



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA –
CITA**

***MONILIOPTHORA PERNICIOSA* E CUPUAÇUZEIRO
(*THEOBROMA GRANDIFLORUM*): CONTROLE
BIOLÓGICO E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO POR
FUNGOS ENDOFÍTICOS**

JUSLEY SOUZA SANTOS

**RIO BRANCO, AC
DEZEMBRO /2022**

JUSLEY SOUZA SANTOS

***MONILIOPHTHORA PERNICIOSA* E CUPUAÇUZEIRO
(*THEOBROMA GRANDIFLORUM*): CONTROLE
BIOLÓGICO E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO POR
FUNGOS ENDOFÍTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, da Universidade Federal do Acre, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências e Inovação Tecnológica**.

ORIENTADORA: Prof. Dra. Leila Priscila Peters

CO-ORIENTADORA: Prof. Dra. Clarice Maia Carvalho

RIO BRANCO, AC
DEZEMBRO /2022

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

S237m Santos, Jusley Souza, 1997 -

Moniliophthora perniciosa e cupuaçuzeiro (*Theobroma Grandiflorum*): controle biológico e promoção de crescimento por fungos endofíticos / Jusley Souza Santos; orientador: Dr^a. Leila Priscila Peters e Co-orientador: Dr^a. Clarice Maia Carvalho. – 2022.

117 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-graduação em Ciência Inovação e Tecnologia para a Amazônia, Rio Branco, 2022.

Inclui referências bibliográficas e anexos.

1. Controle biológico. 2. Vassoura-de-bruxa. 3. *Trichoderma* sp.. I. Peters, Leila Priscila (orientador). II. Carvalho, Clarice Maia (Co-orientador). III. Título.

CDD: 509

Bibliotecária: Nádia Batista Vieira CRB-11º/882.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E
TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA – CITA

**MONILIOPHTHORA PERNICIOSA E CUPUAÇUZEIRO
(THEOBROMA GRANDIFLORUM): CONTROLE
BIOLÓGICO E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO POR
FUNGOS ENDOFÍTICOS**

JUSLEY SOUZA SANTOS

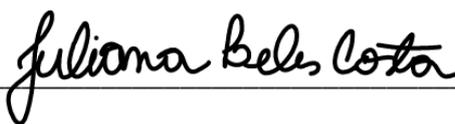
DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 09/12/2022



Leila Priscila Peters
Universidade Federal do Acre - UFAC
Orientadora



Berenice Kussurnoto de Alcantara da Silva
Universidade Federal do Acre
Membra externa



Juliana Leles Costa
Faculdade São Francisco de Barreiras, FASB
Membra externa

A minha mãe que sempre me apoiou e me incentivou aos estudos. Não tem sido diferente agora! Obrigada por todo o apoio. Meu objetivo é conseguir retribuir tudo que está fazendo por mim.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus pela oportunidade da vida!

A Professora Dra. Leila Priscila Peters por todo conhecimento a mim compartilhado, por toda confiança e por todas as palavras de motivação. A Professora Dra Clarice Maia Carvalho, por todo apoio e orientação concedidos.

A minha família por todo o apoio sempre prestado a mim incondicionalmente. Sem vocês eu nada faria ou seria! A minha filha Júlia Souza Peviani, com certeza você é minha fonte de forças todo os dias que acordo. Quero sempre te dar o meu melhor e tentar tornar o mundo melhor para você também!

Aos meus amigos de longa data, desde a graduação até o presente momento da pós-graduação. Vocês fazem parte da minha história, de quem eu sou e de quem serei. Quero aqui representá-los nos nomes das minhas amigas Rosiane Lima, Karoline Silva e Mariana Dantas.

Aos colegas de laboratório Bruno, Thalya, Nárcya por toda ajuda mesmo nas coisas simples e por toda a descontração que vocês proporcionam. E especialmente ao Fernando por sempre me ajudar prontamente em tudo que peço, até mesmo nas coisas que peço em cima da hora. Com certeza você foi e continuará sendo de extrema importância para esta pesquisa. E a Laryssa por me ajudar com toda a estatística e montagem de gráficos. Sou muito grata!

A Universidade Federal do Acre (UFAC) e ao programa de pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia (PPG-CITA) pela oportunidade e estrutura concedida para o desempenho do trabalho.

Por fim, agradeço ao Laboratório de Microbiologia (LabMicro) por toda a estrutura e recurso para que eu possa desenvolver a pesquisa.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

Muito obrigada!

Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.
Isaac Newton

RESUMO

O fungo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* é o agente causador da doença Vassoura-de-Bruxa em culturas de cupuaçu e cacau. A doença Vassoura-de-Bruxa causa inúmeros prejuízos financeiros aos agricultores que precisam realizar a poda fitossanitária e utilizar pesticidas químicos. Uma alternativa ao uso de pesticidas químicos é a utilização de microrganismos como inimigos naturais para o combate de um agente indesejado. O objetivo deste trabalho foi identificar estudos realizados na Amazônia utilizando microrganismos como fonte de controle a fitopatógenos, identificar isolados coletados no Parque Estadual Chandless e realizar experimento em casa de vegetação utilizando três fungos endofíticos para promoção de crescimento e controle de *M. perniciosa* em mudas de cupuaçuzeiro. Para a reunião de estudos realizados na Amazônia foram realizadas buscas em banco de pesquisas, os resultados foram planilhados e percorridos. Para identificar os isolados do P. E. Chandless foram realizadas identificações macroscópicas, microscópicas e moleculares. No experimento em casa de vegetação, as mudas foram inoculadas com o patógeno e os três fungos endofíticos onde permaneceram em estufa por três meses. Na revisão identificamos que os microrganismos mais utilizados na Amazônia para controle biológico pertencem aos gêneros *Trichoderma* sp. e *Bacillus* sp. Os isolados analisados provavelmente pertencem a *M. perniciosa* coletados do hospedeiro *H. acutifolia*. Os resultados em casa de vegetação foram satisfatórios em relação à promoção de crescimento e controle da doença principalmente para os fungos *T. tawa* e *Cunninghamella blakesleeana*. Neste estudo relatamos o primeiro estudo e resultados promissores de *C. blakesleeana* para a promoção de crescimento e controle da vassoura-de-bruxa em cupuaçuzeiro.

Palavras-chave: Controle Biológico; Vassoura-de Bruxa; *Trichoderma* sp.

ABSTRACT

The basidiomycete fungus *Moniliophthora perniciosa* is the causative agent of witches' broom disease in cupuaçu and cocoa crops. The witches' broom disease causes financial losses to farmers who need to carry out phytosanitary pruning and use chemical pesticides. An alternative to the use of chemical pesticides is the use of microorganisms as natural enemies to combat a pathogenic agent. The objective of this work was to identify studies carried out in the Amazon using microorganisms as a control source of phytopathogens, to identify isolates collected in Chandless State Park and to carry out an experiment in a greenhouse using three endophytic fungi to promote growth and control *M. perniciosa* in seedlings of cupuaçuzeiro. For the collection of studies carried out in the Amazon, searches were carried out in research databases, the results were controlled and disseminated. To identify P. E. Chandless isolates, macroscopic, microscopic and molecular identifications were performed. In the greenhouse experiment, the seedlings were inoculated with the pathogen and the three endophytic fungi where they remained in a greenhouse for three months. In the review, we identified that the microorganisms most used in the Amazon to control inheritance to the genera *Trichoderma sp.* and *Bacillus sp.* The analyzed isolates probably belong to *M. perniciosa* collected from the host *H. acutifolia*. The results in the greenhouse were strong in relation to growth promotion and disease control mainly for *T. tawa* and *Cunninghamella blakesleeana* fungi. In this study we report the first study and promising results of *C. blakesleeana* for the growth promotion and control of witches' broom in cupuaçuzeiro.

Keywords: Biological Control; Witch's Broom; *Trichoderma sp.*

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Revisão Bibliográfica	
Figura 1. Ciclo de vida da <i>Moniliophthora perniciosa</i> em <i>Theobroma cacao</i> .	19
Figura 2. Cladograma <i>M. perniciosa</i> .	20
Capítulo I.	
Figura 1. Número total de artigos selecionados para revisão sistemática de estudos com microorganismos para o biocontrole de fitopatógenos na Amazônia	42
Figura 2. Microrganismos biocontroladores da Amazônia relatados em estudos.	44
Figura 3. Microrganismos controladores de fitopatógenos da Amazônia relatados nos países Brasil, Colômbia, Equador e Peru.	45
Figura 4. Fitopatógenos e Mecanismos de ação relatados para microrganismos da Amazônia.	53
Figura 5. Processos associados aos mecanismos de ação de microrganismos amazônicos a fitopatógenos e principais hospedeiros que abrigam microrganismos biocontroladores	63
Capítulo II.	
Figura 1. Alinhamento do DNA das sequências da região ITS de <i>Moniliophthora perniciosa</i> isolada de <i>Heteropterys acutifolia</i> , Liana, restos de madeira não identificados e <i>Theobroma cacao</i> .	84
Figura 2. Alinhamento do DNA das sequências da região LSU de <i>Moniliophthora perniciosa</i> isolada de <i>Heteropterys acutifolia</i> , Liana, restos de madeira não identificados e <i>Theobroma cacao</i> .	85
Figura 3. Isolados de <i>Moniliophthora perniciosa</i> (H-biotipo) em <i>Heteropterys acutifolia</i> .	86
Capítulo III	
Figura 1 Fungos endofíticos antagonistas a <i>Moniliophthora perniciosa</i> . a) <i>Trichoderma tawa</i> crescido em meio BDA. B) <i>Clonostachys rosea</i> crescido em meio BDA c) <i>Cunninghamella blakesleeana</i> crescido em meio Aveia	88
Figura 2 Coleta de basidióporos de <i>M. perniciosa</i>	8
Figura 3 Soluções contendo esporos de isolados de a) <i>Trichoderma tawa</i> ., b) <i>Clonostachys rosea</i> c) <i>Cunninghamella blakesleeana</i> .	94

Figura 4	Inoculação do patógeno	96
Figura 1	Mudas de cupuaçuzeiro em estufa. a) ângulo de dentro da estufa. b. visão geral da estufa.	100
Figura 2	Promoção de crescimento por <i>Cunninghamella blaskeleeana</i> e <i>T. tawa</i>	102
Figura 3	Peso seco da biomassa da parte aérea dos tratamentos com a) <i>C. blaskeleeana</i> , <i>T. tawa</i> , e <i>C. rosea</i> ;	105
Figura 4	Efeito dos fungos endofíticos no teor de clorofila total dos tratamentos com <i>C. blaskeleeana</i> , <i>T. tawa</i> e <i>C. rosea</i> ;	105
Figura 5	Efeito dos fungos endofíticos no teor de carotenoides dos tratamentos com <i>C. blaskeleeana</i> , <i>T. tawa</i> e <i>C. rosea</i> .	105
Figura 6	Fungos reisolados das folhas de cupuaçuzeiro. a) Provável colônia de <i>M. pernicioso</i> . b) Provável colônia de <i>T. tawa</i> .	106

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	Pág.
Capítulo I	
Tabela 1. Lista de descritores e banco de dados utilizados para busca de estudos utilizando microorganismos para o biocontrole de fitopatógenos na Amazônia.	40
Tabela 2. Fungos endofíticos controladores de fitopatógenos isolados de ambientes e hospedeiros amazônicos.	46
Tabela 3. Bactérias controladores de fitopatógenos isolados de hospedeiros amazônicos	54
Capítulo II	
Tabela 1. Números de acesso do GenBank das sequências de DNA de <i>Moniliophthora perniciosa</i> utilizadas na análise dos alinhamentos.	82
Tabela 2. Tabela 2: Correspondência máxima de identidade de nucleotídeos para isolados de <i>Moniliophthora perniciosa</i> (PEC11 e PECT1) com base nas sequências ITS e LSU usando análise BLAST.	83
Tabela 3. Morfologia de isolados de <i>Moniliophthora</i> associados a <i>Heteropterys acutifolia</i> coletados no Parque Estadual de Chandless.	86

LISTA DE ABREVIATURAS

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LSPA - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola

NPK - Nitrogênio, fósforo e potássio

VDB – Vassoura-de-Bruxa

E – Endofítico

E+P – Endofítico + Patógeno

C+ - Controle positivo

C- - Controle negativo

SUMÁRIO

	Pág.
INTRODUÇÃO GERAL	16
OBJETIVOS.....	17
REVISÃO DE LITERATURA	18
1 CAPÍTULO I	38
INTRODUÇÃO	40
METODOLOGIA	41
RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
1 Fungos amazônicos controladores de doenças de plantas	42
2 Bactérias amazônicas controladoras de doenças de plantas	51
3 Mecanismo de ação dos microrganismos amazônicos controladores de fitopatógenos	61
4 Fonte/Local dos microrganismos controladores	65
5 Conclusão	67
CAPÍTULO II	39
1.1 INTRODUÇÃO	79
1.2 MATERIAL E MÉTODOS	80
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
CAPÍTULO III	90
1 INTRODUÇÃO	91
2 MATERIAL E MÉTODOS	93
3 RESULTADOS	101
4 DISCUSSÃO	107
5 CONCLUSÃO	111
CONCLUSÕES GERAIS	112
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113

INTRODUÇÃO GERAL

Theobroma grandiflorum (Willd. ex Spreng.) Schum. é uma árvore frutífera originária da floresta amazônica, pertencente à família Malvaceae (KUHN et al. 2010; da SILVA et al. 2017). O valor comercial do cupuaçu vem da polpa que é utilizada principalmente pela indústria alimentícia para fazer sucos, doces e sorvetes (COSTA et al. 2003; DE OLIVEIRA e GENOVESE 2013; PUGLIESE et al. 2013).

Segundo o IBGE existem 80 mil pés de cupuaçuzeiro no Acre, sendo que a capital Rio Branco é a maior produtora. Em 2017 foram produzidas 402 toneladas equivalendo a 285.018 milhões de reais (IBGE, 2017).

O cultivo de cupuaçu é afetado pela doença vassoura-de-bruxa (ALVES; RESENDE, 2008) causada por um fungo basidiomiceto hemibiotrófico *Moniliophthora perniciosa* (AIME; PHILLIPS-MORA 2005). Meristemas localizados nos galhos ou almofadas florais são infectados pelo patógeno, que causa o inchaço da haste conhecido como vassouras. O patógeno também ataca as células do córtex do fruto, inutilizando as sementes. A vassoura-de-bruxa é um dos principais fatores limitantes para a produção de cupuaçu, assim como para a cacauicultura no Brasil (LOPES et al. 2011).

O fungo *M. perniciosa* também é encontrado em associação com outras espécies de plantas. Com base nisso, *M. perniciosa* é classificado em cinco biótipos de acordo com a especificidade do hospedeiro: o **biótipo C** infecta plantas da família Malvaceae (por exemplo, cupuaçuzeiro), o **biótipo S** infecta membros da família Solanaceae (por exemplo, plantas de tomate), e o **biótipo L** é encontrado em associação com membros da família Bignoniaceae (por exemplo, lianas), o **biótipo B** infecta *Bixa orellana*, um membro da família Bixaceae (Bastos & Anderbrhan, 1986) e o **biótipo H** representa *M. perniciosa* que infecta membros da família Malpighiaceae (RESENDE et al., 2000; BASTOS; EVANS, 1985; GRIFFITH; HEDGER, 1994; HEDGER, 1987).

O uso de fungicidas para o controle de doenças ocasionadas por patógenos na agricultura é uma prática fundamental para garantir a segurança alimentar mundial. Entretanto, essa medida de controle gera impactos negativos ao meio ambiente, à saúde humana e animal. Além do mais, a contaminação excessiva do solo pelos defensivos agrícolas gera o desequilíbrio da microbiota, fazendo com que microrganismos fitopatogênicos desenvolvam mecanismos de resistência a esses compostos (BAĆMAGA; WYSZKOWSKA; KUCHARSKI, 2019; ROILIDES; IOSIFIDIS, 2019; ZUBROD et al., 2019).

Atualmente os métodos de controle da doença se baseiam em manutenção cultural, Sistemas de Produção Agroflorestal (SAFs), controle químico, controle biológico, melhoramento genético e manejo integrado (ARMENGOT et al. 2020; MEDEIROS et al. 2010; VÁSQUEZ et al. 2018; AHNERT et al. 2018; EVANS 2016). O controle biológico se integra ao campo e à pesquisa se tornando uma alternativa sustentável e potencialmente mais rentável ao produtor, quando comparado à utilização dos agroquímicos, sanando os problemas fitossanitários das plantações e oferecendo melhores condições de cultivo (RASHAD; MOUSSA, 2020).

Dentre os agentes antagonistas, os microrganismos endofíticos representam fontes importantes para investigações por atuarem na proteção, promoção de crescimento vegetal, além de apresentarem modos de ação contra os patógenos como: parasitismo, hiperparasitismo e micoparasitismo, competição, antibiose e indução de resistência contra fitopatógenos (MACHADO et al., 2012; ISAIAS et al., 2014). Esses microrganismos podem limitar a atividade do patógeno ou induzir a resistência do hospedeiro (VIMALA; SURIACHANDRASELVAN, 2009; THAKUR; SOHAL, 2013).

Dado o exposto acima, o presente trabalho possui o objetivo de descrever isolados de um biótipo ainda não registrado para o Estado do Acre, bem como entender a interação planta-endofítico-patógeno em teste de antagonismo através das bases moleculares utilizando a técnica de RNA-seq.

2. OBJETIVOS

I. Objetivo geral

Identificar fungo com potencial antagonista e promotor de crescimento isolado do próprio cupuaçuzeiro.

Objetivos específicos

- Relatar a ocorrência de um biótipo de *M. pernicioso* para o estado do Acre.
- Revisar os microrganismos, fungos e bactérias, com potencial biocontrolador já relatados na Amazônia.
- Identificar fungo com potencial antagonista e promotor de crescimento isolado do próprio cupuaçuzeiro através dos parâmetros avaliativos como altura, número de folhas, peso seco da biomassa da parte aérea e raiz e teores de clorofila e carotenoides.

REVISÃO DA LITERATURA

1. Cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) e suas principais doenças fúngicas

Theobroma grandiflorum (Willd. Ex. Spreng.) Schum.] pertence à família Malvaceae e à subfamília Sterculioideae e é conhecido como cupuaçuzeiro (BYNG et al. 2016). É uma espécie arbórea nativa da Amazônia, cujos frutos são amplamente utilizados na produção de doces, sucos, sorvetes, geleias, entre outros produtos (OLIVEIRA; GENOVESE, 2013) como cosméticos (DA SILVA MOTA et al. 2020). O cupuaçuzeiro é considerado uma das culturas mais rentáveis da região Amazônica, coexistindo favoravelmente com várias culturas. A procura por cupuaçu vem aumentando sua importância econômica em âmbito nacional, e internacional no mercado de frutas exóticas tropicais (SOUZA et al. 2002; DIAS et al. 2019).

