136a inibiu completamente o crescimento micelial de *A. grandis* apenas no ensaio 2 (Tabela S1).

Em relação à bioatividade dos extratos orgânicos contra *C. cassiicola*, no primeiro ensaio, observaram-se 10 grupos bioativos diferentes (a-j), enquanto no segundo ensaio foram identificados 11 grupos (a-k). Seis extratos demonstraram inibir o crescimento micelial em pelo menos 75% no primeiro ensaio, enquanto nove apresentaram o mesmo efeito no segundo ensaio. Em ambos os ensaios, somente o extrato UCBV 283 conseguiu inibir completamente o crescimento micelial de *C. cassiicola* (Tabela S2).

No primeiro ensaio de bioatividade contra *C. truncatum*, os extratos orgânicos foram separados em 10 grupos diferentes (a-j), já no segundo ensaio, foram observados 13 grupos (a-m). Onze extratos demonstraram inibir o crescimento micelial em 75% ou mais no primeiro ensaio, enquanto treze apresentaram o mesmo efeito no segundo ensaio. Em ambos os ensaios, os extratos UCBV 283, UCBV 287a e UCBV 304 inibiram completamente o

crescimento micelial de *C. truncatum*. Adicionalmente, os extratos UCBV 307 e UCBV 327 mostraram inibição total do crescimento micelial apenas no primeiro ensaio, enquanto o extrato UCBV 323 teve o mesmo resultado somente no segundo ensaio (Tabela S3). A inibição do crescimento micelial proporcionada pelo fungicida Elatus variou entre 96.3% e 97.7% nos quatro ensaios com *C. cassiicola* e *C. truncatum*.

Os resultados dos seis ensaios de inibição de crescimento micelial foram sumarizados em uma análise multivariada de classificação hierárquica, onde os extratos e ensaios foram agrupados de acordo com a sua similaridade e apresentados em um gráfico bidimensional, onde os valores médios de inibição do crescimento micelial de cada combinação extrato-ensaio foram exibidos na forma de um gradiente ou mapa de calor (heatmap) (Figura 2).

O dendrograma superior da figura 2 mostra o agrupamento das repetições dos ensaios conduzidos com cada patógeno, sendo possível observar o agrupamento entre os resultados dos ensaios com *A. grandis* e *C. truncatum*, sugerindo que sensibilidade destes patógenos aos metabólitos é parecida, com uma maior proporção de extratos com níveis de inibição do crescimento micelial próximos a 100% (cor vermelho escuro). Os ensaios com *C. cassiicola* formaram um grupo separado, caracterizado por percentagens menores de inibição deste patógeno pela maioria dos extratos testados.

O dendrograma lateral, contendo o agrupamento dos extratos, foi separado em dois grandes grupos. O grupo superior foi ainda subdividido em dois subgrupos, sendo aquele contendo os melhores extratos, com percentagens de inibição do crescimento micelial entre 59 e 100% contra os três patógenos, formado por extratos de 10 isolados, mais o tratamento com o fungicida (Elatus). Estes 10 isolados pertencem a 6 espécies de *Penicillium*, uma espécie de *Talaromyces* e ao isolado UCBV 327 de *P. lilacinum*. Em destaque ficou o extrato do isolado UCBV 283 de *P. brasilianum*, que inibiu completamente o crescimento dos três patógenos em todos os 6 ensaios (Figuras 2 e 3).

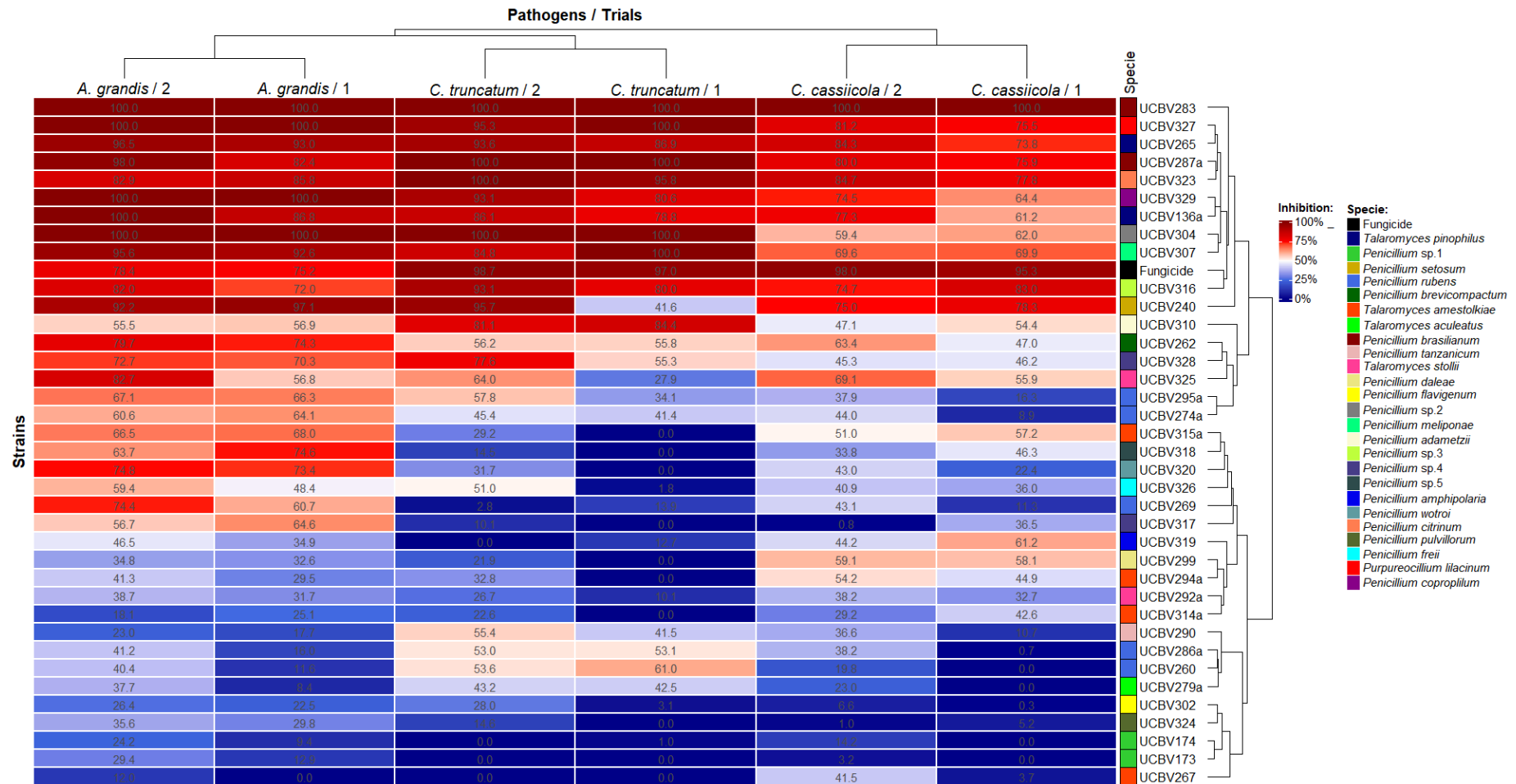


Figura 2. Gráfico de heatmap mostrando as médias de inibição do crescimento micelial de três fitopatógenos por 37 extratos, em seis ensaios independentes. Os resultados da classificação hierárquica dos ensaios e extratos também são mostrados na parte superior e lateral direita da figura.

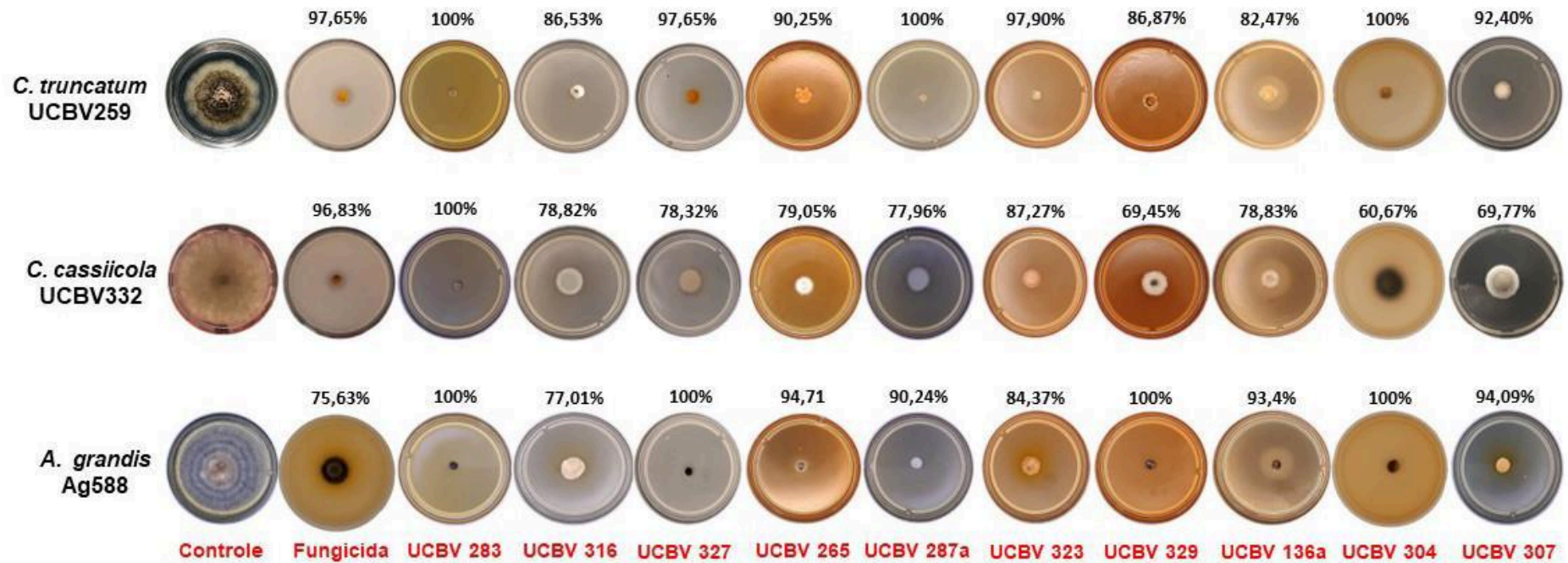


Figura 3. Ilustração do resultado do ensaio de inibição do crescimento micelial de três fitopatógenos pelos 10 extratos mais bioativos. UCBV 283 e 287a (*P. brasilianum*); UCBV 316 (*Penicillium* sp. 3); UCBV 327 (*P. lilacinum*); UCBV 265 e 136a (*T. pinophilus*); UCBV 323 (*P. citrinum*); UCBV 329 (*P. coprophilum*); UCBV 304 (*Penicillium* sp. 2) e UCBV 307 (*P. meliponae*).

3.3. Caracterização química dos extratos

Os perfis de metabólitos detectados por LC-MS nos extratos dos 10 isolados com os melhores resultados de inibição do crescimento micelial dos patógenos *A. grandis*, *C. trucatum* e *C. cassiicola* foram submetidos a uma análise comparativa, pelo método de rede molecular, no portal GNPS e os resultados de compartilhamento de metabólitos entre as amostras foram usados para composição de um gráfico de ordenação de componentes principais (PCoA) (Figura 4).

As três primeiras componentes exibidas no gráfico explicaram 60,58% da variância total dos dados. Em geral, as duplicatas das amostras avaliadas ficaram bem agrupadas, indicando uma boa reprodutibilidade. Apenas o extrato do isolado UCBV 323 foi representado por uma amostra. No caso das espécies *P. brasilianum* e *T. pinophilus*, representadas por extratos de dois isolados cada, o agrupamento das amostras por espécie também foi observado. Por outro lado, não parece haver correlação entre o agrupamento das amostras segundo sua composição de metabólitos e o seu agrupamento de acordo com o nível na inibição do crescimento micelial (Figuras 2 e 4).

Como a análise multivariada foi baseada na rede molecular feita com centenas de moléculas detectadas nas análises, incluindo metabólitos secundários e interferentes, um viés pôde ser observado na disposição das amostras na PCoA, onde aquelas analisadas por LC-MS em dezembro de 2023 (UCBV 304, 323, 327, 329) foram separadas, ao longo do eixo 1, do restante das amostras, analisadas em junho e julho de 2023. Este efeito do 'background' das amostras sobre sua disposição pode explicar o inesperado agrupamento do perfil de metabólitos do isolado UCBV 327, de *P. lilacinum*, com aqueles dos isolados de *Penicillium* avaliados na mesma data (Figura 4).

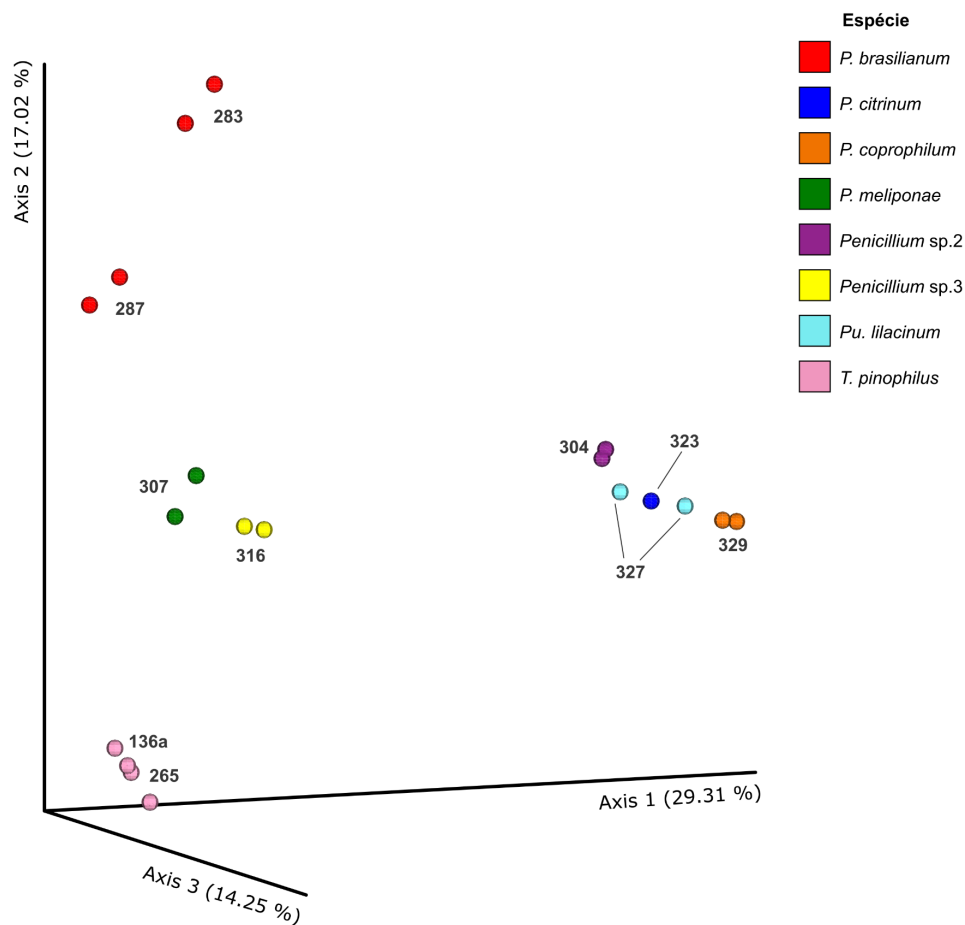


Figura 4. Gráfico da análise ordenação pelo método de coordenadas principais (PCoA), mostrando o agrupamento dos extratos de 10 isolados de *Penicillium*, *Talaromyces* e *Purpureocillium* com base em sua composição química. A porcentagem da variância explicada por cada ordenada é mostrada junto aos eixos do gráfico. A análise foi baseada nos resultados de uma análise de rede molecular conduzida no portal do GNPS.

4. DISCUSSÃO

Neste capítulo, foram estudados 37 isolados, dos quais 5 isolados de *Penicillium* já haviam sido identificados em trabalhos anteriores (Cardoso et al., 2021; Carvalho et al., 2023). Dos 32 isolados restantes, 31 apresentavam morfologia típica de *Penicillium*, e um isolado, de coloração rosada, tinha conidióforos típicos do morfo-gênero *Paecilomyces*, como definido previamente aos estudos filogenéticos (e.g. Domsch et al., 1980). Esses isolados

foram identificados com base em análise filogenética, utilizando sequências parciais do gene da segunda maior subunidade da polimerase II (RPB2).

A análise filogenética mostrou que os isolados com morfologia semelhante à de *Penicillium* foram classificados em dois gêneros dentro da ordem *Eurotiales*: *Penicillium*, com 27 isolados, e *Talaromyces*, com 9 isolados. A similaridade morfológica entre a fase assexuada de *Penicillium* e *Talaromyces* ilustra um desafio comum na micologia. Muitos gêneros e espécies de fungos apresentam morfologias convergentes, o que pode levar a classificações errôneas baseadas apenas em características visuais. Até 2011, espécies de *Talaromyces* eram classificadas dentro de *Penicillium*, indicando que a distinção entre esses gêneros não era clara até que os métodos de filogenia molecular começassem a serem empregados como rotina para a delimitação de gêneros e espécies (Houbraken e Samson, 2011; Samson et al., 2011; Houbraken et al., 2014; Visagie et al., 2014; Houbraken et al., 2020).

Dentro do gênero *Penicillium*, foram identificadas 4 espécies do subgênero *Penicillium*, e 15 espécies do subgênero *Aspergilloides*. Isso reflete a diversidade de espécies presente neste grupo de fungos, onde uma amostragem aleatória de 26 isolados resulta em um número muito próximo de espécies distintas (Houbraken et al., 2020). Além disso, o maior número de espécies identificadas no subgênero *Aspergilloides* reflete a origem dos isolados, que na sua maioria foram obtidos do solo e plantas. Por fim, o isolado de *Paecilomyces*-like foi identificado como *Purpureocillium lilacinum*, uma espécie pertencente à família Ophiocordyciptaceae, filogeneticamente distante dos demais *Eurotiales* incluídos neste estudo (Luangsa-ard et al., 2011).

A análise multivariada combinada dos resultados dos ensaios *in vitro* de inibição do crescimento micelial pelos extratos contra *A. grandis*, *C. truncatum* e *C. cassicola* mostrou o agrupamento das repetições dos ensaios com cada patógeno, indicando a consistência dos resultados obtidos em ensaios independentes. O agrupamento dos resultados dos ensaios com *A. grandis* e *C. truncatum* no dendrograma sugere que a sensibilidade desses patógenos aos extratos é semelhante. Isso indica que os compostos presentes nos extratos testados têm uma eficácia comparável contra ambos os patógenos, evidenciando o potencial de ação de amplo espectro dos extratos, característica importante para o desenvolvimento de biofungicidas para o controle de doenças foliares em diferentes culturas (Marrone, 2002). Já os ensaios contra *C.*

cassiicola formaram um grupo distinto no dendrograma, caracterizado por um menor número de extratos com percentagens de inibição do crescimento micelial iguais ou maiores que 75%, o que indica uma menor sensibilidade deste fungo aos extratos testados em comparação com os outros patógenos. Estas diferenças de sensibilidade podem corresponder a adaptações fenotípicas distintas de cada espécie alvo avaliada ou características intrínsecas aos isolados testados, o que só pode ser elucidado realizando-se ensaios de inibição com mais isolados de cada espécie.

Quanto à inibição do crescimento micelial pelos extratos contra os três patógenos, identificou-se um padrão consistente que agrupa os extratos com maior efeito inibitório, apresentando porcentagens de inibição entre 59% e 100% contra todos os patógenos testados. Este grupo foi composto por extratos de 10 isolados diferentes, além do tratamento com o fungicida Elatus. Neste foram incluídos extratos de sete isolados de seis espécies de *Penicillium*, dois isolados de *T. pinophilus* e o isolado UCBV 327 de *P. lilacinum*. Embora tenham exibido níveis de atividade antifúngica semelhantes no conjunto de ensaios contra os três patógenos, os 10 extratos possuem composições químicas distintas, com exceção daqueles derivados de isolados da mesma espécie, como evidenciado na análise de PCoA.

O extrato do isolado UCBV 283 de *P. brasilianum* inibiu completamente o crescimento dos três patógenos em todos os ensaios realizados. O extrato do isolado UCBV 287a, da mesma espécie, apresentou resultados semelhantes de inibição de *A. grandis* e *C. truncatum*, tendo tido eficiência um pouco menor frente a *C. cassiicola*. A atividade antifúngica de metabólitos secundários de um isolado identificado como *P. brasilianum* foi descrita contra *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium solani* (Tang et al., 2015). Dentre os metabólitos bioativos identificados pelos autores estão isoroquefortina C, griseofulvina e esteróides, sendo os dois primeiros metabólitos típicos de espécies do subgênero *Penicillium*, mas não de *P. brasilianum* (Frisvad et al., 2004).

Também se destacaram os extratos de isolados das espécies *P. citrinum* (UCBV 323), *P. coprophilum* (UCBV 329) e *P. meliponae* (UCBV 307), além dos isolados não identificados UCBV 304 (*Penicillium* sp. 2) e UCBV 316 (*Penicillium* sp. 3), que possivelmente pertencem a espécies ainda não descritas formalmente. Citrinina e seus análogos formam um dos principais grupos de policetídeos produzidos por *P. citrinum* e

espécies próximas, e que possuem atividade antifúngica já descrita contra diferentes grupos de ascomicetos, incluindo fitopatógenos (Luo et al., 2019) e patógenos de insetos (*Beauveria bassiana*) (dos Santos et al., 2012). É possível que esta classe de metabólitos seja responsável por parte significativa da atividade antifúngica do extrato do isolado UCBV 323. Além de metabólitos secundários, proteínas com ação antifúngica também já foram purificadas a partir de culturas de *P. citrinum* (Wu et al., 2016). Isolados de *P. coprophilum* produzem diferentes grupos de metabólitos, incluindo griseofulvina, com atividade antifúngica e utilidade em medicina, para uso tópico (Bills e Gloer, 2016). Azafilonas são metabólitos tipicamente produzidos por espécies da Seção *Sclerotiorum*, sendo a esclerotiorina a mais conhecida. *P. meliponae* pertence a esta Seção e é capaz de produzir quase duas dezenas de análogos da esclerotiorina (Peres et al., 2023). Certos metabólitos desta classe possuem atividade antifúngica (Lucas et al., 2007; Wu et al., 2019) e, portanto, podem ser responsáveis pelo efeito antifúngico do extrato do isolado UCBV 307.

Extratos de dois isolados de *T. pinophilus* ficaram entre os 10 melhores nos ensaios de inibição do crescimento micelial dos fitopatógenos. Na literatura, a atividade antifúngica de metabólitos secundários produzidos por *T. pinophilus* não está clara, mas há relatos de micoparasitismo e até controle biológico de patógenos de solo por isolados desta espécie (Abdel-Rahim e Abo-Elyousr, 2018; Kazerooni et al., 2019), sendo provável a participação de compostos bioativos nestas interações. O isolado UCBV 327 de *P. lilacinum* foi isolado junto a outros cinco a partir de uma amostra de musgo e incluído ‘por curiosidade’ na triagem, tendo o seu extrato ficado entre os melhores nos ensaios de inibição. Esta espécie é conhecida por habitar o solo, sendo utilizada no controle biológico de insetos e nematóides, além de ser reconhecida como fonte de metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas e antifúngicas (Liu et al., 2020; Chen e Hu, 2021).

Os resultados deste estudo fornecem informações inéditas sobre a diversidade metabólica e a atividade antifúngica marcante de extratos orgânicos de fungos dos gêneros *Penicillium*, *Talaromyces* e *Purpureocillium*. Embora milhares de metabólitos bioativos já tenham sido isolados e investigados a partir de fungos destes grupos (van Santen et al., 2022), testes de atividade antifúngica contra fitopatógenos são menos comuns do que aqueles contra bactérias, leveduras de importância médica e alvos humanos, como células tumorais (Frisvad et al., 2004; Chen e Hu, 2021). Da mesma forma, o foco da grande maioria das

pesquisas está na purificação de metabólitos secundários e sua caracterização biológica em isolamento e não avaliação dos extratos brutos, contendo misturas de dezenas de moléculas com perfis de bioatividade distintos. Considerando a possibilidade do uso no controle de doenças de plantas, os extratos são mais fáceis e baratos de serem produzidos e sua composição complexa, embora consistente, é vantajosa visto a pequena probabilidade de seleção de populações de patógenos resistentes a diferentes grupos químicos ao mesmo tempo.

5. REFERÊNCIAS

- Abdel-Rahim, I. R., Abo-Elyousr, K. A. (2018). *Talaromyces pinophilus* strain AUN-1 as a novel mycoparasite of *Botrytis cinerea*, the pathogen of onion scape and umbel blights. *Microbiological Research*, 212, 1-9.
- Al-Shaibani, M. M., Radin Mohamed, R. M. S., Sidik, N. M., Enshasy, H. A. E., Al-Gheethi, A., Noman, E., Al-Mekhlafi, N. A., Zin, N. M. (2021). Biodiversity of secondary metabolites compounds isolated from phylum actinobacteria and its therapeutic applications. *Molecules*, 26(15), 4504.
- Aron, A. T., Gentry, E. C., McPhail, K. L., Nothias, L. F., Nothias-Esposito, M., Bouslimani, A., ... & Dorrestein, P. C. (2020). Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. *Nature protocols*, 15(6), 1954-1991.
- Bettioli, W., Pinto, Z.V., Silva, J.C., Forner, C., Faria, M.R., Pacifico, M.G., Silva, J. 2019. Produtos comerciais à base de *Trichoderma*. *Trichoderma*, 45.
- Bills, G. F., & Gloer, J. B. (2016). Biologically active secondary metabolites from the fungi. *Microbiology spectrum*, 4(6), 10-1128.
- Cardoso, E. B., Ferreira, D., Moreira, G. M., Pfenning, I. H., Rodrigues-Filho, E., Abreu, L. M. (2021). MALDI-TOF mass spectrometry-based identification of *Eurotiales* from different substrates and locations in Brazil. *Mycological Progress*, 20, 539–548.

Carvalho, A. C., Lima, C. S., Torquato, H. F. V., Domiciano, A. T., Silva, S. C., de Abreu, L. M., Uemi, M., Paredes-Gamero, E. J., Vieira, P. C., Veiga, T. A. M., et al. (2023) Chemodiversity and Anti-Leukemia Effect of Metabolites from *Penicillium setosum* CMLD 18. *Metabolites*, 13(1), 23.

Chambers, M. C., Maclean, B., Burke, R., Amodei, D., Ruderman, D. L., Neumann, S., ... Mallick, P. (2012). A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nature biotechnology*, 30(10), 918-920.

Chen, W., and Hu, Q. (2021). Secondary Metabolites of *Purpureocillium lilacinum*. *Molecules*, 27(1), 18.

Crane, J. M., Gibson, D. M., Vaughan, R. H., Bergstrom, G. C. 2013. Iturin levels on wheat spikes linked to biological control of *Fusarium* head blight by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Phytopathology*, 103, 146-155.

Côrtes, M. V., Silva-Lobo, V. L., Filippi, M. C., Lima, D., Prabhu, A. S. (2014). Potential for using crude extract of *Sarocladium oryzae* for suppression of rice blast. *Tropical Plant Pathology*, 39, 28-34.

Damiani, T., Heuckeroth, S., Smirnov, A., Mokshyna, O., Brungs, C., Korf, A., Smith, J., Stincone, P., Dreolin, N., Nothias, L-F., Hyötyläinen, T., Orešič, M., Karst, U., Dorrestein, P., Petras, D., Xiuxia Du, X., van der Hoof, J., Schmid, R., Pluskal, T. (2023). Mass spectrometry data processing in MZmine 3: feature detection and annotation. *ChemRxiv*.

da Silva, H. A. O., Teixeira, W. D., Borges, Á. V., Silva Junior, A. L., Alves, K. S., Rodrigues Junior, O. M., de Abreu, L. M. (2021). Biocontrol of potato early blight and suppression of *Alternaria grandis* sporulation by *Clonostachys* spp. *Plant Pathology*, 70, 1677-1685.

Domsch, K. H., Gams, W., Anderson, T. H. (1980). *Compendium of soil fungi*. Volume 1. Academic Press (London) Ltd.

dos Santos, C. M. C., Costa, G. L. D., Figueroa-Villar, J. D. (2012). Identification of citrinin as the defence metabolite of *Penicillium corylophilum* stressed with the antagonist fungus *Beauveria bassiana*. *Natural Product Research*, 26(24), 2316-2322.

Essiedu, J.A., Adepoju, F.O., Ivantsova, M.N. 2020. Benefits and limitations in using biopesticides: A review. In: AIP Conference Proceedings. AIP Publishing LLC, 2313, 080002.

Frisvad, J. C., Smedsgaard, J., Larsen, T. O., Samson, R. A. (2004). Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. Stud. Mycol, 49(201), e41.

Frisvad, J. C., & Larsen, T. O. (2015). Chemodiversity in the genus *Aspergillus*. Applied Microbiology and Biotechnology, 99, 7859-7877.

Frisvad, J. C. (2015). Taxonomy, chemodiversity, and chemoconsistency of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* species. Frontiers in Microbiology, 5, 126088.

Grijseels, S., Nielsen, J. C., Nielsen, J., Larsen, T. O., Frisvad, J. C., Nielsen, K. F., Frandsen, R. J. N., Workman, M. (2017). Physiological characterization of secondary metabolite producing *Penicillium* cell factories. Fungal biology and biotechnology, 4, 1-12.

Houbraken, J., Kocsubé, S., Visagie, C. M., Yilmaz, N., Wang, X.-C., Meijer, M., Kraak, B., Hubka, V., Bensch, K., Samson, R.A., and Frisvad, J. C. (2020). Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. Studies In Mycology, 95, 5–169.

Hepperle, D. (2004). SeqAssem (C). A sequence analysis tool, contig assembler and trace data visualisation tool for molecular sequences. http://www.sequentix.de/software_seqassem.php.

Houbraken, J., de Vries, R. P., Samson, R. A. (2014). Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. Adv Appl Microbiol, 86, 199–249.

Houbraken, J., & Samson, R. A. (2011). Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. Studies in Mycology, 70, 1–51.

Kazerooni, E. A., Rethinasamy, V., Al-Sadi, A. M. (2019). *Talaromyces pinophilus* inhibits *Pythium* and *Rhizoctonia*-induced damping-off of cucumber. Journal of Plant Pathology, 101, 377-383.

Kildgaard, S., de Medeiros, L. S., Phillips, E., Gottfredsen, C. H., Frisvad, J. C., Nielsen, K. F., Abreu, L. M., Larsen, T. O. (2018). Cyclopiamines C and D: epoxide spiroindolinone alkaloids from *Penicillium* sp. CML 3020. *Journal of natural products*, 81(4), 785-790.

Liu, R., Khan, R. A. A., Yue, Q., Jiao, Y., Yang, Y., Li, Y., Xie, B. (2020). Discovery of a new antifungal lipopeptaibol from *Purpureocillium lilacinum* using MALDI-TOF-IMS. *Biochem Biophys Res Commun*, 527(3), 689-695.

Liu, Y.J., Whelen, S., Hall, B.D. (1999). Phylogenetic relationships among Ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Mol Biol Evol*, 16, 1799–1808.

Lucas, E. M., Castro, M. C., & Takahashi, J. A. (2007). Antimicrobial properties of sclerotiorin, isochromophilone VI and pencolide, metabolites from a Brazilian cerrado isolate of *Penicillium sclerotiorum* Van Beyma. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 785-789.

Luo, H., Qing, Z., Deng, Y., Deng, Z., Tang, X. A., Feng, B., Lin, W. (2019). Two polyketides produced by endophytic *Penicillium citrinum* DBR-9 from medicinal plant *Stephania kwangsiensis* and their antifungal activity against plant pathogenic fungi. *Natural product communications*, 14(5), 1934578X19846795.

Luangsa-Ard, J., Houbraken, J., van Doorn, T., Hong, S. B., Borman, A. M., Hywel-Jones, N. L., & Samson, R. A. (2011). *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS microbiology letters*, 321(2), 141-149.

MAPA. 2024. Agrofít – Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons [Acesso em 11 de junho de 2024]

Meyer, M. C., Mazaro, S. M., Silva, J. C. da. (2019). *Trichoderma*: uso na agricultura. Brasília, DF: Embrapa, 536p.

Marrone, P. G. (2002). An effective biofungicide with novel modes of action. *Pesticide Outlook*, 13(5), 193-194.

Peres, E. G., Souza, M. P., Sousa, T. F., Silva, C. V. D., Barros, A. L., Silva, F. M. D., Costa, E. V., de Medeiros, L. S., Forim, M. R., de Souza, A. D. L., Paz, W. H. P., da Silva, G. F., de

Souza, A. Q. L., Koolen, H. H. (2023). Dereplication of sclerotiorin-like azaphilones produced by *Penicillium meliponae* using LC-MS/MS analysis and molecular networking. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 34(8), 1139-1153.

Rambaut, A. (2009). FigTree. Tree figure drawing tool. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.

R Core Team (2023). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.

Samson, R. A., Yilmaz, N., Houbraken, J., Spierenburg, H., Seifert, K. A., Peterson, S. W., Varga, J., Frisvad, J. C. (2011). Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. *Studies in Mycology*, 70(1), 159-83.

Schmid, R., Heuckeroth, S., Korf, A., Smirnov, A., Myers, O., Dyrlund, T. S., ... Pluskal, T. (2023). Integrative analysis of multimodal mass spectrometry data in MZmine 3. *Nature Biotechnology*, 41(4), 447-449.

Silva Junior, A.L., Borges, Á.V., da Silva, H.A.O., Leite, I.C.H., Alves, K.S., de Medeiros, L.S., Abreu, L.M. (2023). Lipopeptide-enriched extracts of *Bacillus velezensis* B157 for controlling tomato early blight. *Crop Protection*, 172, 106317.

Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027.

Tang, H. Y., Zhang, Q., Li, H., & Gao, J. M. (2015). Antimicrobial and allelopathic metabolites produced by *Penicillium brasilianum*. *Natural Product Research*, 29(4), 345-348.

van Santen, J. A., Poynton, E. F., Iskakova, D., McMann, E., Alsup, T. A., Clark, T. N., Fergusson, C. H., Fewer, D. P., Hughes, A. H., McCadden, C. A., Parra, J., Soldatou, S., Rudolf, J. D., Janssen, E. M-L., Duncan, K. R., Linington, R. G. (2022). The Natural Products Atlas 2.0: a database of microbially-derived natural products. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D1317-D1323.

Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S-B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K. A., Varga, J., Yaguchi, T., and Samson, R. A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 78, 343–71.

Vorholt, J.A. 2012. Microbial life in the phyllosphere. *Nature reviews microbiology*, 10, 828-840.

Wang, X. C., Zhang, Z. K., Zhuang, W. Y. (2023). Species Diversity of *Penicillium* in Southwest China with Discovery of Forty-Three New Species. *Journal of Fungi*, 9(12), 1150.

Wu, C. W., Wu, X., Wen, C., Peng, B., Peng, X. X., Chen, X., Li, H. (2016). Fructose promotes growth and antifungal activity of *Penicillium citrinum*. *Protein & Cell*, 7(7), 527-532.

Wu, N. N., Hou, X. M., Wei, M. Y., Zheng, J. Y., & Shao, C. L. (2019). Antifungal and antibacterial activities of azaphilones from the gorgonian-derived *Penicillium sclerotiorum* Fungus. *Chemistry of Natural Compounds*, 55, 549-551.

6. MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Bioatividade de 37 extratos orgânicos contra *Alternaria grandis*.

Ensaio 1			Ensaio 2		
Extratos	Inibição micelial (%)	Scott-Nnott *	Extratos	Inibição micelial (%)	Scott-Knott *
UCBV327	100	a	UCBV327	100	a
UCBV329	100	a	UCBV329	100	a
UCBV304	100	a	UCBV304	100	a
UCBV283	100	a	UCBV283	100	a
UCBV240	97.13	a	UCBV136	100	a
UCBV265	92.97	b	UCBV287a	98.04	a
UCBV307	92.6	b	UCBV265	96.46	b
UCBV136	86.8	c	UCBV307	95.58	b
UCBV323	85.82	c	UCBV240	92.23	c
UCBV287a	82.44	c	UCBV323	82.92	d
Fungicida	74.88	d	UCBV325	82.7	d
UCBV318	74.65	d	UCBV316	82.05	d
UCBV262	74.35	d	UCBV262	79.69	d
UCBV320	73.44	d	Fungicida	76.38	e
UCBV316	71.98	d	UCBV320	74.85	f
UCBV328	70.29	e	UCBV269	74.38	f
UCBV315	67.96	e	UCBV328	72.7	g
UCBV295	66.29	f	UCBV295	67.14	h
UCBV317	64.59	f	UCBV315	66.53	h
UCBV274	64.07	f	UCBV318	63.71	h
UCBV269	60.66	g	UCBV274	60.62	i
UCBV310	56.94	g	UCBV326	59.44	i
UCBV325	56.76	g	UCBV317	56.67	j
UCBV326	48.38	h	UCBV310	55.45	j
UCBV319	34.91	i	UCBV319	46.45	k
UCBV299	32.57	i	UCBV294	41.35	l
UCBV292	31.71	i	UCBV286	41.2	l
UCBV324	29.82	i	UCBV260	40.38	l
UCBV294	29.49	i	UCBV292	38.71	l
UCBV314	25.15	j	UCBV279	37.72	l
UCBV302	22.46	j	UCBV324	35.56	m
UCBV290	17.75	k	UCBV299	34.77	m
UCBV286	15.96	k	UCBV173	29.43	n
UCBV173	12.88	l	UCBV302	26.35	n
UCBV260	11.62	l	UCBV174	24.17	o
UCBV174	9.4	l	UCBV290	23.03	o
UCBV279	8.45	l	UCBV314	18.07	p
UCBV267	0	m	UCBV267	12.04	q

* As letras representam o agrupamento de acordo com o teste de Scott-Knott ($p > 0,05$).

Tabela S2. Bioatividade de 37 extratos orgânicos contra *Corynespora cassiicola*.

Ensaio 1			Ensaio 2		
Extratos	Inibição micelial (%)	Scott-Nnott*	Extratos	Inibição micelial (%)	Scott-Knott*
UCBV283	100	a	UCBV283	100	a
Fungicida	97.39	a	Fungicida	96.26	a
UCBV316	82.97	b	UCBV323	84.74	b
UCBV240	78.3	b	UCBV265	84.33	b
UCBV323	77.79	b	UCBV327	81.18	b
UCBV287a	75.89	c	UCBV287a	80.03	b
UCBV327	75.46	c	UCBV136	77.28	c
UCBV265	73.78	c	UCBV240	75.04	c
UCBV307	69.92	c	UCBV316	74.68	c
UCBV329	64.43	d	UCBV329	74.46	c
UCBV304	61.99	d	UCBV307	69.61	d
UCBV319	61.22	d	UCBV325	69.07	d
UCBV136	61.21	d	UCBV262	63.41	d
UCBV299	58.14	e	UCBV304	59.35	e
UCBV315	57.24	e	UCBV299	59.12	e
UCBV325	55.88	e	UCBV294	54.23	e
UCBV310	54.44	e	UCBV315	51	f
UCBV262	47	f	UCBV310	47.15	f
UCBV318	46.25	f	UCBV328	45.27	f
UCBV328	46.24	f	UCBV319	44.22	f
UCBV294	44.85	f	UCBV274	44.03	f
UCBV314	42.62	f	UCBV269	43.08	f
UCBV317	36.51	g	UCBV320	42.99	f
UCBV326	36.01	g	UCBV267	41.51	f
UCBV292	32.73	g	UCBV326	40.88	f
UCBV320	22.4	h	UCBV286	38.23	g
UCBV295	16.29	i	UCBV292	38.23	g
UCBV269	11.27	i	UCBV295	37.89	g
UCBV290	10.74	i	UCBV290	36.65	g
UCBV274	8.91	i	UCBV318	33.8	h
UCBV324	5.19	j	UCBV314	29.22	h
UCBV267	3.67	j	UCBV279	22.97	i
UCBV286	0.71	j	UCBV260	19.83	i
UCBV302	0.31	j	UCBV174	14.19	j
UCBV174	0	j	UCBV302	6.59	k
UCBV173	0	j	UCBV173	3.24	k
UCBV260	0	j	UCBV324	1	k
UCBV279	0	j	UCBV317	0.75	k

* As letras representam o agrupamento de acordo com o teste de Scott-Knott ($p > 0,05$).

Tabela S3. Bioatividade de 37 extratos orgânicos contra *Colletotrichum truncatum*.

Ensaio 1			Ensaio 2		
Extratos	Inibição micelial (%)	Scott-Nnott*	Extratos	Inibição micelial (%)	Scott-Knott *
UCBV287	100	a	UCBV304	100	a
UCBV283	100	a	UCBV283	100	a
UCBV307	100	a	UCBV287	100	a
UCBV304	100	a	UCBV323	100	a
UCBV327	100	a	Fungicida	97.6	a
Fungicida	97.7	a	UCBV240	95.7	b
UCBV323	95.8	a	UCBV327	95.3	b
UCBV265	86.87	b	UCBV265	93.64	b
UCBV310	84.37	b	UCBV329	93.12	b
UCBV329	80.63	c	UCBV316	93.09	b
UCBV316	79.96	c	UCBV136	86.15	c
UCBV136	78.79	c	UCBV307	84.81	c
UCBV260	61.05	d	UCBV310	81.12	d
UCBV262	55.8	e	UCBV328	77.62	d
UCBV328	55.33	e	UCBV325	64.02	e
UCBV286	53.06	e	UCBV295	57.84	f
UCBV279	42.49	f	UCBV262	56.17	f
UCBV240	41.64	f	UCBV290	55.4	f
UCBV290	41.55	f	UCBV260	53.59	f
UCBV274	41.44	f	UCBV286	53.04	f
UCBV295	34.12	g	UCBV326	51.05	f
UCBV325	27.88	h	UCBV274	45.39	g
UCBV269	13.92	i	UCBV279	43.19	g
UCBV319	12.72	i	UCBV294	32.75	h
UCBV292	10.06	i	UCBV320	31.75	h
UCBV302	3.15	j	UCBV315	29.18	i
UCBV326	1.78	j	UCBV302	27.96	i
UCBV174	1.01	j	UCBV292	26.74	i
UCBV173	0	j	UCBV314	22.65	j
UCBV267	0	j	UCBV299	21.86	j
UCBV320	0	j	UCBV324	14.64	k
UCBV324	0	j	UCBV318	14.53	k
UCBV318	0	j	UCBV317	10.07	l
UCBV315	0	j	UCBV269	2.76	m
UCBV299	0	j	UCBV173	0	m
UCBV317	0	j	UCBV174	0	m
UCBV314	0	j	UCBV267	0	m
UCBV294	0	j	UCBV319	0	m

* As letras representam o agrupamento de acordo com o teste de Scott-Knott ($p > 0,05$).

CAPÍTULO II: Controle de doenças foliares com extratos orgânicos de *Penicillium* spp. em condições de casa de vegetação

RESUMO

O controle biológico de doenças da parte aérea das plantas é um desafio, pois depende da manutenção de altos níveis populacionais de agentes de biocontrole na filosfera por períodos de vários dias entre as aplicações. Agentes de biocontrole que atuam por antibiose são comumente usados para aplicações em parte aérea, gerando a possibilidade do uso direto de misturas de metabólitos secundários bioativos em formulações para o controle de doenças. Neste estudo, foi avaliada a bioatividade de 04 extratos de *Penicillium* spp., em ensaios de inibição, usando diferentes doses, contra *Corynespora cassiicola* e *Colletotrichum truncatum*, patógenos foliares da soja, e *Alternaria linariae*, agente causal da pinta preta do tomate. Posteriormente, os melhores dois extratos foram formulados e avaliados em ensaios em casa de vegetação no controle da pinta preta e mancha-alvo, estes também foram caracterizados quimicamente dos extratos. Os extratos dos isolados UCBV 283 e 287a de *Penicillium brasilianum* inibiram o crescimento micelial dos três patógenos em ensaios *in vitro*, com valores de CE_{50} variando entre 3,3 e 7,7 $\mu\text{g/mL}$. Quando formulados, esses extratos reduziram significativamente a severidade da pinta preta do tomateiro, sem diferenças claras entre as doses usadas (2 vs 1 mg/mL). Embora a severidade final da mancha-alvo tenha sido baixa nos dois ensaios, evidências de controle da doença foram observadas nos tratamentos com os extratos de *P. brasilianum*. Nos extratos desses isolados foram identificados 12 metabólitos secundários, incluindo ácido penicílico, brasiliamidas, meroterpenoides e alcalóides. Os metabólitos detectados em maior abundância foram ácido penicílico, brasiliamida A e verruculogen. Esses resultados demonstram que os extratos orgânicos *Penicillium* são bons candidatos para o desenvolvimento de biofungicidas protetores de origem natural para o controle de doenças foliares.

Palavras-chave: Biofungicida, Metabólitos secundários, Mancha-alvo, Pinta preta.

1. INTRODUÇÃO

O controle biológico de doenças de plantas pode ser dividido, em linhas gerais, entre as doenças causadas por fungos habitantes do solo (como *Fusarium*, *Rhizoctonia* e *Macrophomina*) ou que possuem uma fase de sobrevivência sobre o solo (por exemplo, *Sclerotinia sclerotiorum*), e doenças da parte aéreas das plantas. No caso de patógenos do solo, o biocontrole é uma realidade no manejo de campo, realizado principalmente com produtos à base de espécies de fungos do gênero *Trichoderma* e bactérias do gênero *Bacillus*, correspondendo a uma tecnologia já estabelecida. Esses produtos são utilizados para tratamento de sementes, aplicação em sulcos de plantio ou em área total, com o objetivo principal de reduzir o inóculo na área (Michereff et al., 2005; Lobo Júnior et al., 2018).

A parte aérea das plantas se constitui em um ambiente distinto em comparação à rizosfera. O sucesso do biocontrole nesse ambiente depende da colonização e da persistência de altas populações de agentes de controle biológico na filosfera, já que esses agentes atuam como protetores sobre a superfície foliar para impedir o estabelecimento de infecções por patógenos. Nesse ambiente, os agentes de biocontrole devem suportar condições adversas, como a exposição à radiação solar (luz ultravioleta), o excesso de chuvas, as variações de temperatura e a baixa disponibilidade de nutrientes. Esses fatores limitam o uso e a eficiência dos agentes de controle biológico no controle de doenças da parte aérea das plantas (Vorholt, 2012; Moreira e May De Mio, 2015; Essiedu et al., 2020). Embora muitos agentes de controle biológico sejam capazes de colonizar de forma endofítica as plantas, o impacto dessa colonização no efeito de biocontrole ainda não está bem compreendido (Silva et al., 2019; Tewari et al., 2019).

Boa parte da pesquisa e a maioria dos produtos para o biocontrole de doenças de parte aérea é baseada no uso de estirpes de *Bacillus*, conhecidas pela produção de lipopeptídeos, metabólitos secundários de ação antifúngica, além de sobrevivência prolongada como endósporos, que confere aos produtos um bom tempo de prateleira, e um maior período residual nas folhas (Crane et al., 2013; Kgate et al., 2020). Mesmo aqui, a eficácia dos produtos biológicos à base de caldos de cultivo de *Bacillus* é variável, já que a adição de pulverizações com produtos biológicos de *Bacillus* nem sempre resultam em efeitos significativos de controle, mesmo quando consorciados ao uso de fungicidas sintéticos (Egel et al., 2019). Nesses casos, uma opção viável talvez seja a concentração dos metabólitos e uso

de extratos enriquecidos em metabólitos para um controle mais efetivo e consistente das doenças de parte aérea (Cortês et al., 2014; Silva Júnior et al., 2023).

O gênero *Penicillium* se encontra na família *Aspergillaceae*, ordem *Eurotiales*, classe *Eurotiomycetes* do Filo *Ascomycota*, e filogeneticamente forma um grupo irmão com os fungos do gênero *Aspergillus*. Com aproximadamente 500 espécies descritas, habitantes dos mais diversos locais e substratos do planeta, o gênero *Penicillium* é filogeneticamente dividido nos Subgêneros *Penicillium* e *Aspergilloides*, sendo o primeiro o mais investigado em relação à produção de metabólitos bioativos, e o grupo que contém os mais comuns contaminantes de alimentos e alguns produtores de toxinas (Houbraken et al., 2020). Espécies do Subgênero *Aspergilloides* são mais comumente recuperadas do solo, matéria orgânica vegetal, como endófitos e habitantes do ambiente marinho. Penicilina, compactina, ácido micofenólico, e griseofulvina são alguns exemplos de metabólitos de espécies de *Penicillium* com aplicação direta na medicina. Já a patulina, citrinina e ocratoxina são metabólitos produzidos por espécies contaminantes de alimentos e classificadas como micotoxinas. Milhares de outras moléculas, com bioatividades diversas, já foram isoladas de *Penicillium* spp., e análises genômicas apontam para uma grande diversidade de moléculas ainda não caracterizadas a partir destes fungos (Nielsen et al., 2017).

Alguns membros do *Penicillium* têm um histórico conhecido por sua capacidade de estimular o crescimento das plantas, promover a resistência a doenças em plantas, contribuir na biorremediação, aumentar a absorção de nutrientes, suprimir os patógenos através da atividade antifúngica (Waqas et al., 2015; Damasceno et al., 2019; Rashmi et al., 2019; Toghueo et al., 2020; Khalil et al., 2021; Rojas et al., 2022). Metabólitos secundários como ácido penicílico, griseofulvina, penochalasin K, penochalasin J, quetoglobosina A, quetoglobosina E, o alcalóide de isoquinolona, 5-hidroxi-8-metoxi-4-fenilisoquinolin-1(2H)-ona, 3-O-metilviridicatina, viridicatol e ácido 4-(2'R,4'-dihidroxibutoxi) benzóico produzidos por espécies de *Penicillium* possuem atividade antifúngica (Huang et al., 2016; Grijseels et al., 2017; Zhu et al., 2017; Toghueo e Boyom, 2020). Assim, considerando a grande diversidade química e as bioatividades associadas aos metabólitos produzidos por esses fungos, surge a hipótese de que extratos orgânicos enriquecidos com metabólitos bioativos de isolados de *Penicillium* spp., produzidos durante o cultivo em meio sólido, podem ser usados na composição de formulações de

biofungicidas de origem natural, com efeitos semelhantes aos fungicidas protetores para o controle de doenças da parte aérea, como a pinta preta do tomate e mancha-alvo de soja.