A importância do gênero *Theobroma* L., família Malvaceae (ALVERSON et al. 1999), deve-se, principalmente, à relevância econômica do cacauzeiro (*T. cacao* L.) e, em menor monta, à emergente procura pelo cupuaçuzeiro [*Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.) Schum.], únicas espécies do gênero cultivadas comercialmente (SILVA et al. 2011). Por ser da mesma família do cacauzeiro (*T. cacao* L.), as sementes do cupuaçu possuem características botânicas e propriedades químicas parecidas com as do cacau (SILVA; FARIAS, 2018). As sementes também podem ser processadas para fabricar um produto semelhante ao chocolate chamado de “cupulate” (GENOVESE; LANNES, 2009).

O fruto do cupuaçu tem 12 a 15 cm de comprimento, 10 a 12 cm de largura pesando cerca de 1 kg e contém sementes organizadas em cinco fileiras verticais e embebidas em polpa fibrosa branco-amarelada com sabor acidulado e cheiro agradável (TEIXEIRA et al. 2016; GONDIM et al. 2011) sendo muito apreciada como ingrediente em bebidas à base de sumo de fruta (ALVES et al. 2007). A polpa é rica em compostos voláteis, sais minerais, cálcio, fósforo, ferro e vitaminas A, B1, B2 e C, que aumentam a eficiência física, aceleram a cicatrização, combatem infecções e resfriados, aumentam a eficiência do sistema imunológico e favorecem a elasticidade da pele prevenindo rugas (SAMPAIO et al. 2021). Além disso, a polpa é composta por grande proporção de amido, polissacarídeos de pectina e fibra alimentar que, segundo alguns trabalhos, têm demonstrado redução dos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos em ratos e humanos (FIETZ et al. 1999; MARTINS, 2008; PEREIRA; ABREU; RODRIGUES, 2018).

A distribuição geográfica do cupuaçuzeiro originalmente se restringia às áreas de floresta nativa ao sul do Rio Amazonas, oeste do Rio Tapajós, incluindo o sul e sudeste do Estado do Pará, sendo este o maior produtor nacional, com mais de 14.000 tem (HOMMA et al. 2011) até a região “pré-amazônica” do Estado do Maranhão. Esta região foi considerada como o centro de origem da espécie (CUATRECASAS, 1964).

Atualmente, a produção está concentrada na maioria dos estados da região Norte. Amazonas, Pará, Acre, Rondônia e Roraima são os maiores produtores da fruta no país, mas apresenta expansão em outras regiões (BRASIL, 2007; DE SOUZA et al. 2020). Em 2019, a produção de cupuaçu foi a que mais cresceu em Rondônia, pois o aumento da safra foi de 200% (IBGE/ LSPA/GCEA, 2019).

De acordo com a SEDAP/PA (2020), em 2018 o cupuaçuzeiro apresentou uma área plantada ou destinada à colheita de 8.545 ha, obtendo nesse ano uma produção de 27.510 toneladas de fruto. Entretanto, avaliando os anos anteriores, percebe-se pelos dados da SEDAP/PA (2020) que o ano de 2012 foi o de maior área plantada ou destinada à colheita (12.996 ha) e de maior produção de frutos (46.024 toneladas).

Diversas doenças ocasionadas por fungos fitopatogênicos podem se manifestar no cupuaçuzeiro (ALVES et al. 2013). A mancha de *Phomopsis*, causada pelo fungo *Phomopsis sp.*, provoca manchas circulares bem delimitadas nas folhas e na haste de mudas e de plantas adultas, ocorrendo o encarquilhamento do tecido ao redor das lesões e posterior desprendimento do tecido no centro das mesmas, formando pequenas perfurações no limbo foliar (BENCHIMOL, 2004).

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* é considerado um patógeno fraco por atacar somente plantas debilitadas, a partir de ferimentos na casca. A morte progressiva nos ramos, caracteriza-se pelo amarelecimento e secamento das folhas do ramo doente sem promover o superbrotamento, mas que, se o ramo seco não for removido e tratado, afetará o galho e, posteriormente, toda a planta, levando-a à morte (LIMA; SOUZA 1998). A podridão vermelha é causada pelo fungo *Ganoderma philipii*, que vive no solo e afeta o sistema radicular. Os fungos apodrecedores de troncos em decomposição afetam as raízes do cupuaçuzeiro, causando prejuízos bem elevados, por ocorrer a morte da planta, diminuindo a produção na área (LIMA; SOUZA 1998).

Moniliophthora roreri é considerado o agente causal da monilíase e infecta especificamente, frutos de *T. grandiflorum* e *T. cacao* em diferentes estádios fenológicos de desenvolvimento. Até então, a Monilíase só tinha sido observada em cupuaçuzeiro na

Amazônia venezuelana, próximo à fronteira com o Brasil (PARRA et al. 2009). Atualmente, há relatos de infecção do cacaeiro para este fitopatógeno pela primeira vez em território brasileiro (BRASIL, 2021). Os sintomas da monilíase no fruto é semelhante a VDB (vassoura-de-bruxa) até o ponto de formação do pseudoestroma branco, conferindo uma aparência fosca nas lesões da vagem em expansão, enquanto as lesões nas vagens infectadas por *M. pernicioso* são mais restritas e afundadas (EVANS, 2016b).

A vassoura-de-bruxa é uma enfermidade que causa os maiores prejuízos econômicos para a cultura de cupuaçu. Sua ocorrência é generalizada na Amazônia, local de origem da planta. O fungo que causa a doença é o *Moniliophthora pernicioso*, o qual é disseminado pelos basidiósporos, que são liberados a partir dos basidiomas produzidos em vassouras e frutos secos. Essa doença manifesta-se em mudas e plantas adultas através de vassouras vegetativas formadas a partir da infecção da gema apical ou axilar, sendo que os ramos se tornam hipertrofiados, com proliferação de brotações laterais hipertrofiadas; posteriormente as vassouras morrem e secam. As flores e frutos infectados secam e têm crescimento paralisado (SOUZA et al., 2014).

2. Vassoura-de-bruxa

A vassoura-de-bruxa foi descrita em 1785 pelo naturalista Alexandre Rodrigues Ferreira durante uma expedição na bacia amazônica. A doença está presente nas plantações de cacau dos países da América, e reduz consideravelmente a produção de frutos e a qualidade das sementes se tornando um fator limitante para a produção do cacaeiro (EVANS, 1980) e do cupuaçuzeiro (ALVES; RESENDE, 2008). Um exemplo marcante da devastação causada pela vassoura-de-bruxa ocorreu no Brasil, que foi um dos maiores exportadores de cacau no final da década de 1980 (CARVALHO et al. 2020).

A introdução da doença em sua principal área produtora (o estado da Bahia) em 1989 diminuiu a produção em 70%, tornando o país importador do líquido da amêndoa do cacau (MORETTI-ALMEIDA et al. 2019; TEIXEIRA et al. 2015). Quase três décadas após o surgimento da Vassoura-de-bruxa na Bahia, a produção brasileira de cacau ainda não se recuperou do impacto significativo e negativo da doença, atingindo em 2013 apenas 65% do que era produzido em 1989 (TEIXEIRA et al. 2015).

A vassoura-de-bruxa é causada pelo fungo basidiomiceto *Moniliophthora pernicioso* que foi originalmente descrito como *Marasmius perniciosus* (Stahel, 1915), e posteriormente transferido para o gênero *Crinipellis* por Singer (1942), com base na

morfologia basidiomática. Recentemente, foi transferido para o gênero de hifomicetos (supostamente assexuado) *Moniliophthora* (SEIFERT et al. 2011), com base em evidências moleculares e não morfológicas (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005). Posteriormente, o diagnóstico genérico de *Moniliophthora* foi ampliado para incluir espécies formadoras de basidiomas (EVANS et al. 2013).

Moniliophthora perniciosa dispõe de um ciclo de vida hemibiotrófico onde inicia seu crescimento nos tecidos vivos do cacau (estágio biotrófico) antes de matar e se alimentar dos tecidos mortos (estágio necrotrófico) (EVANS, 1980). Em comparação com outros fungos hemibiotróficos, *M. perniciosa* apresenta um ciclo atípico. Outros fungos apresentam um estágio biotrófico curto (que dura alguns dias) e assintomático, porém, *M. perniciosa* estabelece uma interação longa que dura de um a três meses e é responsável pelas principais características da doença. Os sintomas incluem hiperplasia e hipertrofia dos tecidos infectados, perda de dominância apical e proliferação de ramos axilares (TEIXEIRA et al., 2015). Eventualmente, a vassoura verde torna-se necrótica e morre, e após períodos alternados de chuva e seca, as vassouras secas produzem os basidiomas, completando o ciclo de vida do fungo (ALMEIDA et al., 1997) (Figura 1). Esses estágios da doença descrita para cacau também são encontrados quando plantas de cupuaçu estão infectadas por *M. perniciosa* (ALVES et al. 2009).

Atualmente os métodos de controle da doença se baseiam em manutenção cultural (ARMENGOT et al. 2020; MEDEIROS et al. 2010; MORTIMER et al. 2018; NIETHER et al. 2018; TIRADO-GALLEGO et al. 2016), Sistemas de Produção Agroflorestal (SAFs) (ARMENGOT et al. 2020; MORTIMER et al. 2018; NIETHER et al. 2018, controle químico (BARSOTTINI et al. 2019; MEDEIROS et al. 2010; MORETTI-ALMEIDA et al. 2019; TIRADO- GALLEGO et al. 2016), controle biológico (HOOPEN; KRAUSS 2016; MEDEIROS et al. 2010; VÁSQUEZ et al. 2018), melhoramento genético (AHNERT et al. 2018; EVANS 2016) e manutenção integrada (ARMENGOT et al. 2020; EVANS 2016); ten HOOPEN; KRAUSS 2016; VÁSQUEZ et al. 2018).

Apesar de apresentar um estilo de vida patogênico, *M. perniciosa* pertence à família Marasmiaceae, que é conhecida por suas espécies predominantemente saprotróficas (Figura 2). Curiosamente, a espécie mais próxima de *M. perniciosa* evolutivamente, *M. roreri*, também é um patógeno do cacau que infecta exclusivamente os frutos do hospedeiro. O gênero *Moniliophthora* também inclui um endófito de grama

que foi isolado no Novo México, sugerindo que o estilo de vida patogênico deste grupo pode ter evoluído de um ancestral biotrófico (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005). Mais recentemente, um saprotrófico da espécie *Moniliophthora*, denominada *M. canescens*, foi isolada na Ásia (KEREKES et al. 2009).

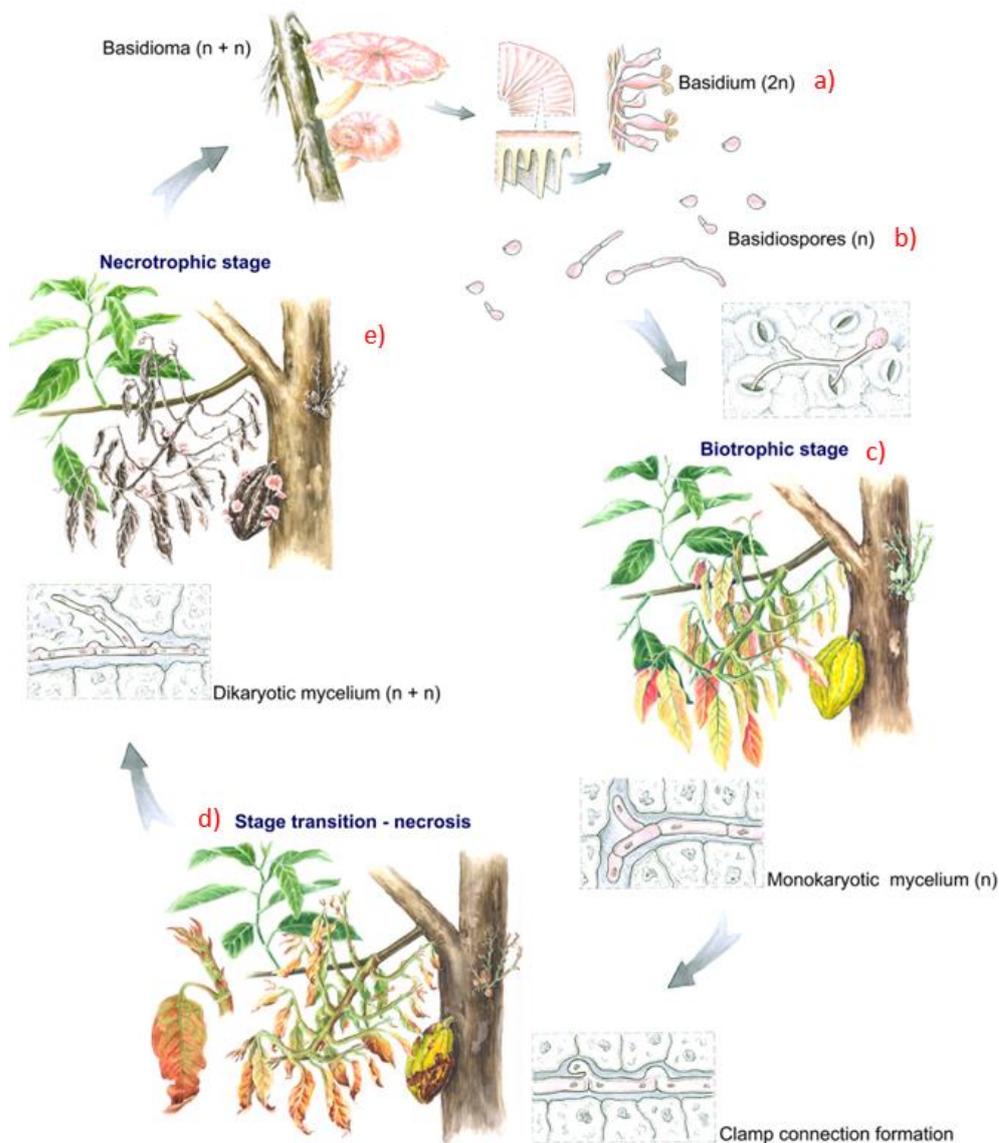


Figura 1. Ciclo de vida da *Moniliophthora perniciosa* em *Theobroma cacao*. a) A infecção começa quando os basidiósporos fúngicos penetram na planta através dos tecidos meristemáticos ativos (EVANS,1978). b) No primeiro estágio da doença, *M. perniciosa* se desenvolve como um micélio monocariótico inchado que cresce exclusivamente no espaço extracelular do tecido de planta viva. c) A infecção dos brotos induz alterações morfológicas drásticas, resultando na estrutura característico de "vassoura verde", embora a infecção possa também ocorrer em outros tecidos (frutas e flores). d) Após um a três meses de infecção biotrófica, ocorre necrose do tecido vegetal, dando origem ao "ressecamento" da estrutura da vassoura. O tecido necrótico é colonizado intracelularmente por micélio dicariótico fino, que é

caracterizado pela presença de conexões de grampo – uma estrutura cruzada formada por células hifais que garante a presença de dois núcleos em cada célula fúngica. e) Após alternar os períodos chuvoso e seco, os basidiomas são formados a partir de hifas necrotróficas, completando o ciclo de vida do patógeno. Ilustrações de Diana Carneiro (TEIXEIRA et al. 2015).

Além do cacau, *M. pernicioso* é encontrado em associação com outras espécies de plantas do gênero *Theobroma* e em plantas de famílias não relacionadas, como Solanaceae. Com base nisso, *M. pernicioso* é classificada em três biótipos de acordo com a especificidade do hospedeiro: o **biótipo C** infecta plantas da família Malvaceae (por exemplo, cupuaçuzeiro), o **biótipo S** infecta membros da família Solanaceae (por exemplo, plantas de tomate), e o **biótipo L** é encontrado em associação com membros da família Bignoniaceae (por exemplo, lianas), o **biótipo B** infecta *Bixa orellana*, um membro da família Bixaceae (Bastos & Anderbrhan, 1986) e o **biótipo H** representa *M. pernicioso* que infecta membros da família Malpighiaceae (RESENDE et al., 2000; BASTOS; EVANS, 1985; GRIFFITH; HEDGER, 1994; HEDGER, 1987)

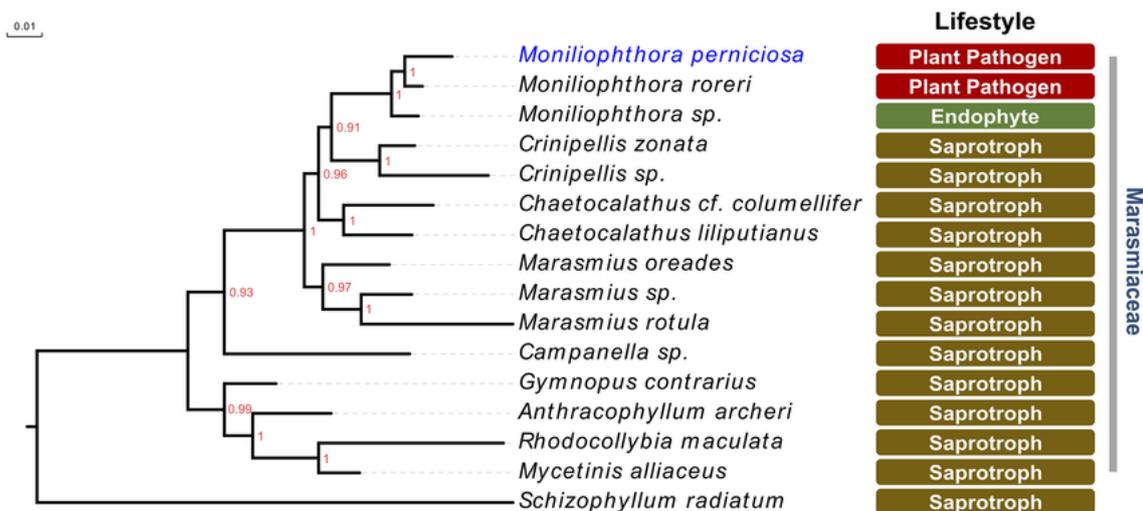


Figura 2. Cladograma *Moniliophthora pernicioso*. O estilo de vida patogênico de *M. pernicioso* é uma exceção dentro da família Marasmiaceae de basidiomicetos, que é composta principalmente de serapilheira saprotrófica e fungos de decomposição de madeira. O gênero *Moniliophthora* inclui as espécies irmãs hemibiotróficas *M. pernicioso* e *M. roreri*, os dois principais patógenos de *Theobroma cacao* e *T. grandiflorum*. Notavelmente, também engloba um endófito de grama ainda mal caracterizado, sugerindo que o estilo de vida patogênico de *M. pernicioso* pode ter evoluído de um ancestral endófito. A árvore foi construída com base na inferência bayesiana usando regiões dos genes 25S, 18S, ITS / 5.8S e Rbp1 (grande fragmento da RNA polimerase II). As sequências foram recuperadas de Aime & Phillips-Mora (2005) e Matheny et al. (2006). Os números próximos aos ramos representam as probabilidades posteriores (TEIXEIRA et al. 2015).