A pinta preta, uma doença foliar do tomateiro, é causada principalmente pelos patógenos necrotróficos *A. linariae* e *A. solani*, representando uma preocupação significativa devido às perdas de rendimento de até 50% quando não é adequadamente controlada (Abuley e Nielsen, 2017; Wolters et al., 2019; Romero et al., 2020). O patógeno sobrevive por alguns meses sobre restos culturais e seus conídios necessitam de umidade para germinar. A reprodução do patógeno é favorecida sob condições de alta umidade e temperaturas entre 24 e 28°C. O curto período de incubação e latência permite vários ciclos de infecção durante o desenvolvimento da cultura (Ganie et al., 2016; Romero et al., 2020). Os sintomas típicos da pinta preta manifestam-se em folhas, folíolos e pecíolos, sendo estas lesões necróticas circulares com anéis concêntricos de cor marrom, além de amarelecimento nas bordas. À medida que a doença progride, esta pode levar à desfolha das plantas (Chaerani e Voorrips, 2006; Grigolli et al., 2011; Runno-Paurson et al., 2015; Romero et al., 2020). O controle é feito principalmente mediante aplicação de fungicidas multisítios (Mancozebe e Clorotalonil) e fungicidas sítios específicos (Azoxistrobina, Fluazinam, Ciproconazol e Propiconazol), devido à facilidade de aplicação e efeito imediato no controle das epidemias (Leiminger e Hausladen, 2012; Runno-Paurson et al., 2015). Contudo, a dependência dos defensivos agrícolas e os relatos frequentes de perda de eficácia de fungicidas comerciais mostram a importância de outras medidas de controle (Abu-El Samen et al., 2016).

A mancha-alvo da soja, causada pelo fungo necrotrófico *C. cassiicola*, é considerada a doença mais prevalente entre aquelas incluídas no complexo de doenças do final de ciclo de cultivo. *C. cassiicola* afeta caules, folhas, vagens e sementes das plantas de soja durante os estágios intermediários e tardios do período reprodutivo, provocando senescência prematura, além de reduzir a produtividade e a qualidade das sementes (Lopez et al., 2018; Reznikov et al., 2019; Toulet et al., 2022). O patógeno pode crescer como saprófito ou endófito inespecífico em alguns hospedeiros (Cai et al., 2006; Promputtha et al., 2007; Dixon et al., 2009; Déon et al., 2012). Os sintomas típicos da mancha-alvo em folhas de soja incluem um bronzeado arroxeadado no início, seguido por lesões necróticas geralmente circulares, que podem apresentar anéis claros e escuros alternados com um halo verde-amarelado. Essas lesões se desenvolvem inicialmente na folhagem superior e, posteriormente, progridem para

as folhas inferiores, caules e pecíolos. As folhas gravemente afetadas caem prematuramente. As sementes de soja infectadas podem exibir áreas irregulares de descoloração roxa a rosa, que variam em tamanho desde pequenas manchas até cobrir a semente inteira (Reznikov et al., 2019; Molina et al., 2022). A ocorrência da doença é mais comum em regiões com alta umidade relativa (>80%) e temperaturas entre 20 e 30°C durante o desenvolvimento das plantas. O patógeno sobrevive em restos de soja infectados e em uma ampla variedade de tecidos vegetais na superfície do solo e nas sementes. O manejo da mancha-alvo é realizado principalmente através do uso de cultivares resistentes e da aplicação de fungicidas. A aplicação de fungicidas visa prevenir a desfolha especialmente antes do estágio reprodutivo R6 (Ma et al., 2020; Molina et al., 2022). No entanto, devido à excessiva dependência de fungicidas, a perda de eficácia no controle da doença já foi relatada (Godoy et al., 2012). Diante desse cenário, é necessário buscar alternativas de controle.

Dado o potencial dos metabólitos de *Penicillium* spp. na inibição do crescimento micelial de *Alternaria grandis*, *Corynespora cassiicola* e *Colletotrichum truncatum*, determinado em ensaios *in vitro* no Capítulo 1 desta Tese, este estudo teve como objetivo avaliar a bioatividade de quatro extratos de *Penicillium* spp., selecionados na triagem do capítulo 1, mediante ensaios comparativos de inibição utilizando diferentes doses contra três patógenos, para estimar a concentração correspondente à metade do efeito máximo (CE₅₀) na inibição do crescimento. Posteriormente, os dois extratos que apresentaram os melhores resultados nos testes *in vitro* foram avaliados, diretamente ou formulados, e em ensaios para o controle da pinta preta do tomate e da mancha-alvo da soja, realizados em casa de vegetação. Além disso, foi realizada uma caracterização química preliminar e desreplicação dos metabólitos secundários produzidos pelos melhores isolados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Isolados dos fungos

Alternaria linariae As248 foi fornecido pelo Laboratório de Biologia de populações (Biopop) do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa (DFP-UFV) e foi isolado do campo de batata no município de Conselheiro Lafaiete, no estado de Minas Gerais-Brasil, em 2005. *Colletotrichum truncatum* UCBV 259 foi isolado de folhas da soja

com lesões características de antracnose coletadas de lavouras comerciais no município de Três Passos, no estado de Rio Grande do Sul-Brasil, em 2022. Enquanto o isolado UCBV 332 de *Corynespora cassiicola* foi cedido pela empresa Vale Ouro Biotec.

2.2. Isolados de *Penicillium* spp.

Os testes de inibição para estimar concentração correspondente à metade do efeito máximo (EC₅₀) foram feitos com extratos de quatro isolados *Penicillium* spp. (Tabela 01), previamente selecionados por sua capacidade de inibição micelial dos fungos fitopatogênicos *A. grandis*, *C. truncatum* e *C. cassiicola* (Capítulo 1). Os isolados se encontram preservados na coleção de microrganismos da unidade de controle biológico de Viçosa (UCBV), do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa DFV-Brasil. Os fungos fitopatogênicos foram reativados em meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) no laboratório da Unidade de Controle Biológico do Departamento de Fitopatologia da UFV.

Tabela 01. Isolados de *Penicillium* spp. avaliados para estimar a concentração correspondente à metade do efeito máximo contra os isolados As248 de *A. linariae*, UCBV 259 de *C. truncatum* e UCBV 332 de *C. cassiicola*.

Código UCBV	Outro código	Espécie	Substrato	Localidade
UCBV 283	CML2691	<i>P. brasilianum</i>	<i>Melia azedarach</i> , endófito	São Carlos, SP
UCBV 287a		<i>P. brasilianum</i>	Contaminante	Viçosa, MG
UCBV 304	CML3011	<i>Penicillium</i> sp.2	Solo, Mata Atlântica	Parque Estadual Carlos Botelho, São Miguel Arcanjo, SP
UCBV 323	P01	<i>P. citrinum</i>	Escleródio de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Viçosa, MG

2.3. Extração de metabólitos

Os isolados de *Penicillium* spp. foram cultivados em extrato de malte ágar durante cinco dias no escuro a 25 °C. Em uma câmara de fluxo laminar, três discos de meio de cultivo contendo micélio e conídios foram transferidos para um tubo de Eppendorf de 1,5 mL, contendo 1 mL de água destilada estéril com Tween 80 (0,05%). O conteúdo do tubo (1 mL de suspensão de conídios) foi transferido para béquer de plástico de 2 L contendo 100 g de

arroz parboilizado autoclavado (60 mL de água destilada estéril/100g de arroz); o béquer foi coberto com plástico e acondicionado em temperatura ambiente, em torno de 25 °C, por sete dias. Depois, o plástico foi trocado por papel de filtro e o arroz colonizado deixado por mais três dias em temperatura ambiente para secagem.

A extração dos metabólitos foi etanólica a partir de 100 g de arroz. A cada béquer com arroz colonizado com o fungo foram adicionados 60 mL de etanol (99,5%), seguido de agitação por 1 hora, a 180 rpm e 25 °C. O material foi filtrado em tecido voil e transferido para tubos Falcon de 50 ml para centrifugação a 3000 rpm/5 minutos - velocidade 7 (Centrífuga Excelsa II, modelo 206 BL); o sobrenadante foi transferido para um erlenmeyer. O processo de extração foi repetido e os sobrenadantes combinados. Os extratos foram concentrados em um evaporador rotativo a 40 °C. O material concentrado foi liofilizado.

Os extratos liofilizados foram submetidos a uma nova extração com uma mistura de MeOH:AcOEt (2:1) e ácido fórmico 1% em um banho ultrassônico por 30 min, seguido de centrifugação a 10.000 rpm, durante 10 min (Centrífuga 5424 eppendorf, modelo 205N). O solvente foi evaporado como descrito acima.

2.4. Estimativa da concentração correspondente à metade do efeito máximo (CE₅₀)

Este experimento foi realizado com o objetivo de estimar a concentração de extrato orgânico necessária para induzir à redução do crescimento micelial de três fitopatógenos em 50% (CE₅₀). Os extratos dos quatro isolados de *Penicillium* foram inicialmente testados e comparados contra *C. truncatum*, em ensaios de inibição do crescimento micelial em placas de Petri. Posteriormente, os extratos de *P. brasilianum* UCBV 283 e UCBV 287a foram testados com *A. linariae* e *C. cassicola*. Esses últimos testes foram realizados tanto em placas de Petri, para avaliar a inibição do crescimento micelial, quanto em microplacas de ELISA, para avaliar o efeito na germinação de conídios e no crescimento micelial.

Para os ensaios de inibição do crescimento micelial em placas de Petri, os extratos obtidos foram dissolvidos em metanol a uma concentração de 320 mg/mL para obtenção da solução estoque inicial. Em seguida, foram feitas diluições dos extratos em meio BDA com cloranfenicol (0,01%) para obter as concentrações finais de 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,063, 0,031 e 0 mg/mL. Os tratamentos foram aplicados em três placas de Petri de 60 mm de

diâmetro cada. O inóculo dos fungos fitopatogênicos foi produzido pelo cultivo destes em BDA por 5 dias a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas, na incubadora tipo B.O.D. No centro de cada placa, foi colocado um disco de meio de cultivo contendo micélio dos fungos fitopatogênicos. As placas foram mantidas na câmara de incubação a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas, por sete dias. A inoculação dos patógeno no meio BDA puro foi usada como controle. Os diâmetros das colônias foram avaliados com auxílio de um paquímetro digital.

Para os ensaios de sensibilidade em microplacas de ELISA, o inóculo de *A. linariae* foi produzido em meio BDA, incubado por 7 dias a 25 °C com 12 horas de luz em uma incubadora do tipo B.O.D. Após esse período, o micélio foi raspado das placas utilizando uma alça Drigalski. Em seguida, as placas foram colocadas em uma câmara escura à temperatura ambiente no laboratório por 2 dias. Os conídios foram coletados e suspensos em meio Czapek-Dox + tween 80 (0,05%) e sendo a concentração ajustada para de 1×10^4 conídios/mL. A produção de conídios de *C. cassicola* foi realizada em meio ágar com extrato de folhas de soja, adaptado de Zhao et al. (2022) e Fischer et al. (2022). As placas com o inóculo foram incubadas a 28 °C, com um fotoperíodo de 12 horas. Após de 13 dias, os conídios foram coletados e suspensos em meio Czapek-Dox + tween 80 (0,05%), ajustando a suspensão para uma concentração de 6×10^4 conídios/mL.

A partir de soluções estoque dos extratos em metanol (320 mg/mL), foram feitas diluições em meio líquido Czapek-Dox para se obter concentrações finais de 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,063, 0,031 e 0 mg/mL. Os poços nas placas de microtitulação receberam 50 µL dos extratos mais 50 µL da suspensão de conídios de *A. linariae* ou *C. cassicola* em meio líquido Czapek-Dox, totalizando 100 µL por poço. As placas foram incubadas a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas. O desenvolvimento dos fungos foi avaliado medindo-se a absorbância de cada poço a 630 nm, após 144 horas, usando um espectrofotômetro de microplacas (Loccus-LMR-96-8). O meio líquido Czapek Dox, sem adição de extratos, foi usado como controle.

A sensibilidade de *C. cassicola*, *A. linariae* e *C. truncatum* aos extratos orgânicos foi avaliada estimando-se a concentração efetiva capaz inibir 50% do crescimento do patógeno (CE_{50}) para cada extrato com os dados de diâmetro da colônia e de absorbância. Os dados dose-resposta foram ajustados a um modelo log-logístico de quatro parâmetros (LL2.4), selecionado com base no menor valor do Critério de Informação de Akaike (AIC), utilizando

a função `mselect()`. As estimativas de CE_{50} foram obtidas utilizando a função 'ED()' do pacote de software `drc` do R (Ritz et al., 2015).

2.5. Controle de pinta preta do tomate (Micro-tom) em casa de vegetação

Os experimentos, realizados na casa de vegetação da Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão (UEPE) - Viveiro do Café/UFV, foram montados com o objetivo de avaliar o efeito dos extratos UCBV 283 e UCBV 287 de *P. brasiliense* no controle da pinta preta em plantas de tomate cultivar Micro-Tom. Dois ensaios foram conduzidos em paralelo entre outubro e novembro de 2023, com os tratamentos descritos na Tabela 2. Os tratamentos foram distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento. As sementes de Micro-Tom foram pré-germinadas em bandejas e, após 20 dias, transferidas para vasos de 1 L contendo substrato (solo e esterco bovino na proporção 3:1).

Foram realizadas duas aplicações dos extratos, a primeira aplicação foi preventiva 30 dias após o transplante das mudas de tomate nos vasos e a segunda 10 dias após a primeira aplicação dos extratos. O inóculo de *A. linariae* As248P foi produzido como descrito no item 2.4 e usado na concentração de 1×10^4 conídios/mL em água destilada + tween 80 (0,05%). As plantas de tomate foram inoculadas com 48h após da primeira aplicação dos extratos. As plantas foram mantidas em câmara úmida, próxima à saturação, por 48 horas na própria casa de vegetação, utilizando-se umidificadores de ar portáteis. A severidade da pinta preta nas plantas de tomate foi avaliada três dias após a inoculação do patógeno e posteriormente a cada três dias, até 12 dias após a inoculação (D.A.I), utilizando uma escala diagramática (Boff et al. 1991) (Figura 1).

Tabela 02. Tratamentos usados no ensaio de controle da pinta preta com extratos concentrados de *Penicillium* spp., na casa de vegetação.

Tratamentos	Descrição
T0	Controle, água destilada + tween 80 (0.05%)
T1	UCBV 283 doses 2 mg/mL
T2	UCBV 283 doses 5 mg/mL
T3	UCBV 287a doses 2 mg/mL
T4	UCBV 287a doses 5 mg/mL

Um segundo experimento foi realizado entre novembro e dezembro de 2023, com o objetivo de avaliar o efeito dos extratos UCBV 283 e UCBV 287 formulados no controle de pinta preta com plantas de tomate cultivar Micro-tom. Os extratos foram formulados utilizando os componentes e as concentrações estabelecidas por Leite (2023), resultando em um volume de 10 mL de produto formulado. Também foi incluído um tratamento com o produto formulado contendo metabólitos secundários do isolado de *Clonostachys chloroleuca* UCBV 07, utilizado por Leite (2023). Os tratamentos avaliados descritos na Tabela 3 e foram distribuídos no delineamento experimental inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento. A metodologia de condução das plantas, aplicação dos extratos e inoculação do patógeno foi a mesma do primeiro experimento. As avaliações da severidade da pinta preta do tomateiro em plantas Micro-Tom foram iniciadas três dias após a inoculação do patógeno e continuaram em intervalos de quatro dias, utilizando-se uma escala diagramática (Boff et al., 1991), até 19 dias após a inoculação (Figura 1).

Com os valores da severidade final foram obtidos a homocedasticidade e distribuição normal dos resíduos. Os dados foram modelados utilizando um modelo linear em que os tratamentos foram utilizados como variáveis independentes. O teste de Tukey através da função `cld()` do *pacote multcomp* R (Hothorn et al., 2008) foi usado para as comparações das médias. As análises foram realizadas para cada ensaio separadamente. A eficácia do controle foi calculada usando os valores finais da severidade de cada tratamento. A eficácia do controle (C, percentual de controle da severidade da doença em comparação ao tratamento controle) foi calculada usando a Equação (1), onde X_{treat} e X_{control} fornece a severidade média dos tratamentos (UCBV 283, UCBV 287a, UCBV 07 e fungicida) e controle (não tratado), respectivamente (da Silva et al., 2021):

$$C = \{1 - \exp[\ln(X_{\text{treat}}) - \ln(X_{\text{control}})]\} * 100 \quad (1)$$

Tabela 03. Tratamentos usados no ensaio de controle da pinta preta com extratos concentrados formulados de *Penicillium* spp. na casa de vegetação.