3. Endófitos no controle biológico

Endófitos foram descritos pela primeira vez por Bary (1866) quem primeiro delineou a diferença entre eles e os patógenos de plantas. Recentemente foram definidos como sendo todo microrganismo capaz de colonizar internamente os tecidos da planta hospedeira, sem causar danos aparentes ou estruturas externas visíveis (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007; FERREIRA et al. 2018) ocupando espaços inter e intracelulares (GARCIA, 2012; FELBER, 2016). Essa definição foi ampliada dividindo os endófitos em dois tipos: tipo I, os que não produzem estruturas externas à planta; e tipo II, os que produzem estruturas externas à planta, como fungos micorrízicos e bactérias simbiotes fixadoras de nitrogênio (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007).

Os benefícios que os endófitos conferem aos seus hospedeiros são diversos: contribuem ou são responsáveis pela adaptação das plantas ao estresse biótico e abiótico, aumentando a resistência à seca e escassez de água, bem como a tolerância à alta temperatura e alta salinidade (MÁRQUEZ et al. 2007; RODRIGUEZ et al. 2008), produzem compostos antimicrobianos que protegem a planta contra o ataque de fitopatógenos (BUSBY et al. 2015; CHRISTIAN et al. 2019; COMPANT et al. 2005) incluindo competição de nutrientes ou com a produção de toxinas prejudiciais aos patógenos (HAZARIKA et al. 2019), moldando perfis fitoquímicos (KUSARI et al. 2012; PANACCIONE et al. 2014), e mediando a expressão de características funcionais da planta (HARRISON; GRIFFIN, 2020). Em troca, as plantas fornecem estrutura espacial, nutrientes e proteção contra dessecação (ALY et al. 2011; HEYDARI; PESSARAKLI, 2010).

O controle biológico se tornou alvo do campo científico no século XIX com o desenvolvimento da entomologia e o conhecimento sobre parasitas-predadores-patógenos, onde o primeiro experimento de sucesso do controle biológico foi na Califórnia, em 1880, com o controle da cochonilha australiana (*Icerya purchasi*) pelo predador *Rodolia cardinalis* em Citrus (PARRA et al. 2002; NARANJO; ELLSWOETH; FRISVOLD, 2015).

Em 1919, o termo controle biológico foi evidenciado para designar a inserção de inimigos naturais para controle de insetos-pragas das plantações, posteriormente, o termo foi ampliado para também contemplar outros grupos de organismos fitopatogênicos e seus inimigos naturais, os antagonistas (SMITH, 1919; LARA 2013). Gutiérrez-Ramírez et al. (2013) ressaltam o controle biológico como uma ferramenta de manejo integrado de

pragas importante para a preservação ambiental e segurança alimentar. O biocontrole também pode ser entendido como a chave para diminuir os custos dos problemas fitossanitários da lavoura e paralelamente proteger os recursos naturais (NARANJO; ELLSWOETH; FRISVOLD, 2015).

O controle biológico se integra ao campo e à pesquisa se tornando uma alternativa sustentável e potencialmente mais rentável ao produtor, quando comparado à utilização dos agroquímicos, sanando os problemas fitossanitários das plantações e oferecendo melhores condições de cultivo (RASHAD; MOUSSA, 2020). Nesse sistema, a doença não é só a interação entre patógeno e hospedeiro, mas o resultado da interação entre patógeno, hospedeiro e uma série de microrganismos não patogênicos que também repousam no sítio de infecção (SOLINO et al. 2017; BETTIOL, 1991).

Geralmente, as plantas possuem uma microbiota endofítica que é importante para sua saúde e manutenção, e que ainda não foram explorados (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007; OLIVEIRA et al. 2019). Apesar da imensa quantidade de espécies de plantas superiores existente, e o conhecimento de que cada planta individual, é hospedeira de um ou mais endófitos (ROSA et al. 2012) poucas espécies de plantas foram estudadas em relação à sua biologia endofítica (VAZ et al. 2014). Há alguns trabalhos realizados com endófitos baseados em estudos de diversidade, enquanto outros relatam suas aplicações biotecnológicas (NISA et al. 2015).

Dentre os agentes antagonistas, os microrganismos representam fontes importantes para investigações por atuarem na proteção, promoção de crescimento vegetal, além de apresentarem modos de ação contra os patógenos como: parasitismo, hiperparasitismo e micoparasitismo, competição, antibiose e indução de resistência contra fitopatógenos (MACHADO et al. 2012; ISAIAS et al. 2014). Esses microrganismos podem limitar ou aumentar a atividade do patógeno ou ocasionar a resistência do hospedeiro (VIMALA; SURIACHANDRASELVAN, 2009; THAKUR; SOHAL, 2013).

A relação endófito-hospedeiro é mediada por várias etapas fisiológicas bem evoluídas e caracteriza-se por um equilíbrio entre a virulência do microrganismo e os mecanismos de defesa da planta. Se esse equilíbrio for perturbado, pode acarretar a diminuição das defesas da planta ou um aumento na virulência do fungo, desenvolvendo-se assim uma patogenia (SCHULZ et al. 2002). Durante a infecção endofítica os metabólitos específicos de plantas são ativados, desempenhando um papel significativo

na colonização e na instauração de interações endofíticas. Essas substâncias não apenas desempenham um papel na defesa e competição, mas também podem ser necessárias para interação específica com o endófito (KHARWAR et al. 2020).

Alguns trabalhos realizados com o controle biológico de *M. pernicioso* demonstram a eficiência desses organismos. Em um estudo conduzido por Oliveira, Assis e Leal (2014), a eficiência média de isolados de *Clonostachys* para o controle de *M. pernicioso* foi de aproximadamente 50%; sendo que, de modo geral, o micoparasitismo parece ter sido o mecanismo mais eficiente de antagonismo no controle biológico. A atividade de controle exercida pelo gênero *Clonostachys* pode ser atribuída à determinada substância produzida(s), ou pela indução da resistência vegetal, impedindo o desenvolvimento da vassoura-de-bruxa do cacau. (BASTOS, 2011; BASTOS, 2012). A espécie *Clonostachys rosea* foi capaz de reduzir a incidência de *M. pernicioso* em até 70% em estudos conduzidos em casa de vegetação (RUBINI et al. 2005).

Três cepas de *Lasiodiplodia theobromae* inibiram o crescimento de *M. roreri* e *M. pernicioso*, tanto no confronto das colônias quanto por seus metabólitos e, adicionalmente, colonizaram o hospedeiro entre 80-100% das vezes (VASQUEZ et al. 2018).

Apesar da aplicabilidade de *Trichoderma* no controle biológico, há poucas formulações à base desse microrganismo devidamente registradas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) no Brasil. Um exemplo, é o biofungicida Tricovab® desenvolvido pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC). Obtido a partir do fungo *Trichoderma stromaticum*, é comprovadamente eficaz quando diluído em água e pulverizado na plantação de cacau, sendo capaz de inibir a reprodução do fungo da vassoura-de-bruxa em até 99% no solo e em cerca de 57% na copa de cacau (CEPLAC, 2012).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIME M.C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frost rot of cocoa (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycology**, v. 97, no. 5, p. 1012-1022, 2005.
- ALMEIDA, O. C. et al. Survival of *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer on dried brooms of cacao (*Theobroma cacao* L.) in the State of Bahia. **Agrotropica**, v. 9, n. 1, p. 23-28, 1997.
- ALVERSON W.S et al. Phylogeny of the core Malvales: evidence from ndhF sequence data. **American Journal of Botany**, St. Louis, v.86, p.1474–1486, 1999.
- ALVES, R. M. et al. High levels of genetic divergence and inbreeding in populations of cupuassu, *Theobroma grandiflorum*. **Tree Genetics & Genomes**, St. Louis, v.3, p.289-298, 2007.
- ALVES R. M.; RESENDE M. D. V. Avaliação genética de indivíduos e progênes de cupuaçuzeiro no estado do Para e estimativas de parâmetros genético. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, p. 696-701, 2008.
- ALVES, R. M. et al. Evolução da vassoura-de-bruxa e avaliação da resistência em progênes de cupuaçuzeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, p. 1022-1032, 2009.
- ALVES et al. Diversidade genética em coleções amazônicas de germo-plasma de cupuaçuzeiro [*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.]. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, 818–828, 2013.
- ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 90, n. 6, p. 1829-45, 2011.
- ASLAM, S. et al. Recent advances in molecular techniques for identification of phytopathogenic fungi – a mini review. **Journal of Plant Interactions**, vol. 12, no. 1, p. 493-504, 2017.
- AHNERT, D., MELO.; H.L.; SANTOS, F.F.J.; LIMA, L.R.; BALIGAR, V.C. Melhoramento genético e produtividade do cacauzeiro no Brasil. In: **Junior, J.O.S. (Ed.) Cacau Cultivo, Pesquisa e Inovação**. Ilhéus, Brazil: Editus, pp. 151– 181, 2018.
- ARMENGOT, L., FERRARI, L., MILZ, J., VELÁSQUEZ, F., HOHMANN, P.; SCHNEIDER, M. (2020) Cacao agroforestry systems do not increase pest and disease incidence compared with monocultures under good cultural management practices. **Crop Protection**, 130, 105047.
- AZEVEDO, J. L.; ARAUJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. **Fungi: multifaceted microbes**, 2007.

- BARSOTTINI, M.R.O.; PIRES, B.A.; VIEIRA, M.L.; PEREIRA, J.G.C.; COSTA, P.C.S.; SANITÁ, J. et al. Synthesis and testing of novel alternative oxidase (AOX) inhibitors with antifungal activity against *Moniliophthora perniciosa* (Stahel), the causal agent of witches' broom disease of cocoa, and other phytopathogens. **Pest Management Science**, 75, p. 1295 – 1303, 2019.
- BASTOS C. N.; EVANS, H.C. A new pathotype of *Crinipellis perniciosa* (witches' broom disease) on solanaceous hosts. **Plant Pathology**, v. 34, p. 306–312, 1985.
- BASTOS, C. N. Avaliação do potencial de *Clonostachys sp.* no biocontrole da vassoura-de-bruxa do cacauzeiro. **Agrotropica**, v. 23, n. 2, p. 95-100, 2011.
- BASTOS, C. N. Isolate of *Trichoderma brevicompactum* for the control of cocoa witches' broom disease: preliminary results. **Agrotropica**, v. 24, n. 1, p. 5-10, 2012.
- BENCHIMOL, R. L. Principais doenças do cupuaçuzeiro e recomendações de controle. **Embrapa Amazônia Oriental-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2004.
- BETTIOL, W. Controle Biológico de doenças de plantas. 1. ed. Jaguariuna: **EMBRAPA-CNPDA**, 1991.
- BRASIL. Ministério da Educação. Secretaria de Educação profissional e Tecnológica. **Cartilhas Temáticas – Cupuaçu**. Brasília, 2007.
- BRASIL. **Portaria n.º 372, de 3 de agosto de 2021. Dispõe sobre uma estrutura em relação ao regime do Ministério da Agricultura**. Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 1 (147), pp. 3-5. Seção 1, pt. 3. 2021.
- BUSBY, P.E.; PEAY, K.G.; NEWCOMBE, J. Common foliar fungi of *Populus trichocarpa* modify the severity of *Melampsora* rust. **New Phytologist**, v. 209, no. 4, pg. 1681-1692, 2016.
- BYNG, J. W. et al. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 1, p. 1-20, 2016.
- CARVALHO, J. I. C.; NETO, H. F. S.; PINHEIRO, L. I. F. Da Vassoura de Bruxa à Fazenda de Chocolate: a Reconversão Produtiva no Sul da Bahia. **Desenvolvimento em Questão**, v. 18, n. 53, p. 245-265, 2020.
- CAPOTE, N.; PASTRANA, A. M.; AGUADO A.; SÁNCHEZ-TORRES, P. Moleculares tools for detection of plant pathogenic fungi and fungicide resistance. In: **Cumagun CJR**, ed. *Plant Pathology*. London, UK: InTech, p. 151–202. 2012.
- CEPLAC. **Tricovab**. 2012. Disponível em: <https://revistacultivar.com.br/noticias/mapa-aprova-uso-de-biofungicida-da-ceplac>. Acesso em 08 nov 2021.

CHENG, Y. et al. Molecular diagnosis and pathogenesis of fungal pathogens in bast fiber cultures. **Pathogens**, v. 9, no. 3, p. 223, 2020.

CHRISTIAN, N.; HERRE, E. A.; CLAY, K. Leaf endophytic fungi alter nitrogen uptake and distribution patterns in *Theobroma cacao*. **New Phytologist**, v. 222, no. 3, p. 1573-1583, 2019.

COMPANT, S. et al. Use of plant growth-promoting bacteria for the biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action and future perspectives. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 71, no. 9, p. 4951-4959, 2005.

CUATRECASAS, J. A. Cocoa and its aliies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. **Contributions from the United States National Herbarium**, v.35, n.6, p.32-46, 1964.

DA SILVA MOTA, Luciana Serra; DA ROCHA SERUFFO, Heloísa Helena; DA ROCHA, Carlos Alberto Machado. Prospecção Tecnológica de *Theobroma grandiflorum*: mapeamento de tecnologias geradas a partir do Cupuaçu. **Cadernos de Prospecção**, v. 13, n. 3, p. 733, 2020.

DE SOUZA, N. T. et al. Elaboração e caracterização de sobremesa láctea adicionada de babaçu e cupuaçu. In: VERRUCK S. **Avanços em ciência e tecnologia de alimentos** – Piracicaba: Editora Científica digital, v. 4. 2020, p 520.

DIAS, U. D. M. et al. Desenvolvimento e avaliação das características físico-químicas e da aceitação sensorial de doce em massa de cupuaçu. B. **CEPPA**, v. 36, n. 1, jan./jun. 2019.

EVANS, H. C. Cocoa Witch's Broom (*Crinipellis perniciososa*) in Ecuador. **Annals of Applied Biology**, vol. 89, no. 2, p. 185-192, 1978.

EVANS H. C. Pleomorphism in *Crinipellis perniciososa*, causal agent of witches' broom disease of cocoa. **Transactions of the British Mycological Society**, v.74, p.515–523, 1980.

EVANS, H. C. Witches' broom disease (*Moniliophthora perniciososa*): History and biology. in: **Cacao Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters**. B. A. Bailey and L. W. Meinhardt, eds. Springer, Cham. 2016b, p. 137.

EVANS, H.C.; BEZERRA, J.L.; BARRETO, R. W. Of mushrooms and chocolatiers: etiology and phylogeny of witches' broom and frozen pods of cocoa. *plant pathology*, vol. 62, p. 728 – 740, 2013.

FELBER, A.C. et al. Bioprospection of leaf endophytic fungi of *Vitis labrusca* Linnaeus, Bordô and Concord cv. **Annals of Microbiology**, vol. 66, no. 2, p. 765-775, 2016

FERREIRA, E. M. S. et al. Verificação da produção de substâncias antimicrobianas por fungos endofíticos associados à Soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Revista Cereus**, v. 10, n. 3, p. 92-102, 2018.

FIETZ, V. R.; SALGADO, M. S. Efeito da pectina e da celulose nos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos em ratos hiperlipidêmicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 3, p. 318-321, 1999.

HARIHARAN, G.; PRASNNATH, K. Recent advances in the molecular diagnosis of fungal phytopathogens: a mini review. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 829, 2021. GARCIA, A. et al. Diversidade de fungos endofíticos foliares da planta medicinal *Sapindus saponaria* L. e sua localização por microscopia eletrônica de varredura. **Pesquisa Biológica**, v. 45, n. 2, pág. 139-148, 2012.

GENOVESE, M. I.; LANNES, S. C. S. Comparação do conteúdo fenólico total e capacidade antirradicalar de pós e "chocolates" de cacau e cupuaçu. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, pág. 810-814, 2009.

GERGERICH, R. C.; DOLJA, V. V. Introdução aos vírus de plantas, o inimigo invisível. **O instrutor de fitossanidade**, v. 478, 2006.

GONDIM, TM de S. et al. Aspectos da produção de cupuaçu. **Embrapa Acre-Documentos (INFOTECA-E)**, 2001.

GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. Spatial distribution of mycelia of the liana (L-) biotype of the agaric *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer in tropical forest. **New Phytologist**, v.127, p. 243–259, 1994.

GUTIÉRREZ-RAMÍREZ, A. et al. Control biológico como herramienta sustentable en el manejo de plagas y su uso en el estado de Nayarit, México. **Revista BioCiencias**, v. 2, n. 3, p. 102-112, 2013.

HARRISON, J. G.; GRIFFIN, E. A. The diversity and distribution of endophytes across biomes, plant phylogeny, and host tissues-how far have we come and where do we go from here? **Environmental Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 2107-2123, 2020.

HAZARIKA, D.J. et al. Biocontrol Activity mediated by endophytic *Bacillus subtilis* Lipopeptides against fungal phytopathogens. **BMC microbiology**, v. 19, no. 1, p. 1-13, 2019.

HEDGER, J.N.; PICKERING, V.; ARAGUNDI, J. Variability of populations of the witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis pernicioso*). **Transactions of the British Mycological Society** p. 88, p. 533–546, 1987.

HEYDARI, A.; PESSARAKLI, M. A review on the biological control of fungal phytopathogens using microbial antagonists. **Journal of biological sciences**, v. 10, no. 4, p. 273-290, 2010.

HOMMA, A. K. O.; CARVALHO, R. A.; DE MENEZES, A. J. E. A. Extrativismo e plantio racional de cupuaçuzeiros no sudeste paraense: transição inevitável. **Embrapa Amazônia Oriental-Documentos (INFOTECA-E)**, 2001.

ten HOOPEN, G.M.; KRAUSS, U. (2016) Biological control of cacao diseases. In: Bailey, B.A.; Meinhardt, L.W. (Eds.) Cacao diseases: a history of old enemies and new encounters. Cham, Switzerland: **Springer**, p p. 511– 566.

IBGE/LSPA/GCEA - Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola** / Grupo de Coordenação de Estatísticas Agropecuárias. Rondônia, 2019. Disponível em: <http://www.odr.ro.gov.br>. Acesso em: 19 mar. 2022.

ISAIAS, C. O. et al. Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma spp.* contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. **Summa Phytopathologica**, v. 40, p. 34-41, 2014.

KEREKES, J. et al. Uma monografia dos gêneros *Crinipellis* e *Moniliophthora* do Sudeste Asiático, incluindo uma filogenia molecular da região nrITS. **Diversidade Fúngica**, v. 37, n. 101, pág. e152, 2009.

KHARWAR, R.N. et al. Harnessing the herbal treasures of the ancient medicinal plant *Azadirachta indica* (Neem) and associated endophytic microorganisms. **Medical Plant**, v. 86, no. 13/14, p. 906-940, 2020.

KULARATNE, H.A.G.C. et al. A specific PCR and RFLP primer assay for the rapid detection and differentiation in plant of some *Mycosphaerella* species associated with *Eucalyptus globulus* foliar diseases. **Mycological Research**, vol. 108, no. 12, p. 1476-1493, 2004.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chemistry and Biology**, v.19, p.7, p.792-798, 2012.

LARA, A. P. S. S. **Expressão heteróloga da toxina Cry 11Aa de *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1919) var. israelensis em *Escherichia coli* (Escherich, 1885), visando o controle biológico.** Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 103 f. 2013.

LIMA, M. I. P. M.; SOUZA, A. Diagnose das principais doenças do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.) e seu controle. **Embrapa Amazônia Ocidental-Documentos (INFOTECA-E)**. 1998.

LUCHI, N. et al. Rapid detection of *Ceratocystis platani* inoculum by real-time quantitative PCR assay. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 79, no. 17, p. 5394-5404, 2013.

LUCHI, N.; IOOS, R.; SANTIN, A. Fast and reliable molecular methods to detect fungal pathogens in woody plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 104, no. 6, p. 2453-2468, 2020

MACHADO, D. F. M. et al. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 274–288, 2012.

MÁRQUEZ, L. M. et al. Um vírus em um fungo em uma planta: simbiose de três vias necessária para tolerância térmica. **Ciência**, v. 315, n. 5811, pág. 513-515, 2007.

MARTINS, V. B. **Perfil sensorial de suco tropical de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum)**. 2008. 366 f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

MCCARTNEY, H. A. et al. Molecular diagnosis of fungal plant pathogens. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 59, no. 2, p. 129-142, 2003.

MEDEIROS, F. et al. A novel, integrated method for management of witches' broom disease in cacao in Bahia, **Brazil. Crop Protection**, 29, 704 – 711, 2010.

MIDORIKAWA, G.E.O; MILLER, R.N.G; BITTENCOURT, D. M. C. Identification and molecular detection of mycotoxigenic fungi of food and food origin. **Molecular Techniques in Food Biology: Safety, Biotechnology, Authenticity and Traceability**, p. 385-407, 2018.

MIGLIORINI, D. et al. The potential of symptomless potted plants for carrying invasive soilborne plant pathogens. **Diversity and Distributions**, v. 21, n. 10, p. 1218-1229, 2015.

MORETTI- ALMEIDA, G. et al. Heterologous expression of an alternative oxidase from *Moniliophthora perniciosa* in *Saccharomyces cerevisiae*: antioxidant function and in vivo platform for the study of new drugs against witches' broom disease. **Fungal Genetics and Biology**, v. 126, p. 50– 5, 2019.

MORTIMER, R.; SAJ, S.; DAVID, C. (2018) Supporting and regulating ecosystem services in cacao agroforestry systems. **Agroforestry Systems**, v. 92, p. 1639– 1657.

NARANJO, S. E.; ELLSWORTH, P. C.; FRISVOLD, G. B. Economic value of biological control in integrated pest management of managed plant systems. **Annual Review of Entomology**, v. 60, n. 1, p. 621–645, 2015.

NEZHAD, A. S. Future of portable devices for the diagnosis of phytopathogens. **Laboratory. sheet** v. 14, p. 2887-2904, 2014.

NISA, H.; KAMILI, A. N.; NAWCHOO, I. A.; SHAFI, S.; SHAMEEM, N.; BANDH, A. A. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. **Microbial Pathogenesis**, v. 82, p. 50-59

OLIVEIRA, T. B.; GENOVESE, M. I. Composição química dos licores de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e torcacau (*Theobroma cacao*) e seus efeitos em ratos

diabéticos induzidos por estreptozotocina. **Food Research International**, v. 51, n.2, p. 929-935, 2013.

OLIVEIRA, S. A. B. et al. Compostos voláteis de fungos conidiais sapróbios da Amazônia Meridional no controle in vitro de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, v. 45, p. 302-307, 2019.

OLIVEIRA, M. M.; ASSIS, F. G. V.; LEAL, P. L. Eficiência de fungos filamentosos no controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacauero. **Revista Sitientibus - Série Ciências Biológicas**, v, 14, p. 1-7, 2014.

PANACCIONE, D. G.; BEAULIEU, W. T.; COOK, D. Bioactive alkaloids in vertically transmitted fungal endophytes. **Functional Ecology**, v.28, n. 2, p. 299-314, 2014.

PARRA, J. R. P. **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. Editora Manole Ltda, 2002.

PARRA, Dercy et al. Avances en las investigaciones venezolanas sobre enfermedades del cacao. **Revista de Estudios Transdisciplinarios**, v. 1, n. 2, pág. 56-75, 2009.

PÉREZ-VICENTE, L. *Moniliophthora roreri* HC Evans et al. y *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime: impacto, síntomas, diagnóstico, epidemiología y manejo. **Revista de protección vegetal**, v. 33, n. 1, p. 00-00, 2018.

PEREIRA, A. L. F.; ABREU, V. K. G; RODRIGUES, S. Cupuassu - *Theobroma grandiflorum*. In: RODRIGUES, S.; SILVA, E. O.; BRITO, E. S. **Exotic fruits**. London: Academic Press, 2018. p. 159-162.

PISKUR B, OGRIS N, JURC D. Species-specific primers for *Eutypella parasitica*, the causal agent of *Eutypella* canker of the maple. **Plant Disease**, vol. 91, p. 1579-1584, 2007.

RASHAD, Y. M.; MOUSSA, T. A. A. Biocontrol agents for the management of plant fungal diseases. In: **Home industry of biocontrol agents and their applications**. Springer, Cham, 2020. p. 337-363.

RODRIGUEZ, R. J. et al. Tolerância ao estresse em plantas via simbiose adaptada ao habitat. **A revista ISME**, v. 2, n. 4, pág. 404-416, 2008.

ROLLINS, L. et al. Comparison of five methods of detection and quantification of *Phytophthora ramorum* in stream and irrigation water. **Plant Disease**, vol. 100, no. 6, p. 1202-1211, 2016.

ROSA, L.H. et al. Antifungal activity of extracts of endophytic fungi associated with *Smallanthus maintained* in vitro as autotrophic cultures and as potted plants in a greenhouse. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 58, no. 10, p. 1202-1211, 2012.

RUBINI, M. R. et al. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease. **International Journal of Biological Science**, v. 1, n.1 1, p. 24-33, 2005.

SCHAKER, P. D. C. et al. Transcriptional profile of RNAseq after whiplash development in sugarcane smut. **PLoS One**, vol. 11, no. 9, p. e0162237, 2016.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; ROMMERT, A. K.; KRHON, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.

SEDAP. Secretaria de Estado de Desenvolvimento e Pesca. Governo do Estado do Pará. **Cupuaçu**. Disponível em: <http://www.sedap.pa.gov.br/content/cupua%C3%A7u>. Acesso em 08 Nov 2021.

SEIFERT, G. MORGAN-JONES, W. GAMS, B. KENDRICK. Os Gêneros de Hifomicetos. **CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center**, v. 9, p. 1-997, 2011.

SHARMA, P.; SHARMA, S. Paradigm shift in plant disease diagnosis: a journey from conventional diagnosis to nanodiagnosis. **In: Current trends in plant disease diagnosis and management practices**. Springer, p. 237-264, 2016.

SILVA, C. R. S. et al. Understanding the genetic diversity, spatial genetic structure and mating system at the hierarchical levels of fruits and individuals of a continuous *Theobroma cacao* population from the Brazilian Amazon. **Heredity**, v. 106, n. 4, p. 973-985, 2011.

SILVA, A. S. S.; FARIAS, L. F. Elaboração da farinha à base da amêndoa do cupuaçu *Theobroma grandiflorum* Schum. **Revista Arquivos Científicos (IMMES)**, v.1, n. 1, p.36-42, 2018.

SINGER, R. A monographic study of the genera *Crinipellis* and *Chaetocalathus*. **Lilloa**, v. 8, p. 441-534, 1942.

SMITH, H. S. On Some Phases of Insect Control by the Biological Method. **Journal of Economic Entomology**, v. 12, n. 4, p. 288–292, 1919.

SOLINO, A. J. S. et al. Potencial antagonista e controle in vitro de *Alternaria solani* por fungos sapróbios. **Summa Phytopathologica**, v. 43, p. 199-204, 2017.

SOUZA, A. G. C. et al. The cupuaçuzeiro genetic improvement program at Embrapa Amazônia Ocidental. **Crop Breeding And Applied Biotechnology**, v.2, n.3, p.471-478, 2002.

DE SOUZA, M. G. et al. Doenças do cupuaçuzeiro. **Embrapa Amazônia Ocidental-Fôlder/Folheto/Cartilha (INFOTECA-E)**, 2014.

STAHEL, G. *Marasmius perniciosus* nov. spec.: a causa da doença do krulloten do cacau no Suriname [Traduzido do alemão por AMW Ter Laag]. **Boletim do Departamento Landbouw**, v. 33, p. 5-25, 1915.

TAN, D.H.S. et al. Disseminated fungal infection in a kidney transplant recipient involving *Macrophomina phaseolina* and *Scytalidium dimidiatum*: case report and review of taxonomic changes among medically important members of Botryosphaeriaceae. **Medical Mycology**, vol. 46, no. 3, p. 285-292, 2008.

TEIXEIRA, P.J.P.L.; THOMAZELLA, D.P.T.; PEREIRA, G. A. G. Chocolate hour: current understanding and new perspectives in cocoa witches' broom research. **PLoS Pathogens**, v. 11, no. 10, p. e1005130, 2015.

TEIXEIRA, P.J.P.L. et al. High resolution transcriptional profile of the atypical biotrophic interaction between *Theobroma cacao* and the fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa*. **The Plant Cell**, v. 26, no. 11, p. 4245-4269, 2014.

TEIXEIRA, G. L. et al. O impacto de tensoativos de polioxietileno sorbitano na microestrutura e comportamento reológico de emulsões elaboradas com gordura fundida de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 19, n. 4, pág. 725-738, 2016.

TEIXEIRA, G. L. et al. The impact of polyoxyethylene sorbitan surfactants on the microstructure and rheological behavior of emulsions made with Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) melted fat. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 19, no. 4, p. 725-738, 2016.

THAKUR, M.; SOHAL, B. S. Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. **International Academic Research Notices**, v. 2013, 2013.

TIRADO- GALLEGO, P.A.; LOPERA- ÁLVAREZ, A.; RÍOS- OSORIO, L.A. (2016) Estrategias de control de *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* en *Theobroma cacao* L.: revisión sistemática. **Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, 17, p. 417– 430.

TÖR M., WOODS-TÖR A. “Fungal Diseases and Oomycetes”, in the Encyclopedia of Applied Plant Sciences. Eds. Thomas B., Murray BG, Murphy DJ. **Academic Press**, p. 77-82, 2017.

VAZ, A. B. M. et al. Fungal endophyte β -diversity associated with Myrtaceae species in an Andean Patagonian forest (Argentina) and an Atlantic forest (Brazil). **Fungal ecology**, v. 8, p. 28-36, 2014.

VÁSQUEZ, M. V et al. Hongos endófitos foliares como candidatos a biocontroladores contra *Moniliophthora spp.* de *Theobroma cacao* (Malvaceae) en Ecuador. **Acta Biológica Colombiana**, v. 23, n. 3, p. 235-241, 2018.

VIMALA, R.; SURIACHANDRASELVAN, M. Resistance induced in bhendi against powdery mildew by foliar application of salicylic acid. **Journal of Biopesticides**, v. 2, no. 1, p. 111-114, 2009.

WANG, Q.H. et al. The response strategies of *Colletotrichum gloeosporioides* to stress caused by the biological control agent *Bacillus amyloliquefaciens* deciphered by transcriptome analysis. **Biological Control**, vol. 150, p. 104372, 2020.

YAZAWA, T.; KAWAHIGASHI, H.; MATSUMOTO, T.; MIZUNO, H. Simultaneous transcriptome analysis of Sorghum and *Bipolaris sorghicola* by using RNA-seq in combination with de novo transcriptome assembly. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e62460, 2013.

CAPÍTULO I

MICROORGANISMOS DA AMAZÔNIA BIOCONTROLADORES DE DOENÇAS DE PLANTAS: UMA REVISÃO

JUSLEY S SANTOS ¹, LARYSSA S PRADO¹, LEILA P PETERS ²

1. Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia (CITA), Rodovia BR 364, Km 04 - Distrito Industrial, Rio Branco - AC, 69920-900 Rio Branco, Acre, Brasil -

2. Universidade Federal do Acre. *Centro* de Ciências da *Saúde* e do Desporto. Rodovia BR 364, Km 04 - Distrito Industrial, Rio Branco - AC, 69920-900 Rio Branco, Acre, Brasil -

RESUMO

Microrganismos patogênicos são um dos principais agentes causadores de doenças de plantas infectando diversas regiões e sendo responsáveis por inúmeros prejuízos as culturas. Com a necessidade de alternativas de controle e manutenção dessas doenças por pesticidas químicos, a biotecnologia microbiana surge contribuindo para a agricultura de maneira sustentável e eficiente. Fungos e bactérias possuem mecanismos que inibem o crescimento de outro microrganismo patogênico que convive no mesmo nicho ecológico. A Amazônia por sua biodiversidade se configura como um berço para novos achados de microrganismos com potencial biocontrolador. Portanto, nessa revisão reunimos estudos que relatam e descrevem a atividade de microrganismos controladores isolados na Amazônia Legal. Foram feitas buscas em bases de pesquisa utilizando os seguintes buscadores: “Microorganisms biocontrol agente phytopatogen Amazon” Biocontrol agente phytopatogen in Amazon”, “Fungal/Bacteria biocontrol agente of phytopatogen in Amazonia”. Identificamos que gênero de fungo mais utilizado para controle biológico na Amazônia foi *Trichoderma* sp. e de bactéria foi *Bacillus* sp. Os fitopatógenos mais combatidos foram *Fusarium* sp., *Corynespora cassiicola*, *Colletotrichum* sp. e *Rhizoctonia solani*. Além dos hospedeiros destes microrganismos que foram *Paullinia cupana*, *Theobroma cacao* e *Hevea brasiliensis*. Os microrganismos testados apresentaram altas taxas de controle e variedades de mecanismos. Espera-se que este trabalho contribua com o panorama do cenário atual na Amazônia.

Palavras-chave

Controle biológico; Antagonismo; Enzimático; *Trichoderma* sp.

ABSTRACT

Pathogenic microorganisms are one of the main agents causing plant diseases, infecting different regions and being responsible for numerous damages to crops. With the need for alternatives to control and maintain these diseases by chemical pesticides, microbial biotechnology emerges, contributing to agriculture in a sustainable and efficient way. Fungi and bacteria have mechanisms that inhibit the growth of another pathogenic microorganism that lives in the same ecological niche. Due to its biodiversity, the Amazon is configured as a cradle for new discoveries of microorganisms with biocontrol potential. Therefore, in this review we gathered studies that report and describe the activity of control microorganisms isolated in the Legal Amazon. Searches were carried out in research bases using the following search engines: “Microorganisms biocontrol agent phytopathogen Amazon” Biocontrol agent phytopathogen in Amazon”, “Fungal/Bacteria biocontrol agent of phytopathogen in Amazonia”. We identified that the genus of fungus most used for biological control in the Amazon was *Trichoderma* sp. and for bacteria was *Bacillus* sp. The phytopathogens most fought were *Fusarium* sp., *Corynespora cassiicola*, *Colletotrichum* sp. and *Rhizoctonia solani*. In addition to the hosts of these microorganisms that were *Paullinia cupana*, *Theobroma cacao* and *Hevea brasiliensis*. The microorganisms tested showed high rates of control and variety of mechanisms. It is hoped that this work will contribute to an overview of the current scenario in the Amazon.

Key words

Biological control; Antagonism; Enzymatic; *Trichoderma* sp.

1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia microbiana contribui para a agricultura sustentável, atenuando o uso de fertilizantes e pesticidas químicos sintéticos (CORTIVO et al., 2017). O controle biológico é um método difundido mundialmente que apoia a agricultura sustentável, reduz os custos de produção e a poluição ambiental. (UMESHA et al., 2018; HESHAM et al. 2021).

As doenças de plantas são causadas por vários microrganismos como bactérias, fungos, nematoides, protozoários e vírus (DE SILVA et al. 2019). Os fungos patogênicos são um dos principais agentes causadores de doenças de plantas, que podem infectar a maioria das partes do vegetal, incluindo raízes, caules, folhas, flores e frutos (HYDE et al., 2009a, HYDE et al., 2009b, HYDE et al., 2014, MANAMGODA et al., 2011, 2014, UDAYANGA et al., 2014). Assim como os fungos, as bactérias são capazes de causar doenças em uma ampla variedade de plantas em todo o mundo (STRANGE E SCOTT, 2005; KANNAN et al., 2015). As bactérias fitopatogênicas, afetam muitas plantas produtoras de alimentos, colonizando sua superfície ou tecidos (KANNAN et al., 2015). Manchas, ferrugem, cancro, podridão tecidual e/ou desequilíbrios hormonais, nanismo, ramificação das raízes e epinastia foliar são sintomas causados por bactérias (STRANGE; SCOTT, 2005; KANNAN et al., 2015).

A microbiota associada a plantas da Amazônia é uma fonte promissora de bioativos (AZEVEDO et al. 2000, 2002; BANHOS et al. 2016). Além disso, as plantas amazônicas hospedam fungos e bactérias que podem contribuir para o desenvolvimento da agricultura, por meio da descoberta de novos microrganismos antagonistas para desenvolvimento de novos produtos biológicos no combate de doenças de plantas (BANHOS et al. 2016).

O controle biológico de doenças de plantas é a supressão de populações de fitopatógenos por organismos vivos (HEIMPEL; MILLS, 2017). A filosfera, a superfície das plantas acima do solo, é um ecossistema complexo onde os microrganismos e a planta hospedeira interagem extensivamente para criar comunidades específicas, porém dinâmicas (LEGEIN et al. 2020). Essas comunidades habitam tanto as superfícies externas (epífitas) quanto os espaços internos (endófitos) e essas comunidades desempenham um papel importante na proteção da planta contra doenças (LEGEIN et al. 2020). Sabe-se também que agentes de controle biológico isolados do solo de várias cepas

controlaram com sucesso doenças transmitidas pelo solo de culturas valiosas causadas por fungos, oomicetos, bactérias e nematóides (NIU et al. 2020).

O objetivo deste trabalho foi realizar um levantamento a fim de apresentar um melhor entendimento sobre os fungos e bactérias da Amazônia utilizados no controle biológico de fitopatógenos. Esse artigo foi subdividido nos tópicos: Fungos controladores de doenças de plantas, Bactérias controladoras de doenças de plantas, Mecanismo de ação dos microrganismos controladores de fitopatógeno e Fonte de microrganismos controladores de fitopatógenos.