Tratamentos	Descrição
T0	Controle, Água destilada + tween 80 (0.05%)
T1	UCBV 283 doses 2 mg/ml
T2	UCBV 283 doses 1 mg/mL
T3	UCBV 287a doses 2 mg/mL
T4	UCBV 287a doses 1 mg/mL
T5	UCBV 07 (<i>Clonostachys chloroleuca</i>) doses 7,5 mg/mL
T6	Clorotalonil (Daconil-BR®, IHARA) doses 2 mg/mL

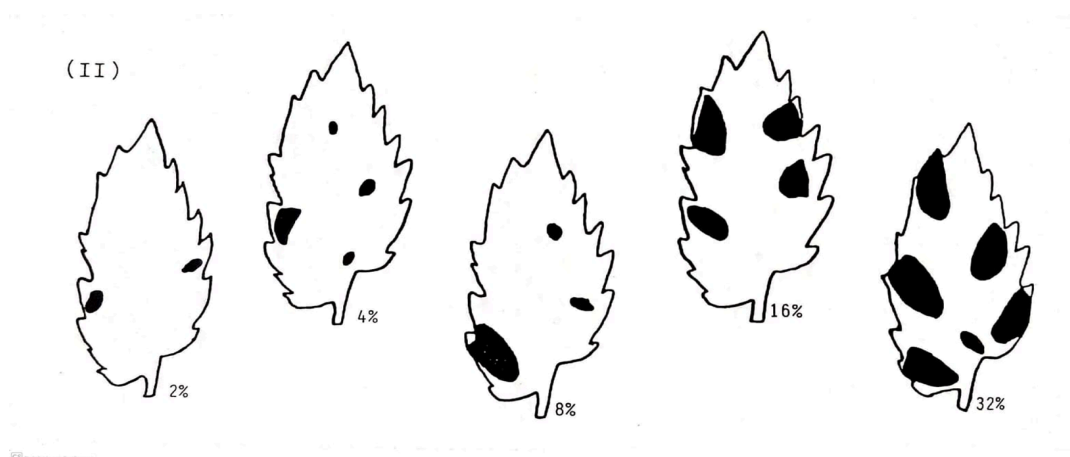


Figura 1. Escalas para avaliação de severidade da pinta preta (*Alternaria solani*) em tomateiro (Boff et al. 1991).

2.6. Controle da mancha-alvo da soja na casa de vegetação

Com o objetivo de avaliar o efeito dos extratos UCBV 283 E UCBV 287a no controle da mancha-alvo da soja foram montados dois ensaios e conduzidos paralelamente no período de novembro-dezembro de 2023, com plantas de soja cultivar 7363. Os ensaios foram feitos na casa de vegetação da Unidade de Ensino Pesquisa e Extensão (UEPE) - Viveiro do Café/UFV. Os tratamentos, detalhados na Tabela 4, foram distribuídos em um delineamento

experimental inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento. As sementes de soja foram semeadas em vasos de 2 litros contendo substrato (solo e esterco bovino na proporção 3:1).

Os extratos foram formulados utilizando os componentes e as concentrações estabelecidas por Leite (2023), resultando em um volume final concentrado de 10 mL. Os tratamentos foram aplicados por meio de pulverização das plantas da soja no estágio V3 (24 dias após a semeadura).

Tabela 04. Tratamentos usados no ensaio de controle da mancha-alvo de soja com extratos concentrados e formulados de *Penicillium* spp. na casa de vegetação.

Tratamentos	Descrição
T0	Controle, Água destilada + tween 80 (0.05%)
T1	UCBV 283 doses 1 mg/mL
T2	UCBV 283 doses 0,5 mg/mL
T3	UCBV 287a doses 1 mg/mL
T4	UCBV 287a doses 0,5 mg/mL
T5	UCBV 07 (<i>Clonostachys chloroleuca</i>) dose de 5 mg/mL
T6	Fungicida (Mancozebe) dose de 2 mg/mL

A produção de inóculo do isolado UCBV 332 de *C. cassicola* foi realizada como descrito no item 2.4. A concentração da suspensão de conídios foi ajustada para $1,0 \times 10^5$ conídios/mL em água contendo 0,05% de Tween 80. A inoculação do patógeno foi feita por meio de pulverização. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida até o final do experimento, com o auxílio de umidificadores de ar.

A avaliação da severidade foi iniciada 5 D.A.I. e continuada com intervalos de 4 dias até 21 D.A.I., usando a escala diagramática desenvolvida por Soares et al. (2009) (Figura 2). Com os dados de severidade final da mancha-alvo foram feitas as análises estatísticas. A homogeneidade das variâncias foi testada pelo teste de Levene e a distribuição normal de resíduos foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. A ANOVA foi feita por meio da função aov() e as médias da severidade final obtidas para cada tratamento foram comparadas pelo teste de Tukey no nível $p < 0,05$ por meio da função cld() com auxílio dos pacotes multcomp e “R

emmeans” (Lenth et al., 2022) no R versão 4.3.2 (R Core Team, 2023). A eficácia do controle foi calculada usando a equação (1) com os valores finais da severidade de cada tratamento, como descrito no item 2.5.

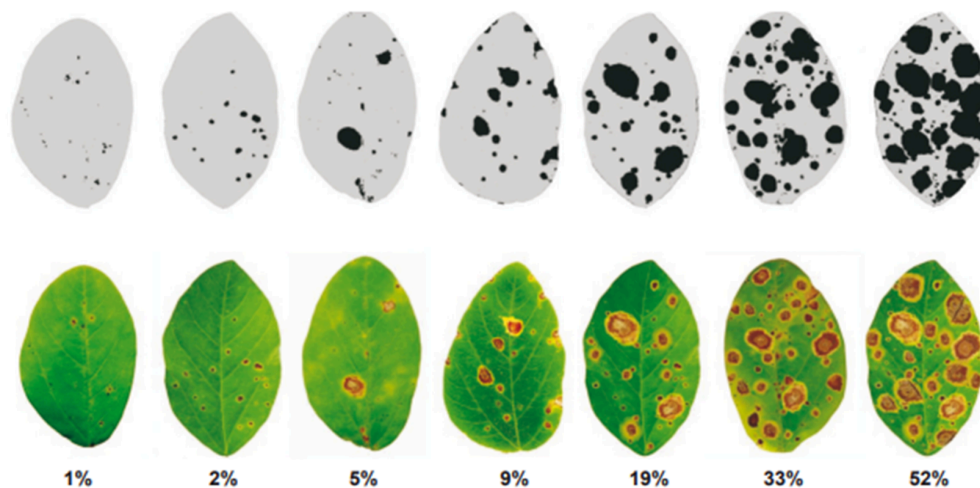


Figura 2. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha alvo da soja (Soares et al., 2009).

2.7. Análise de metabólitos

Os extratos orgânicos dos isolados UCBV 283 e 287a foram obtidos e analisados por LC-MS de acordo com os procedimentos descritos no item 2.6 do capítulo 1 desta tese. Os cromatogramas, gerados em duplicatas, foram processados no programa DataAnalysis 4.2 (Bruker Daltonics) utilizando a função AutoMS, que detecta automaticamente as substâncias com base na identificação dos íons precursores detectados em MS1 (i.e. moléculas mono $[M+H]^+$ e diprotonadas $[M+2H]^+$, bem como adutos de sódio $[M+Na]^+$ e moléculas desidratadas e protonadas $[M-H_2O+H]^+$) e seus respectivos produtos de fragmentação obtidos em MS2. A lista de moléculas identificadas foi restrita aos 100 picos mais intensos identificados entre 2 e 12 minutos de análise. Os resultados obtidos foram exportados para uma planilha e os dados de $[M+H]^+$ foram usados para buscas em um banco de dados de 2550 metabólitos de *Penicillium*, depositados no portal Natural Product Atlas 2.0 (van Santen et al., 2022). As substâncias anotadas foram comparadas com aquelas já descritas em *Penicillium brasilianum* (Bazioli et al., 2017) e, quando possível, o perfil de fragmentação obtido em MS2 também foi comparado com a literatura (e.g. Fill et al., 2010).

3. RESULTADOS

3.1. Teste de sensibilidade para estimar CE_{50}

Os resultados dos testes com os extratos UCBV 283 e UCBV 287a de *P. brasilianum*, UCBV 323 de *P. citrinum* e UCBV 304 de *Penicillium* sp.2 contra *C. truncatum*, realizados em placas de Petri (Figura 3), mostraram valores de CE_{50} entre 4,17 e 7,71 $\mu\text{g/mL}$. Os menores valores absolutos de CE_{50} foram obtidos com os extratos dos isolados UCBV 283 e UCBV 287a de *P. brasilianum*. Já os resultados dos testes com os extratos UCBV 283 e UCBV 287 de *P. brasilianum* contra *A. linariae* e *C. cassicola*, realizados tanto em placas de Petri quanto em microplacas de ELISA (Figura 4), mostraram que os valores de CE_{50} dos dois extratos foram semelhantes aos observados para *C. truncatum*. Nos ensaios de sensibilidade em placas de Petri, os valores estimados de CE_{50} foram consistentemente menores, atingindo 3,3 $\mu\text{g/mL}$ no teste contra *A. linariae*. Estes resultados mostram o efeito fungicida, em baixas doses, dos extratos UCBV 283 e 287a de *P. brasilianum* contra os três patógenos.

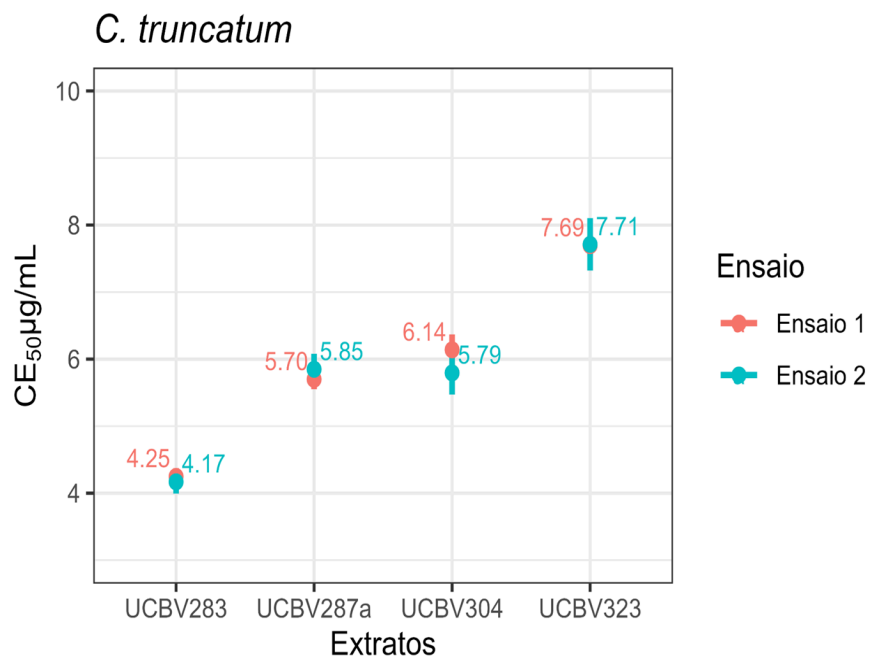


Figura 3. Resultados dos ensaios de sensibilidade mostrando os valores da estimativa da metade da dose efetiva máxima (CE_{50}) capaz de inibir o crescimento micelial de *C. truncatum* pelos 4 extratos orgânicos de *Penicillium* spp. em placas de Petri. As barras representam o intervalo de confiança.

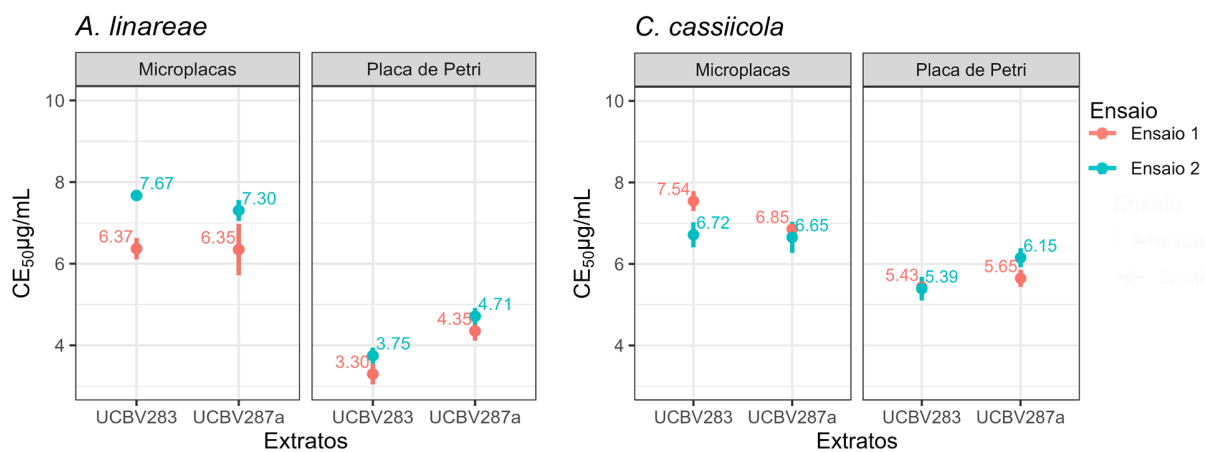


Figura 4. Resultados dos ensaios de sensibilidade mostrando os valores da estimativa da metade da dose efetiva máxima (EC_{50}) dos extratos orgânicos UCBV 283 e UCBV 287a de *P. brasilianum* na inibição do crescimento micelial de *A. linariae* e *C. cassiicola*, tanto em placas de Petri quanto em microplacas de ELISA. As barras representam o intervalo de confiança.

3.2. Controle de pinta preta do tomate (Micro-tom) em condições da casa de vegetação

Nos ensaios para o controle da pinta preta, a severidade nas plantas tratadas com os extratos UCBV 283 e UCBV 287a aplicados sem formular variou significativamente entre as doses ($p < 0,05$). O tratamento preventivo de plantas de tomate (Micro-tom) com o extrato UCBV 283, na dose de 5 mg/mL, no primeiro ensaio, resultou em uma redução significativa da severidade final da doença (19,44%). Por outro lado, os valores de severidade da doença nas plantas tratadas com a dose de 2 mg/mL do extrato UCBV 283, e com duas doses do extrato UCBV 287a (2 e 5 mg/mL), não apresentaram diferenças significativas entre si (27,88%, 24,02% e 24,31%, respectivamente). Além disso, a severidade final da doença nas plantas tratadas com o extrato UCBV 283 na dose de 2 mg/mL não apresentou diferenças em relação ao controle (Figura 5 e Figura S1). No segundo ensaio, o menor valor de severidade final da doença foi alcançado com a aplicação do extrato UCBV 283 a 5 mg/mL (11,63%), mas sem diferenças significativas em relação às duas doses do extrato UCBV 287a (14,15% e 17,10%). No entanto, a severidade da doença no tratamento com o extrato UCBV 283 a 2 mg/mL (21%) não apresentou diferenças significativas em comparação com o controle.

O tratamento preventivo com o fungicida Clorotalonil resultou no controle total da doença, com valores médios de severidade variando entre 0,3% e 1,7% nas plantas avaliadas em ambos os ensaios (Figura 5). Em contraste, os valores médios de severidade final nas plantas controle (não tratadas) foram de 31,44% no primeiro ensaio e 24,60% no segundo ensaio. No experimento, o tratamento preventivo de plantas de tomate (Micro-Tom) com o extrato UCBV 283 a 5 mg/mL, sem formulação, reduziu a severidade da doença em 38,15% a 52,71% em relação ao controle (não tratadas).

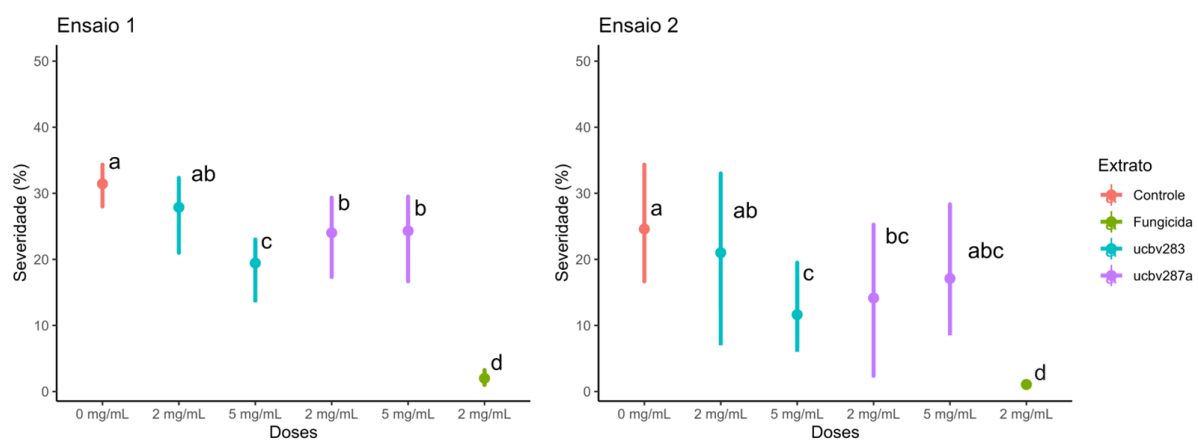


Figura 5. Severidade final da pinta preta do tomateiro cv. Micro-tom aos 12 dias após a exposição ao patógeno, em dois ensaios independentes. As barras representam o intervalo de confiança. Controle: Água; Fungicida: Clorotalonil; UCBV 283 e UCBV 287a: extratos sem formulação de *P. brasilianum*.