2. METODOLOGIA

O estudo foi realizado por meio de levantamento bibliográfico, sendo consultados livros e artigos indexados nas principais bases de pesquisas, como: Science Direct, Web of Science, Jstor e Google Scholar. Para filtragem dos artigos foram utilizados os seguintes buscadores: “Microorganisms biocontrol agent phytopathogen Amazon” Biocontrol agent phytopathogen in Amazon”, “Fungal/Bacteria biocontrol agent of phytopathogen in Amazonia”. Para essa revisão, foram incluídos artigos originais, escritos em português, inglês e espanhol indexados na última década, buscando ser mais atualizada, para assim servir de base para estudos futuros. Além de que os critérios de exclusão incluíam os artigos terem sido publicados antes de 2010, a coleta do microrganismo não ter sido realizada em alguma região da Amazônia e o microrganismo não ter sido testado contra fitopatógenos.

Com base no levantamento bibliográfico e a fim de apresentar um melhor entendimento sobre os fungos e bactérias da Amazônia utilizados na promoção do controle biológico de fitopatógenos, esse artigo foi subdividido nos tópicos: Fungos controladores de doenças de plantas, Bactérias controladoras de doenças de plantas, Mecanismo de ação dos microrganismos controladores de fitopatógeno e Fonte de microrganismos controladores de fitopatógenos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total foram encontrados 2.752 artigos no banco de dados Google Scholar, 04 no Science Direct, 3 no JTOR e 21 no Springer Link. Aplicando os critérios de exclusão foram selecionados um total de 29 artigos publicados de 2010 a 2022 e a com

microorganismos biocontroladores isolados na Amazônia (Figura 1). Todos os trabalhos foram organizados por descritores e banco de dados (Tabela 1).

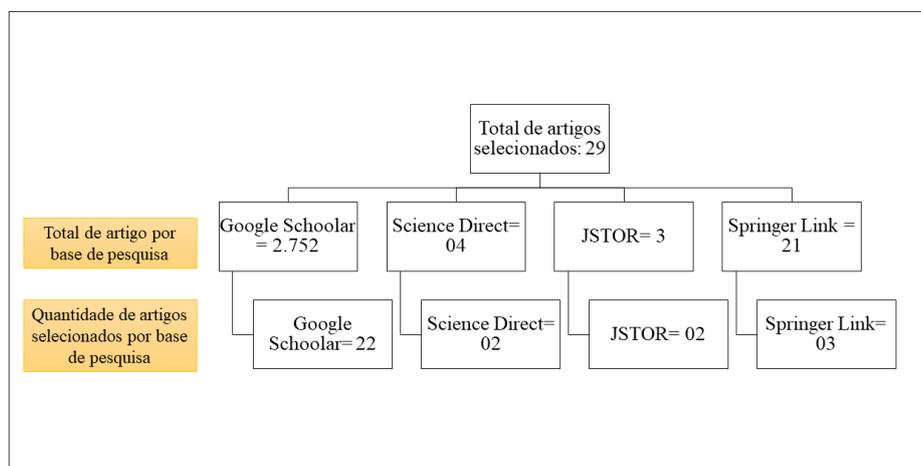


Figura 1. Número total de artigos selecionados para revisão sistemática de estudos com microorganismos para o biocontrole de fitopatógenos na Amazônia.

Tabela 1. Lista de descritores e banco de dados utilizados para busca de estudos utilizando microorganismos para o biocontrole de fitopatógenos na Amazônia.

Descriptor	Google Scholar	Science Direct	JSTOR	Springer Link
Microorganisms' biocontrol agent phytopathogen Amazon	1.320	1	3	11
Biocontrol agente phytopatogen in Amazon	1.340	1	3	10
Fungal/Bacterial biocontrol agents of phytopathogen in Amazonia	92	2	0	0

1. Fungos amazônicos controladores de doenças de plantas

Os fungos são de grande importância agrícola e ecológica, mantendo o equilíbrio do ambiente, decompondo restos vegetais, degradando substâncias tóxicas, auxiliando as plantas a crescerem e se protegerem contra inimigos, como outros microrganismos patogênicos (ABREU et al. 2015). Fungos com propriedades antagônicas constituem uma estratégia de grande interesse e importância para o controle biológico, utilizados como bioprotetores que apresentam ação fungicida e inseticida (BETTIOL, 2009). Estima-se que no mundo há 1.5 milhões de espécies de fungos e que somente 1% tem sido pesquisado quanto ao espectro de produção de metabólitos secundários (WEBER 2007).

Os fungos da ordem Sordariomycetes são bastante testados para controle de fitopatógenos na Amazônia (Figura 1. a). Sordariomycetes é a segunda maior classe de

Ascomycota (KIRK et al. 2008; HYDE et al. 2013). Cosmopolitas, essa classe acomoda principalmente táxons terrestres, embora vários possam ser encontrados em habitats aquáticos (HYDE;WONG, 2000; CAI et al. 2006a; JONES et al. 2009a, b, 2015; PRATIBHA et al. 2014).

Sordariomycetes também são comumente isolados como endófitos de várias plantas (KEIM et al. 2014). Algumas espécies de Sordariomycetes (*Beauveria bassiana*, *Trichoderma viride*, *T. harzianum*) são agentes de biocontrole economicamente importantes (WRAIGHT et al. 1998; KAEWCHAI et al. 2009) e outros produzem uma ampla gama de metabólitos quimicamente diversos importantes para medicamentos e outras biotecnologias industriais (SEMENOVA et al. 2012; DEBBAB et al. 2013; XU et al. 2014; ZIN; BADALUDDIN 2020).

Cerca de 90% dos agentes de biocontrole fúngicos contra microrganismos patogênicos pertencem a diferentes isolados de *Trichoderma* (HERMOSA et al. 2012). Em todo o mundo, atualmente, mais de 60% de biofungicidas eficazes são obtidos a partir desse gênero (ABADIAS, 2019). Na Amazônia, o gênero *Trichoderma* foi o mais testado para controle biológico (Figura 1 a e Tabela 1). Esses fungos são colonizadores rápidos, invasivos, oportunistas, virulentos e apresentam uma relação simbiótica com as plantas (SOOD et al. 2020). Os metabólitos secretados por esses fungos não apenas melhoram o crescimento das plantas, mas também inibem o crescimento de patógenos por meio de vários mecanismos antagonísticos (CONTRERAS-CORNEJO et al. 2015a; CONTRERAS-CORNEJO et al. 2015b).

Na Amazônia, estudos com *Trichoderma* demonstraram controle de fitopatógenos igual ou superior a 50% (Tabela 1, Figura 2. a). Na Colômbia, Smith et al. (2013) testaram os efeitos de diferentes espécies de *Trichoderma* contra o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, sendo que *T. asperellum*, *T. atroviride* e *T. harzianum* demonstraram controle de crescimento maior que 50% em ensaios *in vitro* (Figura 2). Adicionalmente, na Colômbia estudo realizado com importantes fitopatógenos do cacauero (*Theobroma cacao*), *Phytophthora palmivora*, *Moniliophthora roreri*, *Aspergillus flavus* e *Fusarium solani*, demonstrou o efeito de *T. viride* controlando o crescimento desses fitopatógenos *in vitro* em taxas maiores que 50% (Tabela 2) (VILLAMIZAR-GALLARDO et al 2017).

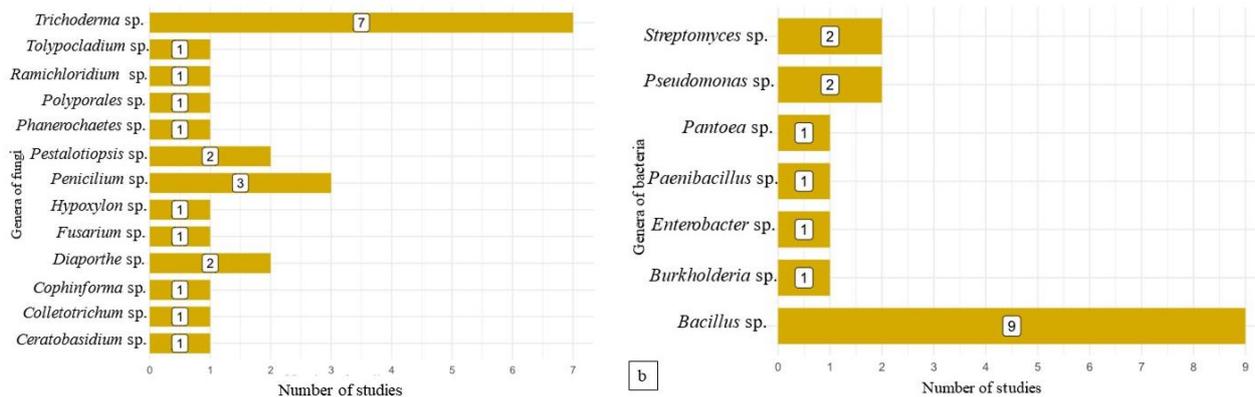


Figura 2. Microrganismos biocontroladores da Amazônia relatados em estudos.

a) Fungos controladores testados contra fitopatógenos na Amazônia. **b)** Bactérias controladores testadas contra fitopatógenos na Amazônia.

Estudos realizados no Peru demonstraram o efeito de *Trichoderma* TE91 (maior que 50%) inibindo o micélio do fitopatógeno *Verticillium dahliae* que afeta a espécie *T. cacao* (LEON-TTACCA et al. 2019) e *T. koningiopsis* LA279 contra *Colletotrichum cassiicola*, agente causal da target spot em *Hevea guianensis*, apresentando taxa de controle de crescimento menor que 30% (RENAUD et al., 2019). Também no Peru, o isolado de *Trichoderma* sp. (CP24-6) obtido do solo rizosférico de *T. cacao* apresentou taxa de controle maior que 50% contra *M. rozeri*, sendo possível verificar os mecanismos de micoparasitismo e antibiose (LEIVA et al. 2020) (Figura 3).

No Brasil, *T. asperellum* foi testado contra o fitopatógeno do arroz *Rhizoctonia solani* apresentando controle de crescimento menor que 50% (DE FRANÇA et al. 2015). Outro estudo realizado com uma nova espécie de *Trichoderma* denominada *T. juruaense* isolado do rio Juruá no estado do Amazonas, apresentou resultados positivos de inibição *in vitro* contra os patógenos *C. siamense* (50%), *C. cassiicola* (43%), *Fusarium decemcellulare* (61%) e *Sclerotium rolfsii* (51%) (GWINNER et al. 2022).

Com alto potencial de biocontrole outro estudo demonstrou ação inibitória contra *P. palmivora*, fitopatógeno do cacaueiro e do cupuaçuzeiro, realizadas pelos fungos endofíticos *Pestalotiopsis* sp., *Curvularia* sp., *Tolypocladium* sp., *Fusarium* sp. (HANADA et al 2010). Com alta taxa de controle para a antracnose no açaí, doença causada pelo fungo *C. gloeosporioides*, se mostraram eficazes os fungos *Ramichloridium* sp., *Clonostachys rosea* e *Penicillium sclerotiorum* (PETERS et al. 2020). Três isolados de *Lasiodiplodia theobromae* apresentaram resultados positivos contra os fitopatógenos

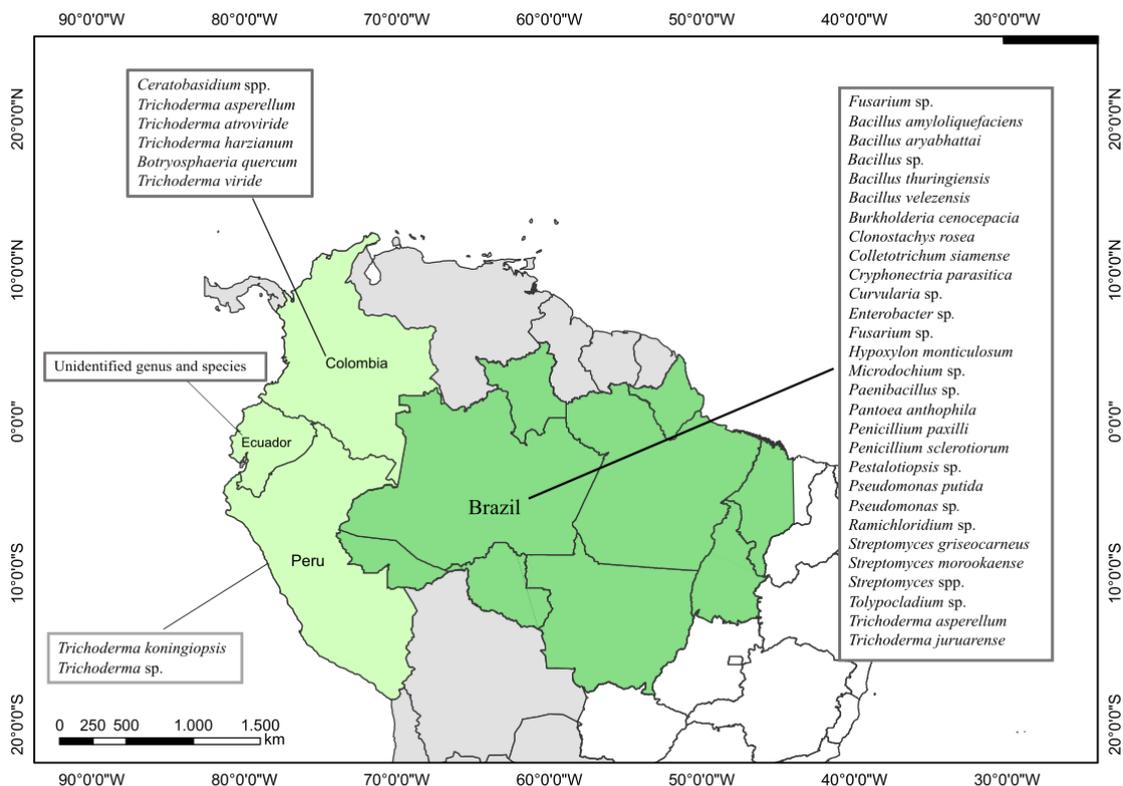


Figura 3. Microrganismos controladores de fitopatógenos da Amazônia relatados nos países Brasil, Colômbia, Equador e Peru

M. pernicioso e *M. roreri*, (VILLAVICENCIO-VASQUEZ et al. 2018). Ainda para o cacaueteiro, o fungo *Botryosphaeria quercum* isolado do solo e do fruto se mostrou eficiente para o biocontrole de alguns fitopatógenos como *P. palmivora*, *M. roreri*, *A. flavus* e *F. solani* agentes causais nos hospedeiros *T. cacao* e *T. grandiflorum* VILLAMIZAR-GALLARDO et al 2017).

Fungos isolados de *Paullinia cupana* foram testados contra diversos fitopatógenos do próprio guaranazeiro como *Colletotrichum* sp., *Ceratocyste padadoxa*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *R. solani* (figura 2. c) (BONATELLI et al. 2016). Os isolados *Fusarium* sp. *Pestalotiopsis* sp. e *Microdochium* sp. apresentaram atividade contra esses fitopatógenos *in vitro*, sendo que *Fusarium* sp. e *Pestalotiopsis* sp. também apresentaram atividade antagonista *in vivo*. Além disso, *Fusarium* sp. e *Pestalotiopsis* sp. produziram quitinasas e compostos voláteis antagônicos, respectivamente (BONATELLI et al. 2016). Também isolado de *P. cupana*, *C. siamense* foi testado contra *C. fructicola* em experimento *in vivo* e foi observado a ativação das vias peroxidase (POX) Fenilalanina

Amônia Liase (PAL) e presença de quitinase como reposta do fungo ao patógeno (CASAS et al. 2021).

Um estudo com *Hevea brasiliensis*, obteve isolados endofíticos *Cophinforma atrovirens*, *Polyporales sp.*, *Phanerochaetes* sp., *Diaporthe sp.*, os quais foram testados contra os fungos *Corynespora cassiicola* e *C. gloeosporioides in vitro*, sendo possível observar atividade enzimática para estes isolados (AMARAL et al. 2022).

Isolados de *Colletotrichum sp.* obtidos do jambu (*Acmella ciliata*) foram avaliados contra *C. gloeosporioides* e *F. decemcellulare* apresentando taxas de controle dos fitopatógenos menor que 50% *in vitro* (ORTIZ-OJEDA, 2020). Na Colômbia, isolados de *Ceratobasidium spp.* foram obtidos de raízes de orquídeas para experimento de controle do fitopatógeno *R. solani* em arroz (*Oryza sativa*), apresentando atividade biocontrole para este agente causal (MOSQUERA-ESPINOSA et al. 2013).

Tabela 2. Fungos endofíticos controladores de fitopatógenos isolados de ambientes e hospedeiros amazônicos.

Autores	Local	Microrganismo	Fitopatogeno	Local do isolamento	Doença	Hospedeiro	Tipo de teste	Taxa de Controle	Mecanismo
Bonatelli et al., 2016.	Brazil	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Colletotrichum sp.</i>	<i>Paullinia cupana</i>	Anthracnose	<i>Paullinia cupana</i>	in vitro	<50%	-
				<i>Paullinia cupana</i>	Black rot	<i>Sugarcan e</i>	in vitro	<50%	-
		<i>Fusarium sp.</i>	<i>padadoxa</i>	<i>Paullinia cupana</i>	Pokka Boheng	<i>Sugarcan e</i>	in vitro	<50%	-
				<i>Paullinia cupana</i>	Fusarium wilt Rhizootonia	<i>Pisum sativum</i>	in vitro	<50%	-
		<i>Fusarium sp.</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Paullinia cupana</i>	Anthracnose	<i>Paullinia cupana</i>	in vitro	<50%	-
				<i>Paullinia cupana</i>	Black rot	<i>Sugarcan e</i>	in vitro	<50%	-
		<i>Pestalotia sp. C3</i>	<i>Colletotrichum sp.</i>	<i>Paullinia cupana</i>	Pokka Boheng	<i>Sugarcan es</i>	in vitro	<50%	-
				<i>Paullinia cupana</i>	Fusarium wilt	<i>Pisum sativum</i>	in vitro	<50%	-

Hanada et al., 2010	Brazil	<i>Pestalotiopsis</i> sp. C3	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Paullinia cupana</i>	Rhizoctonia canker	<i>Phaseolus vulgaris</i>	in vitro	<50%	-
		<i>Microdochium</i> sp.	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Paullinia cupana</i>	Anthracnose	<i>Paullinia cupana</i>	/ in vivo	<50%	-
		<i>Microdochium</i> sp.	<i>Ceratocyta padadoxa</i>	<i>Paullinia cupana</i>	Black rot	<i>Sugarcan e</i>	/ in vivo	<50%	-
		<i>Microdochium</i> sp.	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Paullinia cupana</i>	Pokkahong	<i>Sugarcan e</i>	/ in vivo	<50%	-
		<i>Microdochium</i> sp.	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Paullinia cupana</i>	Fusarium wilt	<i>Pisum sativum</i>	/ in vivo	<50%	-
		<i>Microdochium</i> sp.	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Paullinia cupana</i>	Rhizoctonia canker	<i>Phaseolus vulgaris</i>	/ in vivo	<50%	-
		<i>Pestalotiopsis</i> spp. 2	<i>Phytophthora palmivora</i>	<i>Theobroma grandiflorum</i>	Black-pod rot	<i>Theobroma cacao</i>	/ in vivo	>50%	-
		<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Phytophthora palmivora</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Black-pod rot	<i>Theobroma cacao</i>	/ in vivo	>50%	-
		<i>Curvularia</i> sp.	<i>Phytophthora palmivora</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Black-pod rot	<i>Theobroma cacao</i>	/ in vivo	>50%	-
		<i>Tolypocladium</i> sp.	<i>Phytophthora palmivora</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Black-pod rot	<i>Theobroma cacao</i>	/ in vivo	>50%	-
Peters et al. 2020	Brazil	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Phytophthora palmivora</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Black-pod rot	<i>Theobroma cacao</i>	/ in vivo	>50%	-
		<i>Ramichloridium</i> sp.	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Euterpe precatoria</i>	Anthracnose	<i>Euterpe precatoria</i>	/ in vivo	>50%	-
		<i>Clonostachys rosea</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Euterpe precatoria</i>	Anthracnose	<i>Euterpe precatoria</i>	/ in vivo	>50%	-
		<i>Penicillium sclerotiorum</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Euterpe precatoria</i>	Anthracnose	<i>Euterpe precatoria</i>	/ in vivo	>50%	-
		<i>Penicillium paxilli</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Euterpe precatoria</i>	Anthracnose	<i>Euterpe precatoria</i>	/ in vivo	<50%	-
		<i>Penicillium</i> sp.	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Euterpe precatoria</i>	Anthracnose	<i>Euterpe precatoria</i>	/ in vivo	>50%	-
		<i>Penicillium</i> sp.	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Euterpe precatoria</i>	Anthracnose	<i>Euterpe precatoria</i>	/ in vivo	>50%	-
		<i>Penicillium</i> sp.	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Euterpe precatoria</i>	Anthracnose	<i>Euterpe precatoria</i>	/ in vivo	>50%	-

		<i>Hypoxylo-</i> <i>monticulosum</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Euterpe precatoria</i>	Anthracnose	<i>Euterpe precatoria</i>	<i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>	<50%	-
Casas et al. 2021	Brazil	<i>Colletotrichum siamense</i>	<i>Colletotrichum fructicola</i>	<i>Paullinia cupana</i>	Anthracnose	<i>Paullinia cupana</i>	<i>in vivo</i>	<50%	- POX, PAL e quitinase
Ortiz-Ojeda; Andrade, 2020.	Brazil	UEA-253	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Acmella ciliata</i>	Anthracnose		<i>in vitro</i>	<50%	-
		UEA-234	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Acmella ciliata</i>	Anthracnose		<i>in vitro</i>	<50%	-
		UEA-246	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Acmella ciliata</i>	Anthracnose		<i>in vitro</i>	<50%	-
		UEA-249	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Acmella ciliata</i>	Anthracnose		<i>in vitro</i>	<50%	-
		UEA-234	<i>Fusarium decemcellulare</i>	<i>Acmella ciliata</i>	Overbudding		<i>in vitro</i>	<50%	-
		UEA-253	<i>Fusarium decemcellulare</i>	<i>Acmella ciliata</i>	Overbudding		<i>in vitro</i>	<50%	-
De França et al. 2015	Brazil	<i>Trichoderma asperellum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Solozosfericos</i>	Rice sheath blight	<i>Oryza sativa</i>	<i>in vivo</i>	<50%	- Micoparasitismo
Gwinner et al. 2022	Brazil	<i>Trichoderma juruarense</i>	<i>Colletotrichum siamense</i>	<i>Solo amazônico</i>	Anthracnose		<i>in vitro</i>	>50%	-
		<i>Trichoderma juruarense</i>	<i>Sclerotium rolfsii</i>	<i>Solo amazônico</i>	Gray mold		<i>in vitro</i>	>50%	-
		<i>Trichoderma juruarense</i>	<i>Corynespora cassiicola</i>	<i>Solo amazônico</i>	Target spot		<i>in vitro</i>	>50%	-
		<i>Trichoderma juruarense</i>	<i>Fusarium decemcellulare</i>	<i>Solo amazônico</i>	Overbudding		<i>in vitro</i>	>50%	-
Amaral et al. 2022.	Brazil	<i>Cophiniforma atrovirens</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Hevea spp</i>	Anthracnose	<i>Hevea brasiliensis</i>	<i>in vitro</i>	>50%	-

Oliveira et al. 2019	Brazil	<i>Cophinforma atrovirens</i>	<i>Corynespora cassiicola</i>	Hevea spp	Target spot	<i>Hevea brasiliensis</i>	in vitro	<50%	-
		Polyporales sp. 2	<i>Polyporales sp. 2</i>	Hevea spp	Anthracnose	<i>Hevea brasiliensis</i>	in vitro	>50%	-
		Polyporales sp. 2	<i>Corynespora cassiicola</i>	Hevea spp	Target spot	<i>Hevea brasiliensis</i>	in vitro	<50%	-
		<i>Phanerochaete</i> sp. 3	<i>Phanerochaete</i> sp. 3	Hevea spp	Anthracnose	<i>Hevea brasiliensis</i>	in vitro	>50%	--
		<i>Phanerochaete</i> sp. 3	<i>Corynespora cassiicola</i>	Hevea spp	Target spot	<i>Hevea brasiliensis</i>	in vitro	<50%	---
		<i>Diaporthe</i> sp. 4	<i>Diaporthe</i> sp. 4	Hevea spp	Anthracnose	<i>Hevea brasiliensis</i>	in vitro	<50%	--
		<i>Diaporthe</i> sp. 4	<i>Corynespora cassiicola</i>	Hevea spp	Target spot	<i>Hevea brasiliensis</i>	in vitro	<50%	--
		<i>Beltrania rhombica</i>	Colletotrichum musae	Galhos e folhas	Anthracnose	<i>Musa spp.</i>	in vitro	>50%	--
		<i>Brachysporiella</i> sp	Colletotrichum musae	Galhos e folhas	Anthracnose	<i>Musa spp.</i>	in vitro	>50%	--
		<i>Dictyochaeta</i> sp	Colletotrichum musae	Galhos e folhas	Anthracnose	<i>Musa spp.</i>	in vitro	>50%	--
		<i>Gonytrichum</i> sp	Colletotrichum musae	Galhos e folhas	Anthracnose	<i>Musa spp.</i>	in vitro	>50%	--
		<i>Beltrania rhombica</i>	<i>Sclerotinia</i> sp	Galhos e folhas	White mold	<i>Feijão</i>	in vitro	>50%	---
		<i>Brachysporiella</i> sp	<i>Sclerotinia</i> sp	Galhos e folhas	White mold	<i>Feijão</i>	in vitro	>50%	--
		<i>Dictyochaeta</i> sp	<i>Sclerotinia</i> sp	Galhos e folhas	White mold	<i>Feijão</i>	in vitro	<50%	--
		<i>Gonytrichum</i> sp	<i>Sclerotinia</i> sp	Galhos e folhas	White mold	<i>Feijão</i>	in vitro	>50%	---
		<i>Beltrania rhombica</i>	<i>Sclerotinia</i> sp	Galhos e folhas	White mold	<i>Soja</i>	in vitro	<50%	-
		<i>Brachysporiella</i> sp	<i>Sclerotinia</i> sp	Galhos e folhas	White mold	<i>Soja</i>	in vitro	>50%	-
		<i>Dictyochaeta</i> sp	<i>Sclerotinia</i> sp	Galhos e folhas	White mold	<i>Soja</i>	in vitro	<50%	-

			<i>sclerotiorum</i>										
			<i>Sclerotinia</i>										-
			<i>Gonytrichum</i> sp	<i>sclerotiorum</i>	Galhos e folhas	White mold	Soja	<i>in vitro</i>	<50%				-
													-
													-
Mosquera-Espinoza et al. 2013	Colômbia	Q1M19 (Ceratomyces spp)	<i>Rhizoctonia solani</i>	Raízes de orquídeas	Rice sheath blight		<i>Oryza sativa</i>	<i>in vitro</i>	<50%				-
		Q1M13 (Ceratomyces spp)	<i>Rhizoctonia solani</i>	Raízes de orquídeas	Rice sheath blight		<i>Oryza sativa</i>	<i>in vitro</i>	<50%				-
		Q1M16 1.2 (Ceratomyces spp)	<i>Rhizoctonia solani</i>	Raízes de orquídeas	Rice sheath blight		<i>Oryza sativa</i>	<i>in vitro</i>	<50%				-
Smith et al. 2013	Colômbia	Trichoderma asperellum Th034	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Solo colombiano	White mold		<i>Alactuca sativa/Solanum tuberosum</i>	<i>in vitro</i>	>50%				Parasitismo
		Trichoderma atroviride Th002 e	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Solo colombiano	White mold		<i>Alactuca sativa/Solanum tuberosum</i>	<i>in vitro</i>	>50%				Parasitismo
		Trichoderma harzianum Th203	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Solo colombiano	White mold		<i>Alactuca sativa/Solanum tuberosum</i>	<i>in vitro</i>	>50%				Parasitismo
Villamizar-Gallardo et al. 2018.	Colômbia	Botryosphaeria quercum	<i>Phytophthora palmivora</i>	Solo e frutos de cacau	Black-pod rot		<i>Theobroma cacao</i>	<i>in vitro</i>	>50%				-
		Botryosphaeria quercum	<i>Moniliophthora roreri</i>	Solo e frutos de cacau	Frosty Pod Rot		<i>Theobroma cacao</i>	<i>in vitro</i>	>50%				-
		Botryosphaeria quercum	<i>Aspergillus flavus</i>	Solo e frutos de cacau			<i>Theobroma cacao</i>	<i>in vitro</i>	>50%				-
		Botryosphaeria quercum	<i>Fusarium solani</i>	Solo e frutos de cacau	Root rot disease		<i>Theobroma cacao</i>	<i>in vitro</i>	>50%				-
		Trichoderma viride	<i>Phytophthora palmivora</i>	Solo e frutos de cacau	Black-pod rot		<i>Theobroma cacao</i>	<i>in vitro</i>	>50%				Competição
		Trichoderma viride	<i>Moniliophthora roreri</i>	Solo e frutos de cacau	Frosty Pod Rot		<i>Theobroma cacao</i>	<i>in vitro</i>	>50%				-
		Trichoderma viride	<i>Aspergillus flavus</i>	Solo e frutos de cacau			<i>Theobroma cacao</i>	<i>in vitro</i>	>50%				Competição
		Trichoderma viride	<i>Fusarium solani</i>	Solo e frutos de cacau	Root rot disease		<i>Theobroma cacao</i>	<i>in vitro</i>	>50%				Competição

Villacencio-Vasquez et al. 2018		<i>Lasiodiplodia theobromae</i> - Ec098	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Witches' broom	<i>T. cacao/T. grandiflorum</i>	<i>in vitro</i>	>50%	Competição	
		<i>Lasiodiplodia theobromae</i> - Ec151	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Witches' broom	<i>T. cacao/T. grandiflorum</i>	<i>in vitro</i>	>50%	-	
		<i>Lasiodiplodia theobromae</i> - Ec157	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Witches' broom	<i>T. cacao/T. grandiflorum</i>	<i>in vitro</i>	>50%	-	
		<i>Lasiodiplodia theobromae</i> - Ec098	<i>Moniliophthora roreri</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Frosty Pod Rot	<i>T. cacao/T. grandiflorum</i>	<i>in vitro</i>	>50%	-	
Leiva et al. 2020	Peru	CP24-6	<i>Moniliophthora roreri</i>	<i>Solorizosferico</i>	Frosty Pod Rot	<i>Theobroma cacao</i>	<i>in vitro</i>	>50%	Micoparasitismo	
			<i>Moniliophthora roreri</i>	<i>Solorizosferico</i>	Frosty Pod Rot	<i>Theobroma cacao</i>	<i>in vitro</i>	>50%	Antibi-ose	
Leon-Ttacca et al. 2019	Peru	TE91	<i>Trichoderma</i>	<i>Verticillium dahliae</i>	Leaves	Verticillium wilt	<i>Theobroma cacao</i>	<i>in vitro</i>	>50%	Micoparasitismo
Pujade-Renaud et al., 2019	Peru	LA279	<i>Trichoderma koningii</i>	<i>Corynespora cassiicola</i>	<i>Hevea guianensis</i>	Corynespora leaf fall	<i>Hevea brasiliensis</i>	<i>in vitro</i>	<50%	-

2. Bactérias amazônicas controladoras de doenças de plantas

Assim como os fungos, as bactérias benéficas às plantas proporcionam inúmeros benefícios, ajudando-as a tolerar vários estresses bióticos e abióticos que podem desafiar o crescimento das plantas (MILIUTE et al., 2015). Felizmente, o controle biológico, usando bactérias antagônicas como agentes de biocontrole (BCAs) que interferem no

desenvolvimento dos patógenos, pode ser uma alternativa ao controle químico e evitar os problemas causados por esse método (TAN et al., 2006).

Bactérias assim como patógenos de plantas podem habitar e colonizar o mesmo nicho ecológico e tem sido amplamente reconhecido mecanismos sobre a atividade de biocontrole como competição por espaço, montagem de produtos químicos inibitórios gerais e resistência trazida contra patógenos na planta hospedeira (ZHUANG et al. 2007). A atividade antifúngica é a característica mais comum para as bactérias, também encontrada na presente revisão (Tabela 3), assim as bactérias antagonistas são consideradas como agentes de controle biológico ideais (AZEEM et al. 2020).

Os compostos bioativos produzido por bactérias pode atuar como supressores e/ou inibidores do desenvolvimento de fitopatógenos (FEICHTMAYER et al., 2017). As bactérias seguem um mínimo de dois métodos de antagonismo para o impedir o desenvolvimento dos fitopatógenos (SAFDARPOUR; KHODAKARAMIAN, 2019). Notadamente, a competição espacial e de nutrientes, parasitismo, produção de compostos voláteis e biofilmes são os mecanismos mais empregados por esses microrganismos (BAHADOU et al. 2018; THOKCHOM et al. 2017).

Bactérias pertencentes aos gêneros *Actinobacteria*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* e *Serratia* são as mais comumente relatadas por sua atividade antimicrobiana contra fitopatógenos (AKTUGANOV et al., 2008; LIU et al., 2010; LODWYCKX et al., 2002). Destas *Bacillus* e *Pseudomonas* foram os gêneros mais relatados para controle biológico de fitopatógenos na Amazônia (Tabela 3; Figura 2. b).

Do ponto de vista biotecnológico, a característica mais importante das espécies de *Bacillus* é seu metabolismo secundário diversificado e a capacidade de produzir uma grande variedade de substâncias antagônicas estruturalmente diferentes (FIRA et al. 2018). Espécies de *Bacillus* estão entre os agentes de biocontrole mais investigados, ou seja, biopesticidas que contribuem para a supressão de patógenos de plantas por antagonismo e/ou competição (MNIF 2015). Grande diversidade de espécies do gênero *Bacillus* tem demonstrado atividade antagônica contra diversos microrganismos fitopatogênicos em culturas agrícolas, como milho, arroz, frutíferas, entre outras (WANG et al., 2014; LI et al., 2015). Segundo o levantamento realizado nesse estudo, *Bacillus* foi um dos gêneros mais testados contra fitopatógenos, apresentando taxa de controle maior e menor que 50% em estudos realizados no Brasil (Tabela 2; Figura 2. b).

Estudos com *Bacillus* para o controle de *C. guaranicola* e *Fusarium decencellulare* agentes causadores de doenças em culturas de *Paullinia cupana* (guaraná), por exemplo, demonstrou atividade antagonista através de enzimas como protease, esterase e ácido-indolacético e amônia (NH₃) (LIOTTI et al. 2018; SANTOS E SILVA, 2016).

Isolados de *Bacillus* foram testados contra *Colletrotrichum sp.* e *C. gloeosporioides* agentes causais da antracnose, exibindo taxas de controle do patógeno maior (SANTOS e SILVA et al. 2016; DOS REIS et al. 2019) e menor que 50% (ORTIZ-OJEDA et al 2020; BONATELLI et al. 2019). *Bacillus sp.* também foi avaliado em relação ao controle da Murcha de *Fusarium* e a Podridão-do-pé causadas por *Fusarium sp.*, apresentando controle eficiente para *F. oxysporum f. Lycopersici* e *F. graminearum* (VELHO et al. 2011). No controle da doença target spot, causada pelo fungo *Corynespora cassicola*, isolados de *Bacillus* também apresentaram alta taxa de controle de crescimento do fungo (CANIATO et al. 2020).

Aspergillus carbonarius é responsável pela produção da micotoxina conhecida como ocratoxina em algumas culturas. Alguns isolados de *Bacillus* obtidos de regiões aquáticas amazônicas também apresentaram antagonismo contra o patógeno *in vitro* através da atividade hemolítica (SILVEIRA et al.,2021). *Bacillus amyloliquefaciens* foi testado contra *Rhizoctonia solani*, patógeno do arroz, e obteve taxa de controle maior que 50% (MARTINS et al. 2018; SILVEIRA et al. 2021). Os isolados *B. velezensis* e *B. aryabhatai* obtidos da mandioca (*Manihot esculenta*) quando testados contra *Phytophthium sp.* apresentaram taxa de controle menor que 50% (DA CUNHA FERREIRA et al. 2021).

Isolados de *Bacillus* coletados em ambientes aquáticos amazônicos (*Bacillus sp. Bacillus linchenformis* e *B. Subtilis*) apresentaram atividade de controle de crescimento principalmente entre os fitopatógenos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum f. lycopersici* (*Solanum lycopersicum*) e *Fusarium graminearum* (VELHO et al. 2011). Um estudo realizado com *Corynespora cassicola*, agente causal da target spot em tomateiros, demonstrou taxas de controle da doença em até mais que 50% *in vivo* (CANIATO et al. 2020).

O gênero *Pseudomonas* foi relatado em estudos de controle biológico, isolados de *Piper tuberculatum*, as bactérias exibiram taxas de controle satisfatórias contra os fitopatógenos *Fusarium solani f. sp piperi* (NASCIMENTO et al. 2015). Isolados de *Pseudomonas* retirados do solo amazônico testados contra *R. solanii*, fitopatógeno que ataca as culturas

de arroz e outras gramíneas, exibiram taxa de controle maiores que 50% (VINCENTINI et al. 2022).