No ensaio com extratos formulados, as doses dos extratos UCBV 283 e UCBV 287a foram reduzidas para 2 mg/mL e 1 mg/mL. O extrato UCBV 07 (*Clonostachys chloroleuca*) também foi avaliado a 7,5 mg/mL (Leite, 2023). O tratamento preventivo de plantas de tomate (Micro-Tom) com os extratos orgânicos formulados UCBV 283 e UCBV 287a demonstrou um melhor efeito na redução da severidade final da pinta preta do tomate, como ilustrado na Figura 6, em comparação com a aplicação dos extratos não formulados. Embora os valores médios de severidade final tenham sido de 5,41% a 5,97% a uma dose de 2 mg/mL e de 8,02% a 8,50% a uma dose de 1 mg/mL para UCBV 283 e UCB V287a, respectivamente, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre eles. O

tratamento preventivo com o extrato UCBV 07 demonstrou eficácia na redução da severidade final da pinta preta, de maneira comparável às aplicações dos extratos UCBV 283 e UCBV 287a a uma dose de 1 mg/mL. Nesse tratamento, observou-se um valor médio de severidade de 11,50% nas plantas avaliadas. O tratamento preventivo com o fungicida Clorotalonil resultou em controle total da doença, atingindo um valor médio de severidade de 0,33% nas plantas avaliadas (Figura 7 e Figura S2). Em contraste, as plantas controle (não tratadas) apresentaram um valor médio de severidade final de 25,46%. Neste experimento, o tratamento preventivo das plantas de tomate cultivar Micro-Tom com a dose de 2 mg/mL dos extratos UCBV 283 e UCBV 287a formulados resultou em uma redução na severidade de 78,75% e 77%, respectivamente, em comparação com o controle (não tratado).

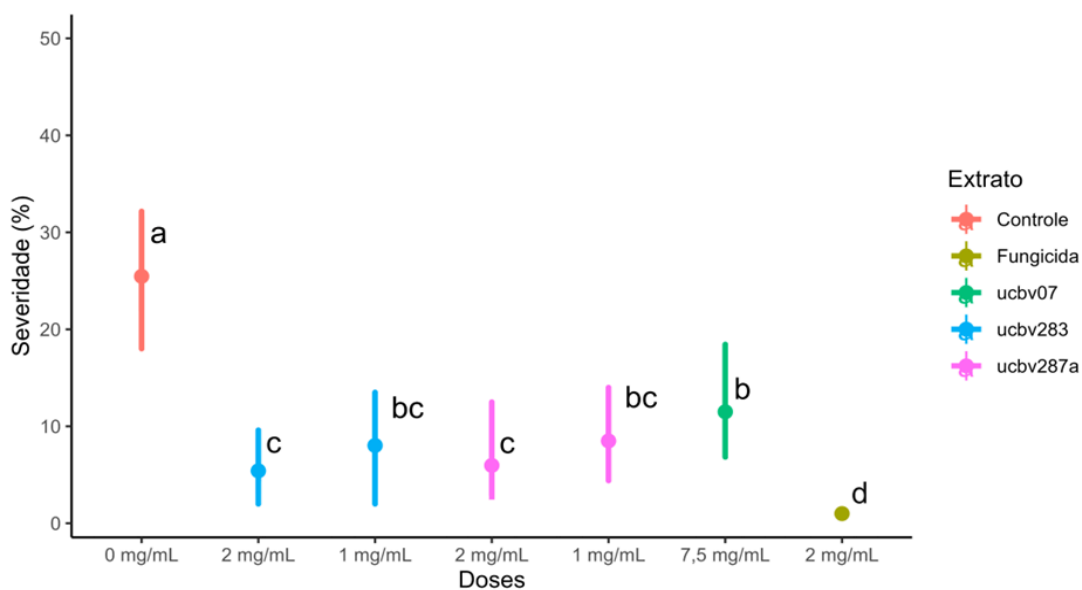


Figura 6. Severidade final da pinta preta do tomateiro cv. Micro-tom aos 19 dias após a exposição ao patógeno. As barras representam o intervalo de confiança. Controle: Água; Fungicida: Clorotalonil; UCBV 07: extrato formulado de *C. chloroleuca*; UCBV 283 e UCBV 287a: extratos formulados de *P. brasilianum*.



Figura 7. Imagem das plantas de tomate cv. Micro-tom no final do ensaio de controle de pinta preta com extratos orgânicos em casa de vegetação. Controle: Água; Fungicida: Clorotalonil; UCBV 07: extrato formulado de *C. chloroleuca*; UCBV 283 e UCBV 287a: extratos formulados de *P. brasilianum*.

3.3. Controle da mancha-alvo de soja em condições da casa de vegetação

Nos ensaios para o controle da mancha-alvo, a severidade final nas plantas tratadas com os extratos orgânicos UCBV 283 e UCBV 287a formulados não apresentou variação significativa entre as duas execuções do ensaio ($p > 0,05$). No primeiro ensaio, o tratamento preventivo das plantas de soja com o extrato UCBV 283 a 0,5 mg/mL resultou em uma redução significativa da severidade final da doença (4,70%), semelhante aos resultados obtidos com os extratos UCBV 283 e UCBV 287a a 1 mg/mL (5,52% e 6,85%, respectivamente). Entretanto, a severidade da mancha-alvo nas plantas de soja tratadas com o extrato UCBV 287a a 0,5 mg/mL (8,05%) variou significativamente apenas em relação ao extrato UCBV 283 a 0,5 mg/mL (Figura 8). No segundo ensaio, observou-se que o menor valor de severidade da mancha-alvo nas plantas de soja foi alcançado com a aplicação do extrato UCBV 287a a 1 mg/mL (4,87%). Não houve diferenças significativas com a dose de 0,5 mg/mL (6,66%) nem com as duas doses do extrato UCBV 283 (6,55% e 7,59%). O tratamento preventivo com o extrato UCBV 07 teve um efeito na redução da severidade final da mancha-alvo semelhante ao observado com a aplicação de ambas as doses dos extratos de *P. brasilianum* em ambos os ensaios.

O tratamento preventivo das plantas de soja com o fungicida Mancozebe resultou em controle total da doença, com valores médios de severidade final entre 0,48% e 0,29% em ambos os ensaios (Figura 8). No primeiro ensaio, o tratamento com o extrato UCBV 283 a 0,5 mg/mL apresentou uma eficácia de controle de 63%. No segundo ensaio, os melhores valores

de eficácia de controle foram observados com os extratos UCBV 287a a 1 mg/mL (57%) e com o extrato UCBV 07 de *C. chloroleuca* (66%). Em ambos os ensaios, a eficácia de controle do fungicida Mancozebe foi superior a 96%.

Nas condições do experimento, mesmo mantendo as plantas em câmara úmida, o progresso da doença foi reduzido, e a severidade final aos 21 dias foi baixa, com o tratamento controle apresentando médias de 12,84% e 11,42% nos ensaios 1 e 2, respectivamente, sem expansão significativa das lesões. Apesar disso, observou-se uma redução significativa na severidade final média nos tratamentos com os extratos testados (Figura 9 e Figura S3).

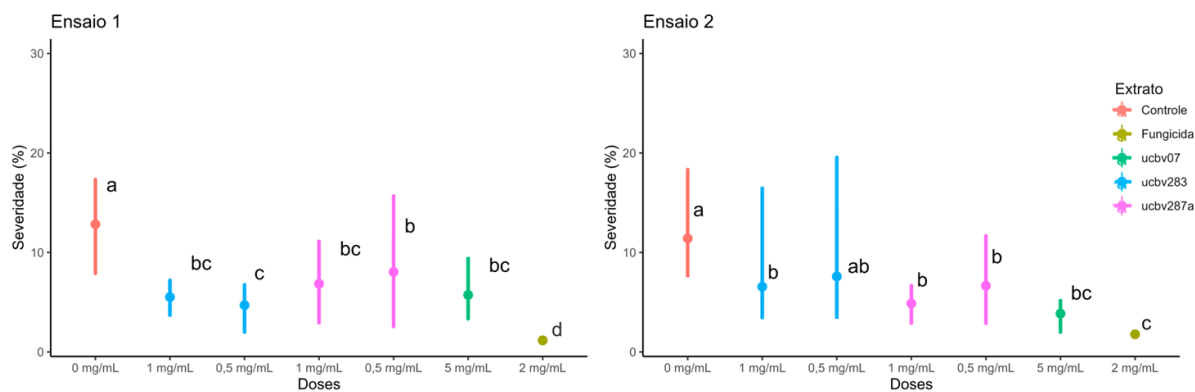


Figura 8. Severidade final da mancha-alvo da soja aos 21 dias após a inoculação do patógeno. As barras representam o intervalo de confiança. Controle: Água; Fungicida: Clorotalonil; UCBV 07: extrato formulado de *C. chloroleuca*; UCBV 283 e UCBV 287a: extratos formulados de *P. brasilianum*.

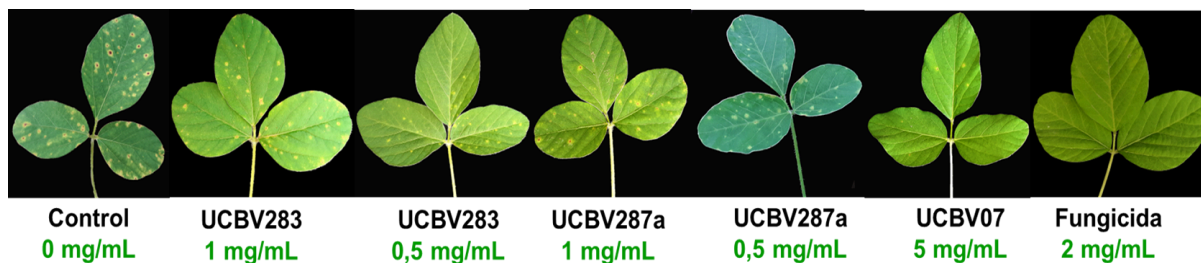


Figura 9. Imagem das folhas de soja no final do ensaio de controle da mancha-alvo com extratos orgânicos em casa de vegetação. Controle: Água; Fungicida: Clorotalonil; UCBV 07: extrato formulado de *C. chloroleuca*; UCBV 283 e UCBV 287a: extratos formulados de *P. brasilianum*.

3.4. Análise química dos extratos

A investigação dos cromatogramas de LC-MS dos isolados UCBV 283 e 287a com os dados das massas protonadas $[M+H]^+$ das substâncias detectadas permitiu a anotação de 12 metabólitos secundários, 11 deles já descritos para *Penicillium brasilianum* (Bazioli et al., 2017). Um pico muito intenso, nos dois cromatogramas, no tempo de retenção (RT) de 2.3 min., foi identificado como correspondente ao ácido penicílico ($[M+H]^+ = 171.06$). Quatro picos foram anotados como bifenilpropanóides do grupo das brasiliamidas: E (RT = 4.6 min., $[M+H]^+ = 383.19$), A (RT = 7.4 min., $[M+H]^+ = 439.17$), B e C (RT = 7.3 e 7.6 min., $[M+H]^+ = 423.18$) (Figura 10).

Cinco substâncias detectadas entre 7.8 e 8.3 min. foram anotadas como meroterpenóides do grupo biossintético da austina, especificamente: acetoxidehidroaustina (RT = 7.8 min, $[M+H]^+ = 557.19$), dehidroaustina (RT = 7.8 min, $[M+H]^+ = 499.19$), penicianstinoide C (RT = 7.9 min, $[M+H]^+ = 443.20$), Brazilianoid L (RT = 8.1 min, $[M+H]^+ = 427.20$) e austineol (RT = 8.3 min, $[M+H]^+ = 415.20$). Destas, somente penicianstinoide C ainda não teve sua produção por *P. brasilianum* confirmada, tendo sido descrita a partir de um isolado não identificado de *Penicillium* (Bai et al., 2021). Dois alcaloides do grupo das fumitremorginas, 24/26-hidroxiverruculogen e verruculogen, foram detectados aos 7.5 e 8.5 min (Figura 10).

Na comparação visual entre os cromatogramas, exibidos na mesma escala, pode se verificar que o extrato do isolado UCBV 283 parece ser mais concentrado em metabólitos secundários do que o extrato de UCBV 287a. Este resultado se correlaciona à maior bioatividade do primeiro extrato em todos os ensaios de inibição do crescimento de patógenos, embora as massas dos extratos não tenham sido padronizadas antes das análises por LC-MS. Em uma análise semiquantitativa, os três metabólitos detectados em maior abundância nos cromatogramas de ambos isolados foram ácido penicílico, brasiliamida A e verruculogen (Figura 10).

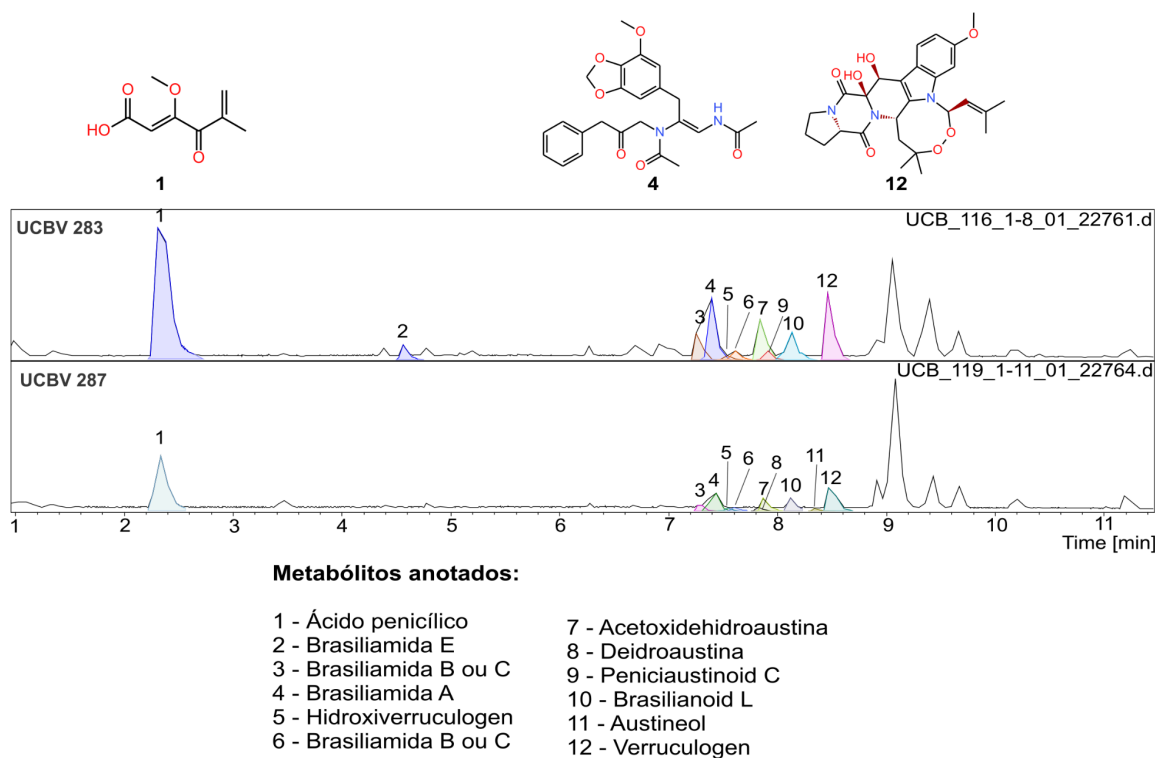


Figura 10. Cromatogramas gerados pela análise de LC-MS dos extratos orgânicos dos isolados de *P. brasilianum* UCBV 283 e 287 cultivados em arroz. Os picos correspondentes aos metabólitos conhecidos que foram anotados estão coloridos e numerados de acordo com a identificação atribuída.

4. DISCUSSÃO

Neste capítulo, a bioatividade dos extratos UCBV 283 e UCBV 287a de *P. brasilianum*, UCBV 323 de *P. citrinum* e UCBV 304 de *Penicillium* sp.2, aplicados em diferentes doses, foi comparada em ensaios de inibição do crescimento micelial contra *C. truncatum*, em placas de Petri. Posteriormente, os extratos UCBV 283 e UCBV 287a de *P. brasilianum* foram testados contra *A. linariae* e *C. cassicola*, em ensaios realizados tanto em placas de Petri para avaliar a inibição do crescimento micelial, quanto em microplacas de ELISA, para avaliar o efeito em tanto na germinação de conídios quanto no crescimento micelial. Ambos os testes foram realizados com o objetivo de estimar a metade da dose efetiva máxima (EC₅₀) para inibir o crescimento micelial pelos extratos, como uma forma de se ter uma ideia da potência fungicida dos extratos, já que estes haviam sido testados apenas

em uma alta dose (10 mg/mL) durante a triagem conduzida no Capítulo 1 desta Tese. Posteriormente, os extratos UCBV 283 e UCBV 287a de *P. brasilianum* que apresentaram os melhores resultados nos testes *in vitro*, foram formulados e avaliados em ensaios de controle da pinta preta do tomate e da mancha-alvo da soja em casa de vegetação. Finalmente, foi feita a análise química dos dois extratos para fazer as anotações de substâncias detectadas nos cromatogramas de LC-MS.