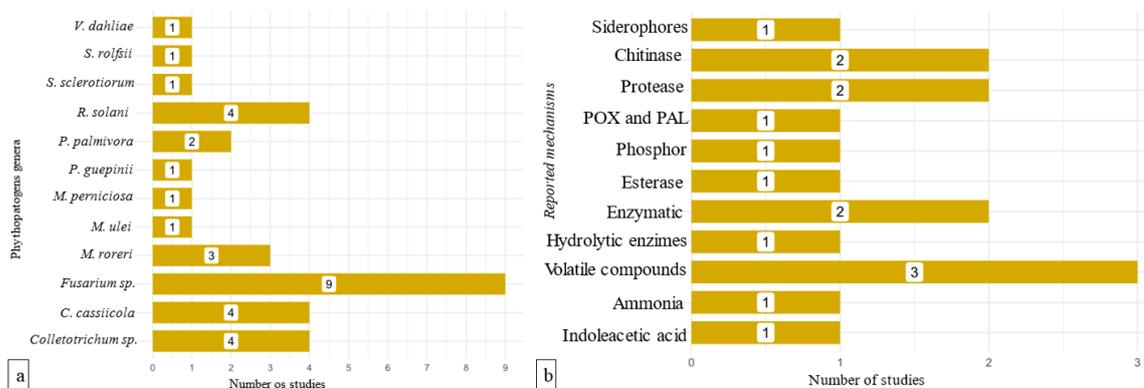


Figura 4. Fitopatógenos e Mecanismos de ação relatados para microrganismos da Amazônia. a) Gêneros de fitopatógenos relatados nos testes de controle biológico. **b)** Mecanismos reportados para os microrganismos controladores da Amazônia.

Foram isolados alguns espécimes do gênero *Pseudomonas* a partir do jambu (*Acmella ciliata*), e destas algumas apresentaram atividade de inibição de crescimento a *C. gloeosporioides* e *F. decemcellulare* (ORTIZ-OJEDA et al. 2020).

Isolados de *Streptomyces* obtidos de *Hevea brasiliensis* na Colômbia obtiveram taxas de controle variadas contra o agente causal da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) e contra *Microcyclus ulei* causador da doença leaf blight, onde pôde ser observado a presença de compostos voláteis e antifúngicos (VILLARRAGA et al. 2017). Peptídeos de *S. morookaense* isolados do solo amazônico também foram testados contra *C. gloeosporioides* e obteve-se taxas de controle maiores que 50% e foi verificado a presença do composto antifúngico gloeosporiocida A4C5C2 (DOS REIS, 2019).

Estudos com *P. cupana* (guaranazeiro) no Brazil testou isolados de bactérias *S. griseocarneus*, *Pantoea anthophila*, *Burkholderia cenocepacia*, *Enterobacter sp.*, *Paenibacillus sp.* contra os fitopatógenos causadores da antracnose e fusariose (*C. guaranicola* e *F. decencellulare*), onde os ensaios demonstraram a produção de esterase, amônia, celulase, protease e ácido-indolacético (LIOTI et al. 2018).

Tabela 3. Bactérias controladores de fitopatógenos isolados de hospedeiros amazônicos.

Autores	Localiza ção	Microrg anismo	Fitopató geno	Fonte de coleta	Doença	Hospe deiro	Tipo de teste	Taxa de controle	Mecanis mo
---------	-----------------	-------------------	------------------	-----------------------	--------	----------------	---------------------	---------------------	---------------

Miguel Alves-Júnior et al. 2021.	Brazil	TS R 2.19	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Oversprouting	<i>Theobroma cacao</i>	<i>in vitro</i>	>50%	Enzimático
			<i>Cercospora coffeicola</i>	<i>Theobroma cacao</i>		<i>Theobroma cacao</i>	<i>in vitro</i>	>50%	Enzimático
			<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Theobroma cacao</i>		<i>Theobroma cacao</i>	<i>in vitro</i>	>50%	Enzimático
			<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	<i>Theobroma cacao</i>		<i>Theobroma cacao</i>	<i>in vitro</i>	>50%	Enzimático
		OS R 1.4	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Oversprouting	<i>Theobroma cacao</i>	<i>in vitro</i>	>50%	Enzimático
			<i>Cercospora coffeicola</i>	<i>Theobroma cacao</i>		<i>Theobroma cacao</i>	<i>in vitro</i>	>50%	Enzimático
			<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Theobroma cacao</i>		<i>Theobroma cacao</i>	<i>in vitro</i>	>50%	Enzimático
			<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	<i>Theobroma cacao</i>		<i>Theobroma cacao</i>	<i>in vitro</i>	>50%	Enzimático
		OS L 2	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Oversprouting	<i>Theobroma cacao</i>	<i>in vitro</i>	>50%	Enzimático
			<i>Cercospora coffeicola</i>	<i>Theobroma cacao</i>		<i>Theobroma cacao</i>	<i>in vitro</i>	>50%	Enzimático
			<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Theobroma cacao</i>		<i>Theobroma cacao</i>	<i>in vitro</i>	>50%	Enzimático
			<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	<i>Theobroma cacao</i>		<i>Theobroma cacao</i>	<i>in vitro</i>	>50%	Enzimático
		TS R 2.8	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Oversprouting	<i>Theobroma cacao</i>	<i>in vitro</i>	>50%	Enzimático
			<i>Cercospora coffeicola</i>	<i>Theobroma cacao</i>		<i>Theobroma cacao</i>	<i>in vitro</i>	>50%	Enzimático
			<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Theobroma cacao</i>		<i>Theobroma cacao</i>	<i>in vitro</i>	>50%	Enzimático
			<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	<i>Theobroma cacao</i>		<i>Theobroma cacao</i>	<i>in vitro</i>	>50%	Enzimático
		CS R 2.24	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Oversprouting	<i>Theobroma cacao</i>	<i>in vitro</i>	>50%	Enzimático
			<i>Cercospora coffeicola</i>	<i>Theobroma cacao</i>		<i>Theobroma cacao</i>	<i>in vitro</i>	>50%	Enzimático

Nascimento et al. 2015	Brazil	CS R 2.24	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Theobroma cacao</i>		<i>Theobroma cacao</i>	<i>in vitro</i>	>50%	Enzimático
		CS R 2.24	<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	<i>Theobroma cacao</i>		<i>Theobroma cacao</i>	<i>in vitro</i>	>50%	Enzimático
		<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Fusarium solani f. sp. piperis</i>	<i>Piper tuberculatum</i>	Root rot	<i>Piper nigrum</i>	<i>in vitro</i>	<50%	Barreira
		<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Fusarium solani f. sp. piperis</i>	<i>Piper tuberculatum</i>	Root rot	<i>Piper nigrum</i>	<i>in vitro</i>	>50%	Barreira
Liotti, et al. 2018.	Brazil	<i>Streptomyces griseocellulose - R132</i>	<i>Colletotrichum guaranicola/Fusarium decen-cellulare</i>	<i>Paullinia cupana</i>	Anthracnose/ Oversprouting	<i>Paullinia cupana</i>	<i>in vitro</i>	x	Esterase, Amônia, IAA
		<i>Pantoea anthophila - R287</i>	<i>Colletotrichum guaranicola/Fusarium decen-cellulare</i>	<i>Paullinia cupana</i>	Anthracnose/ Oversprouting	<i>Paullinia cupana</i>	<i>in vitro</i>	x	Celulase, AIA, Amônia
		<i>Bacillus thuringiensis - R302</i>	<i>Colletotrichum guaranicola/Fusarium decen-cellulare</i>	<i>Paullinia cupana</i>	Anthracnose/ Oversprouting	<i>Paullinia cupana</i>	<i>in vitro</i>	x	Protease, Esterase, AIA, Amônia
		<i>Burkholderia cenocepacia - R38</i>	<i>Colletotrichum guaranicola/Fusarium decen-cellulare</i>	<i>Paullinia cupana</i>	Anthracnose/ Oversprouting	<i>Paullinia cupana</i>	<i>in vitro</i>	x	Protease, Fósforo, AIA, Amônia
		<i>Enterobacter sp. - R356</i>	<i>Colletotrichum guaranicola/Fusarium decen-cellulare</i>	<i>Paullinia cupana</i>	Anthracnose/ Oversprouting	<i>Paullinia cupana</i>	<i>in vitro</i>	x	Celulase, Protease, Amônia

Santos e Silva et al. 2016.	Brazil		<i>Colletotrichum guaranicola</i> / <i>Fusarium decense</i>	<i>Paullinia cupana</i>	Anthracnose/ Oversprouting	<i>Paullinia cupana</i>	<i>in vitro</i>	x	Protease e Amônia Enzimático,
		1B.12B (<i>Bacillus sp.</i>)	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> L1	<i>Paullinia cupana</i>	Anthracnose	<i>Paullinia cupana</i>	<i>in vitro</i>	>50%	proteolítico e celulolítico Enzimático,
		1B.2A	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> L1	<i>Paullinia cupana</i>	Anthracnose	<i>Paullinia cupana</i>	<i>in vitro</i>	>50%	proteolítico e celulolítico Enzimático,
		1B.12C (<i>Bacillus sp.</i>)	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> L1	<i>Paullinia cupana</i>	Anthracnose	<i>Paullinia cupana</i>	<i>in vitro</i>	>50%	proteolítico e celulolítico Enzimático,
Caniato, et al. 2020	Brazil	5.1B.1A (<i>Bacillus sp.</i>)	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> L1	<i>Paullinia cupana</i>	Anthracnose	<i>Paullinia cupana</i>	<i>in vitro</i>	>50%	proteolítico e celulolítico
		7T1,	<i>Corynespora cassiicola</i>	Solo amazônico	Target spot	<i>Solanum lycopersicon</i>	<i>in vitro</i>	>50%	
		114T1	<i>Corynespora cassiicola</i>	Solo amazônico	Target spot	<i>Solanum lycopersicon</i>	<i>in vitro</i>	>50%	
Ortiz-Ojeda; Andrade, 2020	Brazil	52T2 UEA-120 - <i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Corynespora cassiicola</i>	Solo amazônico	Target spot	<i>Solanum lycopersicon</i>	<i>in vitro</i>	>50%	
		UEA-135- <i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Acmella ciliata</i>	Anthracnose		<i>in vitro</i>	<50%	
		UEA-139 - <i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Acmella ciliata</i>	Anthracnose		<i>in vitro</i>	<50%	

Dos Reis et al. 2019.	Brazil	UEA-135 - <i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Fusarium decemcellulare</i>	<i>Acmella ciliata</i>	Overbudding		<i>in vitro</i>	<50%	
		UEA-139 AM25 (Streptomyces morookaense)	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Solomaçônio nico</i>	Anthracnose		<i>in vitro</i>	<50%	Peptídeo
		A4C	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Solomaçônio nico</i>	Anthracnose		<i>in vitro</i>	>50%	Peptídeo
		A4C5	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Solomaçônio nico</i>	Anthracnose		<i>in vitro</i>	<50%	Peptídeo
		A4C5C2	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Solomaçônio nico</i>	Anthracnose		<i>in vitro</i>	>50%	Peptídeo
Silveira et al. 2021.	Brazil	<i>Bacillus spp, P1</i>	<i>Aspergillus carbonarius ITA L293</i>	<i>Ambientes aquáticos amazônicos</i>	Ochratoxins	<i>Vitis vinifera</i>	<i>in vitro</i>	>50%	Atividade hemolítica
		<i>Bacillus spp p7</i>	<i>Aspergillus carbonarius ITA L294</i>	<i>Ambientes aquáticos amazônicos</i>	Ochratoxins	<i>Vitis vinifera</i>	<i>in vitro</i>	>50%	Atividade hemolítica
		<i>Bacillus spp p11</i>	<i>Aspergillus carbonarius ITA L295</i>	<i>Ambientes aquáticos amazônicos</i>	Ochratoxins	<i>Vitis vinifera</i>	<i>in vitro</i>	>50%	Atividade hemolítica
		<i>Bacillus spp p45</i>	<i>Aspergillus carbonarius ITA L296</i>	<i>Ambientes aquáticos amazônicos</i>	Ochratoxins	<i>Vitis vinifera</i>	<i>in vitro</i>	>50%	Atividade hemolítica
Bonatelli et al. 2019.	Brazil	<i>EpD2-5</i>	<i>Colletotrichum sp</i>	<i>Paullinia cupana</i>	Anthracnose	<i>Paullinia cupana</i>	<i>in vitro</i>	>50%	Enzimas hidrolíticas e sideróforos

		EpD2-12	<i>Colletotrichum sp</i>	<i>Paullinia cupana</i>	Anthraxnose	<i>Paullinia cupana</i>	<i>in vitro</i>	<50%	Enzimas hidrolíticas e sideróforos	
		FD5-12	<i>Colletotrichum sp</i>	<i>Paullinia cupana</i>	Anthraxnose	<i>Paullinia cupana</i>	<i>in vitro</i>	<50%	Enzimas hidrolíticas e sideróforos	
Martins et al. 2018	Brazil	da Cunha Ferreira et al. 2021.	<i>Bacillus amyloliquifaciens</i> ALB629	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Theobroma cacao</i> Manihot	Damping-off)	<i>Phaseolus vulgaris</i> L Manihot	<i>in vivo</i>	>50%	Sideróforos e fosfato solúvel
	Brazil		<i>Bacillus velezensis</i> 21Y	<i>Phytophthium sp</i>	<i>esculentum</i> Manihot	Root rot	<i>esculentum</i> Manihot	<i>in vitro</i>	>50%	Sideróforos e fosfato solúvel
			<i>Bacillus aryabhattai</i> 4W	<i>Phytophthium sp</i>	<i>esculentum</i> Manihot	Root rot	<i>esculentum</i> Manihot	<i>in vitro</i>	<50%	Sideróforos e fosfato solúvel
			<i>Bacillus aryabhattai</i> 23Y	<i>Phytophthium sp</i>	<i>esculentum</i> Manihot	Root rot	<i>esculentum</i> Manihot	<i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>	>50%	Sideróforos e fosfato solúvel
Velho et al. 2011.	Brazil		<i>Bacillus sp.</i> P34	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	Ambientes aquáticos amazônicos			<i>in vitro</i>	<50%	Compostos tensoativos
			<i>Bacillus sp.</i> P34	<i>Fusarium oxysporum</i> f.	Ambientes aquáticos amazônicos	Oversprouting		<i>in vitro</i>	>50%	Compostos tensoativos
			<i>Bacillus sp.</i> P34	<i>Fusarium graminearum</i>	Ambientes aquáticos amazônicos	Oversprouting		<i>in vitro</i>	>50%	Compostos tensoativos
			<i>B. licheniformis</i> P40	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	Ambientes aquáticos amazônicos			<i>in vitro</i>	<50%	Compostos tensoativos
			<i>B. licheniformis</i> P40	<i>Fusarium oxysporum</i> f.	Ambientes aquáticos amazônicos	Oversprouting		<i>in vitro</i>	>50%	Compostos tensoativos
			<i>B. licheniformis</i>	<i>Fusarium</i>	Ambientes aquáticos	Oversprouting		<i>in vitro</i>	>50%	Compostos

<i>rmis P40</i>	<i>graminearum</i>	cos amazônicos				tensoativos
	<i>Bipolaris</i>	Ambientes aquáticos				Compostos
<i>Bacillus sp. P7</i>	<i>sorokiniana</i>	amazônicos		<i>in vitro</i>	>50%	tensoativos
	<i>Fusarium</i>	Ambientes aquáticos				Compostos
<i>Bacillus sp. P7</i>	<i>oxysporum f. Lycopersici</i>	amazônicos	Oversprouting	<i>in vitro</i>	>50%	tensoativos
	<i>Fusarium</i>	Ambientes aquáticos				Compostos
<i>Bacillus sp. P7</i>	<i>graminearum</i>	amazônicos	Oversprouting	<i>in vitro</i>	>50%	tensoativos
	<i>Fusarium</i>	Ambientes aquáticos				Compostos
<i>Bacillus sp. P11</i>	<i>oxysporum f. Lycopersici</i>	amazônicos	Oversprouting	<i>in vitro</i>	>50%	tensoativos
	<i>Fusarium</i>	Ambientes aquáticos				Compostos
<i>Bacillus sp. P11</i>	<i>graminearum</i>	amazônicos	Oversprouting	<i>in vitro</i>	>50%	tensoativos
	<i>Fusarium</i>	Ambientes aquáticos				Compostos
<i>B. subtilis P45B</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	amazônicos		<i>in vitro</i>	<50%	tensoativos
	<i>Aspergillus</i>	Ambientes aquáticos				Compostos
<i>B. subtilis P45B</i>	<i>phoenicis</i>	amazônicos		<i>in vitro</i>	<50%	tensoativos
	<i>Aspergillus</i>	Ambientes aquáticos				Compostos
<i>B. subtilis P45B</i>	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	amazônicos		<i>in vitro</i>	>50%	tensoativos
	<i>Fusarium</i>	Ambientes aquáticos				Compostos
<i>B. subtilis P45B</i>	<i>oxysporum f. Lycopersici</i>	amazônicos	Oversprouting	<i>in vitro</i>	>50%	tensoativos

			Ambientes aquáticos amazônicos					
		<i>B. subtilis</i> P45B	<i>Fusarium graminearum</i>	Oversprouting		<i>in vitro</i>	>50%	Compostos tensoativos Sideróforos e fosfato solúvel, protease e quitinase
Vicentini et al. 2022.	Brazil	<i>Amana (P. putida)</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Solo amazônico FoliarBlight		<i>Urochloa brizantha</i> <i>in vitro/in vivo</i>	>50%	Sideróforos e fosfato solúvel, protease e quitinase
		<i>Yara (P. putida)</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Solo amazônico FoliarBlight		<i>Urochloa brizantha</i> <i>in vitro/in vivo</i>	>50%	Sideróforos e fosfato solúvel, protease e quitinase
		<i>Poti (P. asplenii)</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Solo amazônico FoliarBlight		<i>Urochloa brizantha</i> <i>in vitro/in vivo</i>	>50%	Sideróforos e fosfato solúvel, protease e quitinase
Villarreal et al. 2017.	Colômbia	<i>Streptomyces spp. 7.1</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Solo rizosférico do arroz Anthracnose		<i>Hevea brasiliensis</i> <i>in vitro</i>	<50%	Compostos voláteis
		<i>Streptomyces spp. A.20</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Solo rizosférico do arroz Anthracnose		<i>Hevea brasiliensis</i> <i>in vitro</i>	<50%	Compostos antifúngicos
		<i>Streptomyces spp. 5.1</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Solo rizosférico do arroz Anthracnose		<i>Hevea brasiliensis</i> <i>in vitro</i>	<50%	Compostos antifúngicos
		<i>Streptomyces spp. 5.1</i>	<i>Microcyclus ulei</i>	Solo rizosférico do arroz (SALB)	South America n Leaf Blight	<i>Hevea brasiliensis</i> <i>in vitro</i>	<50%	Compostos ativos

3. Mecanismo de ação dos microrganismos amazônicos controladores de fitopatógenos

É difundido que a interação entre plantas e microrganismos dentro do complexo de desenvolvimento vegetal proporciona efeitos benéficos desde a germinação, desenvolvimento vegetativo, produção e características fitossanitárias desejáveis no produto pós-colheita (LOPES et al. 2021). Algumas pesquisas mostram que microrganismos são capazes de melhorar o desenvolvimento de espécies agrícolas e florestais (CELY et al., 2016; MACHADO et al. 2020; LOPES et al., 2021b; SALES et al., 2021).