Os resultados obtidos nos ensaios em placa de Petri indicam que os extratos de *P. brasilianum* UCBV 283 e UCBV 287a apresentaram os menores valores absolutos de EC_{50} , sugerindo que esses extratos foram os mais eficazes em inibir o crescimento de *C. truncatum* entre os testados, sendo estes valores baixos quando comparados, por exemplo, com a EC_{50} de extratos contendo lipopeptídeos de *Bacillus* (entre 45 e 75 $\mu\text{g/mL}$) (Silva Junior et al., 2023).

Os resultados dos ensaios de inibição em placas de Petri e em microplacas mostraram que os valores de EC_{50} dos extratos UCBV 283 e UCBV 287a de *P. brasilianum* contra *A. linariae* e *C. cassiicola* foram semelhantes aos observados na inibição de *C. truncatum*, e comparáveis com a EC_{50} de extratos de UCBV 07 de *C. chloroleuca* estimado por Leite (2023). A consistência dos resultados, tanto nos ensaios realizados em placas de Petri quanto nas microplacas, indica que os extratos mantiveram sua eficácia fungicida independentemente do método de avaliação utilizado e que tais métodos fornecem resultados coerentes. A amplitude do efeito fungicida dos extratos UCBV 283 e UCBV 287a de *P. brasilianum*, observado contra os três patógenos testados, indicam o potencial dos extratos de *P. brasilianum* como fungicidas de amplo espectro eficazes em baixas doses.

Nos ensaios de controle da pinta preta com extratos não formulados de UCBV 283 e UCBV 287a, a variação na eficácia do controle foi influenciada pelos extratos e doses. A aplicação do extrato orgânico UCBV 283 na concentração de 5 mg/mL apresentou eficácia de controle da pinta preta entre 38,15% (primeiro ensaio) e 52,71% (segundo ensaio). As duas doses do extrato UCBV 287a não apresentaram efeito marcante na redução da severidade. Apesar do efeito protetor do extrato UCBV 283 a 5 mg/mL, as aplicações de ambos os extratos nesta dose induziram a sintomas de fitotoxicidade nas plantas (dados não mostrados).

No segundo experimento, que consistiu em um único ensaio de controle da pinta preta com extratos orgânicos formulados, foram utilizados os mesmos componentes empregados

por Leite (2023) para formular o extrato UCBV 07 de *C. chloroleuca*, mas com concentrações menores de extrato (1 e 2 mg/mL). As doses avaliadas foram definidas a partir de ensaios preliminares de fitotoxicidade com os extratos orgânicos formulados (dados não mostrados). Observou-se um melhor efeito na redução da severidade final da pinta preta em tomate, em comparação com a aplicação dos extratos não formulados. Ambos os extratos de *P. brasilianum* apresentaram efeitos significativos na redução da severidade, sendo estes independentes das doses usadas. Os resultados sugerem que a formulação manteve a estabilidade dos metabólitos secundários dos extratos avaliados (Leite, 2023). No geral, a eficácia dos extratos no controle da pinta preta foi de 66,64% e 78,75% em relação ao tratamento controle (sem extrato). Esses resultados indicam o potencial dos extratos orgânicos formulados UCBV 283 e UCBV 287a para o controle da pinta preta. Contudo, é necessário confirmar esses achados em um segundo ensaio.

Os resultados dos experimentos de controle da mancha-alvo mostraram consistência no uso dos extratos orgânicos UCBV 283 e UCBV 287a, sem variação significativa entre as duas execuções, sugerindo que os resultados são reprodutíveis. Os valores baixos de severidade final (12,84% e 11,42%) nas plantas de soja não tratadas (controle) podem ser atribuídos a fatores ambientais não otimizados na casa de vegetação, baixa concentração de inóculo, ou até à possível baixa capacidade de virulência do isolado UCBV 332 de *C. cassiicola*. De acordo com Toulet et al. (2022), foi observada uma variedade de graus de virulência, que variaram de altamente virulentos a não virulentos, quando a cultivar de soja A 8000 RG foi desafiada com 24 isolados de *C. cassiicola* de diferentes regiões do noroeste da Argentina. Mesmo mantendo as plantas sob câmara úmida no presente estudo, o desenvolvimento da doença foi limitado; no entanto, ainda foi possível observar uma redução significativa na severidade final de mancha-alvo nas plantas de soja tratadas com os extratos de *P. brasilianum*.

No primeiro ensaio, o extrato UCBV 283 a 0,5 mg/mL foi significativamente mais eficaz na redução da severidade final da doença do que o UCBV 287a na mesma concentração. No segundo ensaio, destaca-se que a dose de 1 mg/mL do extrato UCBV 287a foi eficaz na redução da severidade da mancha-alvo, embora a diferença em relação à dose menor não seja significativa. A ausência de diferenças significativas entre as diferentes doses do UCBV 287a e as doses do UCBV 283 indica um possível limiar de efeito de dose. A

menor dose usada dos extratos, 0,5 mg/mL, é quase 80X a CE_{50} média calculada para ambos os extratos frente a *C. cassicola* nos ensaios *in vitro* e, talvez, doses ainda menores poderiam resultar no mesmo efeito de controle observado. Esses resultados são importantes para o desenvolvimento de produtos formulados com base nos extratos orgânicos produzidos por isolados de *P. brasilianum*, potencialmente reduzindo os custos de produção.

A análise dos cromatogramas desses isolados permitiu registrar 12 metabólitos secundários, dos quais 11 já foram descritos para *P. brasilianum* sendo apenas o penicianstinoide C ainda não descrito para *P. brasilianum*. Os três metabólitos detectados em maior abundância nos cromatogramas de ambos os isolados foram ácido penicílico, brasiliamida A e verruculogen. O papel dos diferentes componentes do extrato no efeito antifúngico e no controle das doenças não foi esclarecido apenas com a consulta à literatura (Bazioli et al., 2017; Tuthill et al., 2001) e necessitará de experimentos envolvendo o fracionamento dos extratos e purificação dos componentes majoritários, seguido de testes de bioatividade com compostos semi-purificados (Silva Júnior et al., 2023).

Embora o uso de extratos livres de células vivas não seja realmente um tipo de controle biológico, pois não envolve interações biológicas de agentes de controle biológico com fitopatógenos e plantas, este tipo de uso dos metabólitos pode ser enquadrado dentro do ‘guarda-chuva’ dos métodos de bioproteção de plantas (Stenberg et al., 2021), uma estratégia recentemente adotada principalmente por setores da indústria. Seguindo esta tendência, a legislação brasileira tem regulamentado, desde meados de 2023, o uso de produtos contendo apenas metabólitos na categoria de produtos biológicos com microrganismos inativados (Portaria conjunta SDA/MAPA - IBAMA - ANVISA, nº 1, de 10 de abril de 2023). Neste contexto, este trabalho é pioneiro em adiantar a estratégia de uso de extratos bioativos padronizados como biofungicidas protetores para o controle de doenças foliares, e a partir de membros da biodiversidade brasileira até então não considerados sob o ponto de vista da proteção de plantas contra doenças.

5. REFERÊNCIAS

Abu-El Samen, F., Goussous, S.J., Al-Shudifat, A., Makhadmeh, I. (2016). Reduced sensitivity of tomato early blight pathogen (*Alternaria solani*) isolates to protectant

fungicides, and implication on disease control. Archives of phytopathology and Plant Protection, 49 (5-6), 120-136.

Abu-El Samen, F., Goussous, S. J., Al-Shudifat, A., Makhadmeh, I. (2016). Reduced sensitivity of tomato early blight pathogen (*Alternaria solani*) isolates to protectant fungicides, and implication on disease control. Archives of phytopathology and Plant Protection, 49 (5-6), 120-136.

Abuley, I. K., & Nielsen, B. J. (2017). Evaluation of models to control potato early blight (*Alternaria solani*) in Denmark. Crop Protection, 102, 118–128.

Bai, M., Zheng, C. J., & Chen, G. Y. (2021). Austins-type meroterpenoids from a mangrove-derived *Penicillium* sp. Journal of Natural Products, 84(8), 2104-2110.

Bazioli, J. M., Amaral, L. D. S., Fill, T. P., Rodrigues-Filho, E. (2017). Insights into *Penicillium brasilianum* secondary metabolism and its biotechnological potential. Molecules, 22(6), 858.

Boff, P., Zambolim, L., Vale, F. X. R. (1991). Escalas para avaliação de severidade de mancha de estenfilio (*Stemphylium solani*) e da pinta preta (*Alternaria solani*) em tomateiro. Fitopatologia Brasileira, 16 (3), 280-283.

Cai, L., Ji, K.-F., Hyde, K. D. (2006). Variation between freshwater and terrestrial fungal communities on decaying bamboo culms. Antonie van Leeuwenhoek, 89, 293–301.

Chaerani, R., & Voorrips, R.E. (2006). Tomato early blight (*Alternaria solani*): The pathogen, genetics, and breeding for resistance. Journal of General Plant Pathology, 72, 335–347.

Crane, J. M., Gibson, D. M., Vaughan, R. H., Bergstrom, G. C. (2013). Iturin levels on wheat spikes linked to biological control of *Fusarium* head blight by *Bacillus amyloliquefaciens*. Phytopathology, 103, 146-155.

Côrtes, M. V., Silva-Lobo, V. L., Filippi, M. C., Lima, D., Prabhu, A. S. (2014). Potential for using crude extract of *Sarocladium oryzae* for suppression of rice blast. Tropical Plant Pathology, 39, 28-34.

da Silva, H.A.O., Teixeira, W.D., Borges, Á.V., Silva Junior, A.L., Alves, K.S., Rodrigues Junior, O.M., de Abreu, L.M. (2021). Biocontrol of potato early blight and suppression of *Alternaria grandis* sporulation by *Clonostachys* spp. *Plant pathology*, 70 (7), 1677–1685.

Damasceno, C. L., Oliveira de Sá, J., da Silva, R. M., do Carmo, C. O., Haddad, L. S. M., Soares, A.C. F., Duarte, E. A. A. (2019). *Penicillium citrinum* as a Potential Biocontrol Agent for Sisal Bole Rot Disease. *Journal of Agricultural Science*, 11(10).

Déon, M., Scomparin, A., Tixier, A., Tixier, A., Mattos, C. R. R., Leroy, T., Seguin, M., Roeckel-Drevet, P., Pujade-Renaud, V. (2012). First characterization of endophytic *Corynespora cassiicola* isolates with variant cassiicolin genes recovered from rubber trees in Brazil. *Fungal Diversity*, 54, 87–99.

Dixon, L. J., Schlub, R. L., Pernezny, K., Datnoff, L. E. (2009). Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*. *Phytopathology*, 99, 1015–1027.

Egel, D. S., Hoagland, L., Davis, J., Marchino, C., Bloomquist, M. (2019). Efficacy of organic disease control products on common foliar diseases of tomato in field and greenhouse trials. *Crop protection*, 122, 90-97.

Essiedu, J. A., Adepoju, F. O., Ivantsova, M.N. (2020). Benefits and limitations in using biopesticides: A review. In: AIP Conference Proceedings. AIP Publishing LLC, 2313, 080002.

Fill, T. P., Silva, B. F. D., Rodrigues-Fo, E. (2010). Biosynthesis of phenylpropanoid amides by an endophytic *Penicillium brasilianum* found in root bark of *Melia azedarach*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(3), 622-629.

Fischer, I. H., Da Silva, L. M., Pelizzaro, M. J. V., Martins P. M. C., & Amorim, L. (2022). Survey of cucumber target spot, in vitro sporulation and aggressiveness of *Corynespora cassiicola*. *Comunicata Scientiae*, 13, e3881.

Ganie, S. A., Ghani, M. Y., Hussain, L. A., Ahangar, F. A. (2016). Perpetuation of *Alternaria solani* of Potato under Temperate Kashmir Valley Conditions. *Molecular Plant Breeding*, 7(5), 1-8.

Grigolli, J.F.J., Kubota, M. M., Alves, D.P., Rodrigues, G. B., Cardoso, C. R., Silva, D. J. H., Mizubuti, E. S. G. (2011). Characterization of tomato accessions for resistance to early blight. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 11 (2), 174-180.

Godoy, C. V., Utiamada, C. M., Meyer, M. C., Campos, H. D., Pimenta, C. B., Borges, E. P., Siqueri, F. V., Nunes Junior, J., da Silva, L. H. C. P., Sato, L. N., Madalosso, M., Volf, M. R., Barros, R., Balardin, R. S., Montecelli, T. D. N., Carlin, V. J. (2012). Eficiência de fungicidas para o controle da mancha-alvo, *Corynespora cassiicola*, na safra 2011/12: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. EMBRAPA, Circular técnica, 94.

Grijseels, S., Nielsen, J. C., Nielsen, J., Larsen, T. O., Frisvad, J. C., Nielsen, K. F., Frandsen, R. J. N., Workman, M. (2017). Physiological characterization of secondary metabolite producing *Penicillium* cell factories. *Fungal Biol Biotechnol*, 4, 8.

Hothorn, T., Bretz, F., Westfall, P. (2008). Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical Journal: Journal of Mathematical Methods in Biosciences*, 50 (3), 346-363.

Houbraken, J., Kocsubé, S., Visagie, C. M., Yilmaz, N., Wang, X.-C., Meijer, M., Kraak, B., Hubka, V., Bensch, K., Samson, R.A., and Frisvad, J. C. (2020). Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Studies In Mycology*, 95, 5-169.

Huang, S., Chen, H., Li, W., Zhu, X., Ding, W., Li, C. (2016). Quetoglobosinas bioactivas del hongo endófito de manglares *Penicillium chrysogenum*. *Mar. Drugs*, 14(10), 172.

Khalil, A. M. A., Hassan, S. E. D., Alsharif, S. M., Eid, A. M., Ewais, E. E. D., Azab, E., Gobouri, A. A., Elkelish, A., Fouda, A. (2021). Isolation and Characterization of Fungal Endophytes Isolated from Medicinal Plant *Ephedra pachyclada* as Plant Growth-Promoting. *Biomolecules*, 11(2), 140.

Kgatle, M.G., Flett, B., Truter, M., Aveling, T.A.S. (2020). Control of *Alternaria* leaf blight caused by *Alternaria alternata* on sunflower using fungicides and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Crop Protection*, 132, 105146.

Leite, Iris Carolina Henrique de Lima. (2023). *Clonostachys chloroleuca* e seus metabólitos secundários: controle de doenças foliares, otimização de cultivo e formulação. 113 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Leiminger, J., & Hausladen, H. (2012). Early blight control in potatoes using disease orientated threshold values. *Plant Dis.* 96, 124–130.

Lenth, R. V., Buerkner, P., Herve, M., Love, J., Miguez, F., Riebl, H. (2022). emmeans: Estimated marginal means, aka least-squares means (1.7. 4-1) [R-Package].

Lobo Júnior, M. L., Silva-Abud, L.L.S., Santos-Goulart, P. F., Macedo, R., Toledo-Souza, E.D. (2018). Panorama da pesquisa com patógenos radiculares no Brasil. *Desafios do Manejo de Doenças Radiculares Causadas por Fungos*. Recife: EDUFRPE, 17-34.

Lopez, D., Ribeiro, S., Label, P., Fumanal, B., Venisse, J. S., Kohler, A., de Oliveira, R. R., Labutti, K., Lipzen, A., Lail, K., Bauer, D., Ohm, R. A., Barry, K. W., Spatafora, J., Grigoriev, I. V., Martin, F. M., Pujade-Renaud, V. (2018). Genome-wide analysis of *Corynespora cassiicola* Leaf fall disease putative effectors. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–21.

Michereff J. M., Domingos, E. G. T. A., Menezes, M. (2005). *Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais*. Recife: EDUFRPE, 302-322.

Molina, J. P. E., Navarro, B. L., Allen, T. W., Godoy, C. V. (2022). Soybean target spot caused by *Corynespora cassiicola*: a resurgent disease in the Americas. *Tropical Plant Pathology*, 47, 315–331.

Moreira, R. R., De Mío, L. L. M. (2015). Potential biological agents isolated from apple fail to control *Glomerella* leaf spot in the field. *Biological control*, 87, 56-63.

Nielsen, J. C., Grijseels, S., Prigent, S., Ji, B., Dainat, J., Nielsen, K. F., Frisvad, J. C., Workman, M., Nielsen, J. (2017). Global analysis of biosynthetic gene clusters reveals vast potential of secondary metabolite production in *Penicillium* species. *Nature Microbiology*, 2(6), 1-9.

- Promptutha, I., Lumyong, S., Dhanasekaran, V., McKenzie, E. H. C., Hyde, K. D., Jeewon, R. (2007). A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. *Microbial Ecology* 53, 579–590.
- Rashmi, M., Kushveer, J. S., Sarma, V. V. (2019). A worldwide list of endophytic fungi with notes on ecology and diversity. *Mycosphere*, 10(1), 798–1079.
- R Core Team (2023). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., Gerhard, D. (2015). Dose-response analysis using R. *PloS one*, 10(12), e0146021.
- Reznikov, S., De Lisi, V., Claps, P., González, V., Devani, M. R., Castagnaro, A. P., Ploper, L. D. (2019). Evaluation of the efficacy and application timing of different fungicides for management of soybean foliar diseases in northwestern Argentina. *Crop Protection*, 124, 104844.
- Rojas, E. C., Jensen, B., Jørgensen, H. J. L., Latz, M. A. C., Esteban, P., Collinge, D. B. (2022). The Fungal Endophyte *Penicillium olsonii* ML37 Reduces Fusarium Head Blight by Local Induced Resistance in Wheat Spikes. *J. Fungi*, 8, 345.
- Romero, P. I., Machado, J. P., Mizubuti, E. S., Sandoval, N. S., Ferreira, A. F. (2020). A Pinta Preta (*Alternaria grandis*) - a inimiga da bataticultura brasileira. *Rev. Agr. Acad.*, 3(4).
- Runno-Paurson, E., Loit, K., Hansen, M., Tein, B., Williams, I.H. & Mänd, M. (2015) Early blight destroys potato foliage in the northern Baltic region. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B -Soil and Plant Science*, 65, 422–432.
- Silva Junior, J. A. L. O., Borges, A. V., Silva, O. H. A., Leite, I. C. H. L., Alves, K. S., Medeiros, L. S., Abreu, L. M. (2023). Lipopeptide-enriched extracts of *Bacillus velezensis* B157 for controlling tomato early blight. *Crop Protection*, 172, 106317.
- Silva, N. I., Brooks, S., Lumyong, S., Hyde, K. D. (2019). Use of endophytes as biocontrol agents. *Fungal Biology Reviews*, 33(2), 133-148.

Soares, R. M., Godoy, C. V., Oliveira, M. C. N. (2009). Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha alvo da soja. *Tropical Plant Pathology*, 34(5), 333-338.

Stenberg, J. A., Sundh, I., Becher, P. G., Björkman, C., Dubey, M., Egan, P. A., ... Viketoft, M. (2021). When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. *Journal of Pest Science*, 94(3), 665-676.

Tewari, S., Shrivastava, V.L., Hariprasad, P., Sharma, S. (2019). Harnessing Endophytes as Biocontrol Agents. In: Ansari, R., Mahmood, I. (eds) *Plant Health Under Biotic Stress*. Springer, Singapore, 189–218.

Toghiani, R. M. K., Boyom, F. F. (2020). Endophytic *Penicillium* species and their agricultural, biotechnological, and pharmaceutical applications. *3 Biotech*, 10, 107.

Toulet, M. L., Neira, D. A., Escobar, M., Pardo, E. M., Arias, M. E., Ploper, L. D., Welin, B., Castagnaro, A. P., Chalfoun, N. R. (2022). Morphological and pathogenic characterization of *Corynespora cassiicola* isolates reveals specific genotypic interactions in soybean. *Plant pathology*, 71(4), 843-859.

Tuthill, D. E., Frisvad, J. C., Christensen, M. (2001). Systematics of *Penicillium simplicissimum* based on rDNA sequences, morphology and secondary metabolites. *Mycologia*, 93(2), 298-308.

van Santen, J. A., Poynton, E. F., Iskakova, D., McMann, E., Alsup, T. A., Clark, T. N., Fergusson, C. H., Fewer, D. P., Hughes, A. H., McCadden, C. A., Parra, J., Soldatou, S., Rudolf, J. D., Janssen, E. M-L., Duncan, K.R., Linington, R. G. (2022). The Natural Products Atlas 2.0: a database of microbially-derived natural products. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D1317-D1323.

Vorholt, J. A. (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nature reviews microbiology*, 10, 828-840.

Waqas, M., Khan, A. L., Hamayun, M., Shahzad, R., Kang, S-M., Kim, J-G., & Lee, I-J. (2015). Endophytic fungi promote plant growth and mitigate the adverse effects of stem rot: an example of *Penicillium citrinum* and *Aspergillus terreus*. *Journal of Plant Interactions*, 10(1), 280-287.

Wolters, P. J., VOS, L., Bijsterbosch, G., Woudenberg, J. H. C., Visser, R. G. F., Linden, G. V. D., Vleeshouwers, V. G. A. A. (2019). A rapid method to screen wild *Solanum* for resistance to early blight. *European Journal of Plant Pathology*, 154(1), 109-114.

Zhao, Q., Shi, Y., Wang, Y., Xie, X., Li, L., Fan, T., Guo, L., Chai, A., Li, B. (2022). Temperature and Humidity Regulate Sporulation of *Corynespora cassiicola* That Is Associated with Pathogenicity in Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Biology*, 11(11), 1675.

Zhu, X., Zhou, D., Liang, F., Wu, Z., She, Z., Li, C. (2017). Penochalasin K, a new unusual chaetoglobosin from the mangrove endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* V11 and its effective semisynthesis. *Fitoterapia*, 123, 23–28.

6. MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Estimativas de CE_{50} de quatro extratos orgânicos de *Penicillium* spp. contra *A. linariae* e *C. truncatum*, e dois extratos orgânicos de *Penicillium* spp. contra *C. cassiicola*, em ensaios em placa de Petri com meio BDA.

Patógeno	Extrato	Ensaio	CE_{50}	Std. Erros	Lower	Upper	
<i>A. linariae</i>	UCBV283	Ensaio 1	3.297	0.123	3.044	3.550	
		Ensaio 2	3.746	0.097	3.548	3.945	
	UCBV287	Ensaio 1	4.352	0.116	4.113	4.590	
		Ensaio 2	4.713	0.099	4.509	4.917	
	UCBV304	Ensaio 1	5.670	0.047	5.573	5.767	
		Ensaio 2	5.498	0.064	5.365	5.630	
	UCBV323	Ensaio 1	6.561	0.040	6.479	6.642	
		Ensaio 2	6.441	0.037	6.364	6.518	
	<i>C. truncatum</i>	UCBV283	Ensaio 1	4.249	0.061	4.124	4.374
			Ensaio 2	4.169	0.085	3.994	4.343
UCBV287		Ensaio 1	5.698	0.072	5.550	5.847	
		Ensaio 2	5.848	0.112	5.618	6.079	
UCBV304		Ensaio 1	6.139	0.111	5.910	6.368	
		Ensaio 2	5.794	0.157	5.472	6.117	
UCBV323		Ensaio 1	7.694	0.076	7.537	7.851	
		Ensaio 2	7.711	0.190	7.321	8.102	
<i>C. cassiicola</i>		UCBV283	Ensaio 1	5.430	0.112	5.200	5.660
			Ensaio 2	5.393	0.141	5.103	5.684
	UCBV287	Ensaio 1	5.647	0.103	5.437	5.857	
		Ensaio 2	6.152	0.114	5.918	6.386	

Tabela S2. Estimativas de CE_{50} de dois extratos orgânicos de *Penicillium* spp. contra *C. cassiicola* e *A. linariae*, em placas de Elisa.

Patógeno	Extrato	Ensaio	CE_{50}	Std. Erros	Lower	Upper
<i>C. cassiicola</i>	UCBV283	Ensaio 1	7.54	0.12	7.30	7.79
		Ensaio 2	6.72	0.15	6.41	7.02
	UCBV287	Ensaio 1	6.85	0.08	6.29	6.56
		Ensaio 2	6.65	0.18	6.27	7.04

<i>A. linariae</i>	UCBV283	Ensaio 1	6.37	0.12	6.11	6.63
		Ensaio 2	7.67	0.06	7.54	7.80
	UCBV287	Ensaio 1	6.35	0.30	5.72	6.98
		Ensaio 2	7.30	0.12	7.05	7.56

Tabela S3. Severidade final da pinta preta do tomate e eficácia de controle dos extratos orgânicos UCBV283 e UCBV287a não formulados

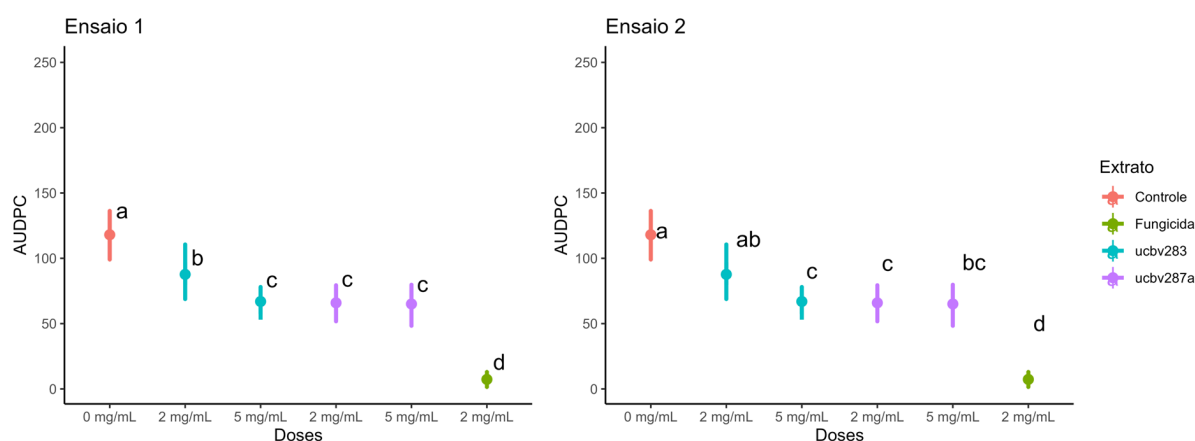
Ensaio	Extrato	Doses	Média	quant	Tukey	Eficácia (%)
Ensaio 1	Controle	0 mg/mL	31,44	33,00	a	
	UCBV283	5 mg/mL	27,88	31,13	ab	11,30
	UCBV283	2 mg/mL	19,44	20,94	c	38,15
	UCBV287a	5 mg/mL	24,02	26,73	b	23,59
	UCBV287a	2 mg/mL	24,31	25,94	b	22,67
	Clorotalonil	2 mg/mL	1,70	2,56	d	94,59
Ensaio 2	Controle	0 mg/mL	24,60	25,94	a	
	UCBV283	5 mg/mL	21,01	25,56	ab	14,60
	UCBV283	2 mg/mL	11,63	16,13	c	52,71
	UCBV287a	5 mg/mL	14,15	21,69	bc	42,48
	UCBV287a	2 mg/mL	17,10	19,48	abc	30,49
	Clorotalonil	2 mg/mL	0,30	0,34	d	98,78

Tabela S4. Severidade final da pinta preta do tomate e eficácia de controle dos extratos orgânicos UCBV283 e UCBV287a formulados.

Ensaio	Extrato	Doses	Média	quant	Tukey	Eficácia (%)
Ensaio 1	Controle	0 mg/mL	25,46	28,25	a	
	UCBV283	2 mg/mL	5,41	6,63	c	78,75
	UCBV283	1 mg/mL	8,02	10,21	bc	68,49
	UCBV287a	2 mg/mL	5,97	6,57	c	76,56
	UCBV287a	1 mg/mL	8,50	11,28	bc	66,64
	UCBV07	7,5 mg/mL	11,50	12,15	b	54,85
	Clorotaloni 1	2 mg/mL	0,33	0,41	d	98,71

Tabela S5. Severidade final de mancha-alvo da soja e eficácia de controle dos extratos orgânicos UCBV283 e UCBV287a formulados

Ensaio	Extrato	Doses	Média	quant	Tukey	Eficácia (%)
Ensaio 1	Controle	0 mg/mL	12,84	14,71	a	
	UCBV283	1 mg/mL	5,52	6,85	bc	57,01
	UCBV283	0,5 mg/mL	4,70	5,88	c	63,38
	UCBV287a	1 mg/mL	6,85	8,29	bc	46,60
	UCBV287a	0,5 mg/mL	8,05	10,58	b	37,31
	UCBV07	5 mg/mL	5,73	6,64	bc	55,34
	Mancozeb	2 mg/mL	0,48	0,83	d	96,25
Ensaio 2	Controle	0 mg/mL	11,42	12,94	a	
	UCBV283	1 mg/mL	6,56	6,65	b	42,57
	UCBV283	0,5 mg/mL	7,59	7,25	ab	33,53
	UCBV287a	1 mg/mL	4,87	5,88	b	57,32
	UCBV287a	0,5 mg/mL	6,66	8,21	b	41,70
	UCBV07	5 mg/mL	3,86	4,56	bc	66,23
	Mancozeb	2 mg/mL	0,29	0,31	c	97,47

**Figura S1.** Área abaixo da curva de progresso da pinta preta do tomateiro cv. Micro-tom ao longo de 12 dias após a exposição ao patógeno, em dois ensaios independentes. As barras representam o intervalo de confiança. Controle: Água; Fungicida: Clorotalonil; UCBV 283 e UCBV 287a: extratos sem formular de *P. brasilianum*.

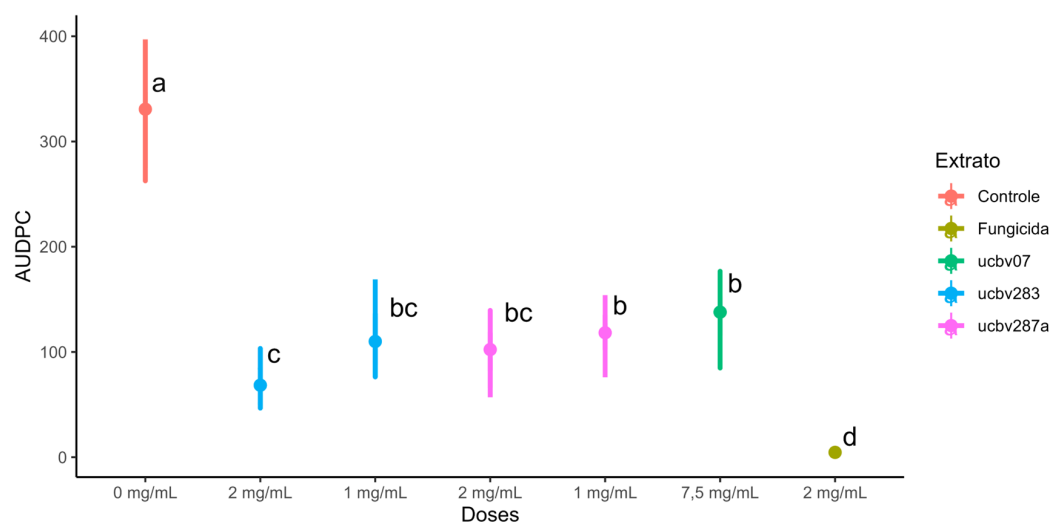


Figura S2. Área abaixo da curva de progresso da pinta preta do tomateiro cv. Micro-tom ao longo de 19 dias após a exposição ao patógeno. As barras representam o intervalo de confiança. Controle: Água; Fungicida: Clorotalonil; UCBV 07: extrato formulado de *C. chloroleuca*; UCBV 283 e UCBV 287a: extratos formulados de *P. brasilianum*.

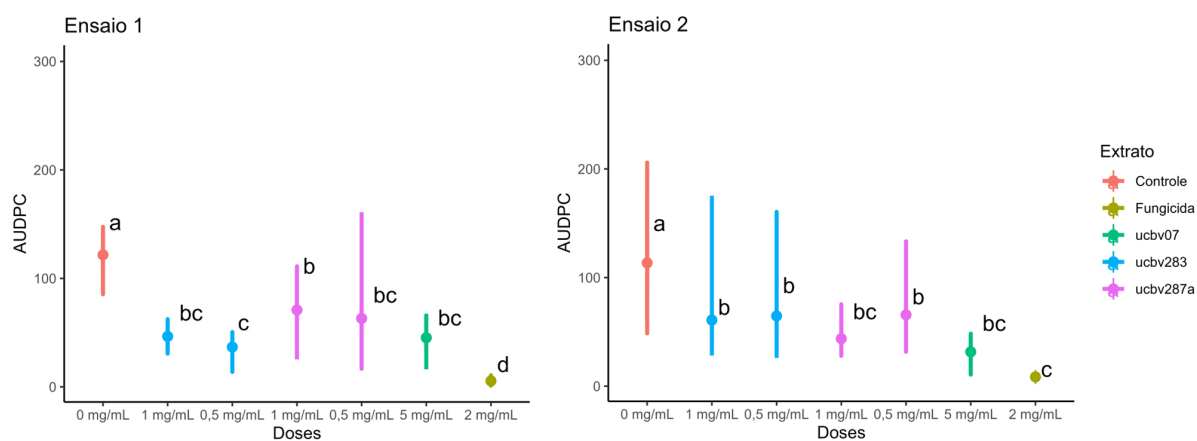


Figura S3. Área abaixo da curva de progresso da mancha-alvo da soja ao longo de 21 dias após a exposição ao patógeno. As barras representam o intervalo de confiança. Controle: Água; Fungicida: Clorotalonil; UCBV 07: extrato formulado de *C. chloroleuca*; UCBV 283 e UCBV 287a: extratos formulados de *P. brasilianum*.