Os BCAs (agentes de biocontrole) utilizados no controle em planta e em frutas pós-colheita têm seus mecanismos de ação pouco descritos na literatura para a maioria dos microrganismos (seja bactérias ou fungo filamentosos/leveduras) (BAZIOLI et al. 2019). No entanto, supõe-se que mais de um mecanismo de controle possa estar atuando simultaneamente sobre as interações hospedeiro-patógeno-antagonista e ambiente (NUNES et al. 2009); os quais podem incluir: antibiose (NUNES et al. 2009, WAEWTHONGRAK 2015), competição por nutrientes ou espaço (DROBY et al. 1989), (figura 3) indução de resistência (DROBY et al. 200; LU et al. 2013), micoparasitismo e formação de biofilme [CASTORIA 2003, BENHAMOU 2004]. Nesses processos, geralmente ocorrem variados mecanismos. Na indução de resistência por exemplo, os mecanismos de defesa induzidos envolvem a produção de espécies reativas de oxigênio, fitoalexinas, compostos fenólicos ou proteínas relacionadas à patogênese ou a formação de barreiras físicas como modificações de paredes celulares e cutículas pela planta induzida (WIESEL et al., 2014; MACARISIN et al. 2010).

Na antibiose há secreção de enzimas específicas e compostos voláteis (BARSHIMOM 2004; NARAYANASAMY et al. 2013). Na competição, os microrganismos competitivos em potencial devem ser capazes de ocupar esses nichos, sobreviver e consumir rapidamente fontes de nutrientes essenciais para a infecção de patógenos, como açúcares, pólen e exsudatos de plantas nas superfícies das plantas e nos resíduos de plantas, para que os patógenos vencidos não sejam capazes de infectar o hospedeiro (KÖHL et al., 2019).

O antagonismo contra patógenos é determinado principalmente pela presença de zonas de inibição entre os fungos endofíticos e patogênicos, ou a capacidade dos fungos endofíticos de crescerem sobre os fungos patogênicos (ZANUDIN 2020). O antagonismo é conhecido ser mediada por uma variedade de compostos de origem microbiana, por exemplo, bacteriocinas, enzimas, substâncias tóxicas, voláteis e indiretamente, antagonizando patógenos fúngicos pela produção de sideróforos, quitinase, antibióticos, pigmentos fluorescentes e cianeto (NARAYANASAMY et al. 2013). Alguns desses compostos foram identificados nos estudos reunidos nessa revisão.

Na Amazônia, o composto mais relatado para os microrganismos foram os enzimáticos (Figura 4. d) (ALVES-JÚNIOR et al. 2021; SANTOS; SILVA, 2016; BONATELLI et al. 2019). A secreção dessas enzimas por microrganismos hidrolisa os componentes da parede celular do patógeno, tais como a quitina, glucano e celulose

(LUNGE; PATIL, 2012), os quais podem ser sintetizados por fungos e bactérias antagonistas. Enzimas quitinolíticas, em conjunto com β -glucanases ou celulases, são as enzimas mais frequentemente considerado crítico no biocontrole (WANG et al., 2019). Essas proteínas antifúngicas, também são de grande interesse biotecnológico devido ao seu uso potencial na conservação de alimento e sementes e na resistência de plantas a fungos fitopatogênicos (AZEEM et al. 2020).

Um estudo relatou a atividade enzimática para isolados de bactérias contra os fitopatógenos *Fusarium sp.*, *Cercospora coffeicola*, *Rhizoctonia solani* e *Pestalotiopsis guerinii* (ALVES-JÚNIOR et al. 2021). Microrganismos isolados de *Paullinia cupana* demonstraram atividade enzimática em três estudos na Amazônia: O fungo *Colletotrichum siamense* inibiu o crescimento do fitopatógeno *Colletotrichum fructicola* (CASAS et al. 2021); isolados de *Bacillus sp.* apresentaram taxas de controle maior que 50% contra *Colletotrichum gloeosporioides* L2 (SANTOS; SILVA, et al. 2016); outro estudo também realizado com isolados de *Bacillus sp.* apresentaram taxas maiores e menores que 50% contra o fitopatógeno *Colletotrichum sp.* (BONATELLI et al. 2019).

Em sequência aos compostos antagonistas também se destacaram nesse estudo os compostos voláteis, antifúngicos, ativos e tensoativos, nesse caso, produzidos por bactérias (VILLARAGA et al. 2017; DOS REIS et al. 2018; VELHO et al. 2011) (Figura 2. d). Os compostos orgânicos voláteis (COVs), são compostos de baixo peso molecular que têm efeito direto no crescimento de fitopatógenos por microrganismos (CARMONA-HERNANDEZ). São ativos em baixas concentrações e pertencem a vários grupos químicos, como álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, lactonas, terpenos e compostos de enxofre (CARMONA-HERNANDEZ).

O controle biológico utilizando espécies de *Bacillus*, gênero de bactéria mais relatado nesse estudo, possibilitam o biocontrole pela produção de compostos orgânicos voláteis (COV) ou não voláteis (ASARI et al., 2016), apresentando potencial antagônico a diversos fitopatógenos de várias culturas na pré e pós-colheita (ALAMRI, 2015; YAMAMOTO et al., 2015; ZOHORA et al., 2016). Já os membros do gênero *Streptomyces*, segundo gênero mais relatado para bactérias, carregam muitos

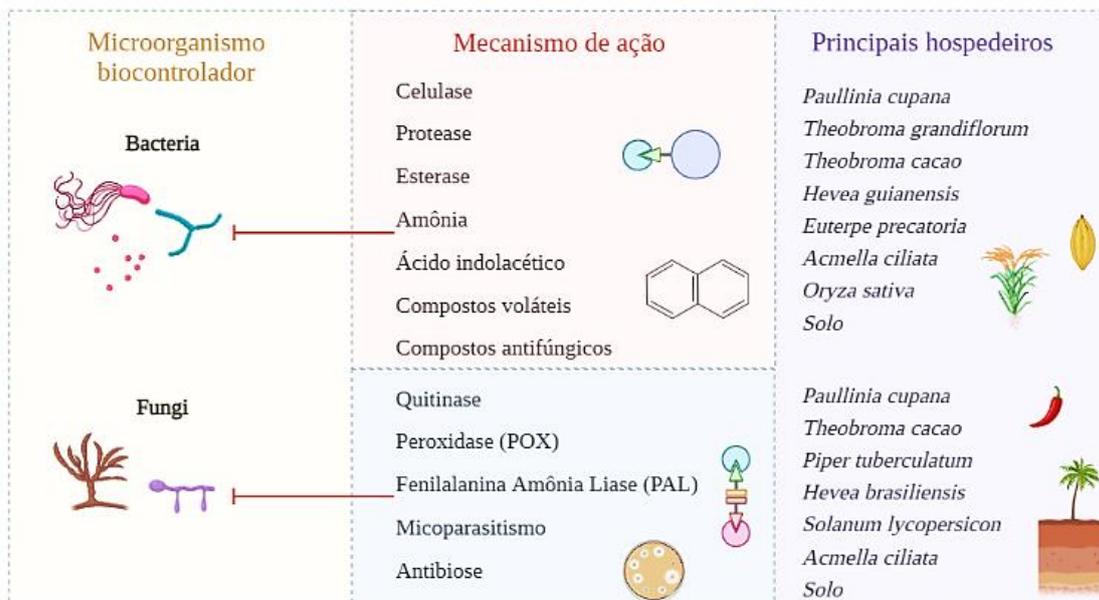


Figura 5. Processos associados aos mecanismos de ação de microrganismos amazônicos a fitopatógenos e principais hospedeiros que abrigam microrganismos biocontroladores.

agrupamentos de genes responsáveis pela produção de metabólitos bioativos, como enzimas, toxinas, antibióticos, antitumorais e antifúngicos (SHE et al., 2016).

Velho et al. 2011 relatou a ação de isolados do gênero *Bacillus sp.* contra os fitopatógenos *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. phoenicis*, *B. sorokiniana*, *F. oxysporum f. Lycopersici* e *F. graminearum* identificando a presença de compostos tensoativos (Lipopetídeo). Um peptídeo (composto antifúngico) foi isolado da bactéria *Streptomyces morookaense* e testado contra *Colletotrichum gloeosporioides* apresentando taxa de controle maior que 50% (DOS REIS et al. 2019). Em outro estudo, isolados de *Streptomyces sp.* também testados contra *Colletotrichum gloeosporioides* apresentaram ação de compostos voláteis (VILLARRAGA et a. 2017.)

O micoparasitismo pode ocorrer direta ou indiretamente. No parasitismo fúngico indireto, um metabólito produzido pelo parasita libera nutrientes do hospedeiro à distância, enquanto o contato direto com a presa é denominado micoparasitismo direto (LATZ et al. 2018). A competição por nutrientes e espaço é um mecanismo antagônico crucial utilizado por microrganismos para o manejo de vários fitopatógenos (DI FRANCESCO et al., 2016). Através deste método, a rápida habitação e alimentação dos nutrientes disponíveis são facilmente exploradas, e ocupam o espaço que poderia ter sido preenchido por potenciais patógenos (ADELEKE et al. 2022).

O gênero *Trichoderma sp.*, um dos mais frequentemente relatados nessa revisão apresentou os dois modos de antagonismo citados acima. *T. asperellum* foi testado contra *Rhizoctonia solani* e foi relatado o controle por meio de micoparasitismo (DE FRANÇA et al. 2015). *Trichoderma sp.* parasitou o patógeno *Verticillium dahliae*, além de também ser verificado o mecanismo de antibiose na mesma interação promovendo taxa de controle maior que 50% (LEON-TTACCA et al. 2019). O micoparasitismo também foi identificado em outro estudo com *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. harzianum* testados contra *Sclerotinia sclerotiorum* cujo a taxa de controle foi maior que 50% (SMITH et al. 2013). O mecanismo de competição foi relatado para *T. viride* contra os fitopatógenos *P. palmivora*, *M. roleri*, *A. flavus*, *F. solani* com taxas de controle maior que 50% (VILLAMIZAR-GALLARDO et al 2017).

Os sideróforos são produzidos por bactérias e são definidos como pequenas moléculas peptídicas que contêm cadeias laterais e grupos funcionais que podem fornecer um conjunto de alta afinidade para coordenar íons de ferro (GOLONKA et al. 2019). Os sideróforos são classificados em quatro tipos: carboxilatos, hidroxamatos, catolato fenato e piridoxinas. Quando as bactérias produzem sideróforos em um meio, elas deslocam e inibem fitopatógenos no hospedeiro, limitando sua germinação de esporos e crescimento micelial (CORDOVA-ALBORES, 2016). Na Amazônia, da Cunha Ferreira et al. 2021 relatou esta atividade para *Bacillus sp.* contra *Phytophthium sp.* (CUNHA-FERREIRA et al. 2021).

4. Fonte/Local dos microrganismos controladores

O guaraná (*Paullinia cupana* Kunth. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke), pertencente à família Sapindaceae, é uma espécie nativa de florestas tropicais. Seus frutos são famosos por sua propriedade estimulante e medicinal (SCHIMPL 2013) e tem sido utilizado como matéria-prima na indústria farmacêutica e indústrias cosméticas no Brasil e no mundo (PATRICK et al. 2019). Neste estudo, os fitopatógenos mais relatados para *P. cupana* foram *Colletotrichum sp.* e *Fusarium sp.* (Tabela 1, Figura 3). E os microrganismos endofíticos relatados e testados foram *Fusarium sp.*, *Pestalotiopsis sp.*, *Microdochium sp.*, *C. siamense*, *S. griseocarneus*, *Pantoea anthophila*, *Burkholderia cenocepacia*, *Enterobacter sp.*, *Paenibacillus sp.*, *Cryphonectria parasítica*, *Bacillus sp.* e *B. thurigiensis*.

Theobroma cacao L. (Malvaceae) é uma espécie vegetal com seu centro de origem encontrado nas florestas úmidas da América do Sul; seus grãos e derivados são o insumo básico para chocolate, cosméticos e para indústria farmacêutica (ZHANG & MOTILAL, 2016). No entanto, existem quatro doenças principais que limitam a produção global de cacau, incluindo podridão parda (causada por *Phytophthora spp.*), Monilíase (*M. roreri*), vassoura-de-bruxa (*M. pernicioso*) (BAILEY & MEINHARDT, 2016) e morte súbita de plantas de *T. cacao* causada por *Verticillium dahliae* Kleb que limita a produção em Uganda, Brasil e Colômbia (RESENDE, FLOOD E COOPER, 1994). Para este trabalho foram relatados os patógenos *M. pernicioso*, *M. roreri*, *Verticillium dahliae*, *Fusarium solani*, *Aspergillus flavus* e *Phytophthora palmivora*. Os microrganismos endofíticos com potencial de biocontrole isolados deste hospedeiro foram: *Pestalotiopsis sp.*, *Curvularia sp.*, *Tolypocladium sp.*, *Fusarium sp.*, *Botryosphaeria quercum*, *Trichoderma sp* e *T. viride*.

O açazeiro *Euterpe precatoria* Mart. pertence à família Arecaceae e é uma espécie de palmeira neotropical de subcopa, nativa de uma região que se estende da América Central ao norte da América do Sul (HENDERSON 1995). A polpa possui uma enorme qualidade nutricional (YUYAMA et al. 2011), sendo consumida de diferentes formas, como sucos, cremes, smoothies, picolés, licores e vinhos (ALMEIDA 2018). Na Amazônia, só foram relatados testes para o combate ao fitopatógeno *C. gloeosporioides* (PETERS et al. 2020). Os microrganismos endofíticos com potencial de biocontrole isolados de *E. precatoria* foram *Ramichloridium sp.*, *C. rosea*, *P. sclerotiorum*, *P. paxilli* e *Hypoxylon monticulosum*.

Acmella ciliata (HBK) Cass, comumente conhecida como planta 'dor de dente', é uma erva medicinalmente importante (JANSEN 1985) nativa da América do Sul (PANYADEE; INTA, 2022). Isolados de *A. ciliata* das classes Coelomycetes, Bacilli e Gammaproteobacteria aforam testados contra *C. gloerosporioides* e *F. decemllulare* (ORTIZ-OJEDA; ANDRADE, 2020).

Hevea brasiliensis (Willd.) Muell. -Arg., também conhecida como a seringueira do Pará, é a principal fonte comercial para a produção de borracha natural (RAHMAN et al. 2013). Para esta espécie são relatados os fitopatógenos *C. gloriosporioides* causador da antracnose (GASPAROTTO 2003) e *Microcyclus ulei* causador da queima-

das-folhas (VILLARRAGA et al. 2017). Neste estudo isolado de *Streptomyces sp.* foram avaliados como agentes de biocontrole.

Os organismos da rizosfera que têm sido bem estudados por seus efeitos benéficos no crescimento e na saúde das plantas são as bactérias fixadoras de nitrogênio, fungos micorrízicos, rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR), microrganismos de biocontrole, fungos micoparasitários e protozoários (MENDES et al. 2013). Isolados de *Trichoderma sp.* foram coletados de solos rizosféricos no Brasil e no Peru e testados contra *R. solani* e *M. royeri* (DE FRANÇA et al. 2015; LEIVA et al. 2020). Bactérias também foram isoladas do solo rizosférico, especificamente do arroz, onde *Streptomyces sp.* foi testada com *C. gloriosporioides* e foi observado a presença de compostos voláteis (VILLARRAGA et al. 2017). No solo Amazônico, foram obtidos alguns isolados também de *Streptomyces sp.*, *Pseudomonas putida*, *P. asplenii*, além de alguns isolados não identificados (CANIATO et al. 2020; DOS REIS et al. 2019; VICENTINI et al. 2022).

5. Conclusão

Microrganismos produzem uma grande fonte de metabólitos que podem ser utilizados para diversos fins na agricultura. Entre eles, o controle biológico é uma alternativa aos fungicidas químicos sintéticos. O gênero de fungo mais utilizado para controle biológico na Amazônia foi *Trichoderma sp.* e de bactéria foi *Bacillus sp.* Os fitopatógenos mais combatidos foram *Fusarium sp.*, *Corynespora cassiicola*, *Colletotrichum sp.* e *Rhizoctonia solani*. Os hospedeiros de microrganismos controladores mais relatados foram *Paullinia cupana*, *Theobroma cacao* e *Hevea brasiliensis*. Os microrganismos testados apresentaram altas taxas de controle e variedades de mecanismos como competição e antagonismo e compostos enzimáticos e voláteis em condições *in vitro* e *in vivo*. Esse levantamento contribui para novos estudos e buscas por novos agentes controladores na Amazônia que possui alta biodiversidade, e, portanto, com potencial para novos achados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. **Revista Uningá Review**, v.2, n.1, p.55-59, 2015.

ADELEKE, B. S. et al. Biocontrol mechanisms of endophytic fungi. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 32, n. 1, p. 1-17, 2022.

ADREES, H. et al. Inducing systemic resistance in cotton plants against charcoal root rot pathogen using indigenous rhizospheric bacterial strains and chemical elicitors. **Crop Protection**, v.

AFZAL, I. et al. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. **Microbiological research**, v. 221, p. 36-49, 2019.

AKTUGANOV, G. et al. Wide-range antifungal antagonism of *Paenibacillus ehimensis* IB-Xb and its dependence on chitinase and β -1, 3-glucanase production. **Canadian journal of microbiology**, v. 54, n. 7, p. 577-587, 2008.

ALAMRI, S. A. Enhancing the efficiency of the bioagent *Bacillus subtilis* JF419701 against soil-borne phytopathogens by increasing the productivity of fungal cell wall degrading enzymes. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 48, n. 2, p. 159-170, 2015.

ALMEIDA, U. O. D.; ANDRADE NETO, R. D. C.; LUNZ, A. M. P.; NOGUEIRA, S. R.; COSTA, D. A. D.; ARAÚJO, J. M. D. Environment and slow-release fertilizer in the production of *Euterpe precatoria* seedlings. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 48, p. 382-389, 2018.

ANDERSON, P. K. et al. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. **Trends in ecology & evolution**, v. 19, n. 10, p. 535-544, 2004.75–83, 2019.

ARAÚJO, W.L. et al. Guia Prático: Isolamento e Caracterização de Microrganismos Endofíticos; Copiadora “Luiz de Queiroz”: Piracicaba, Brazil, 2010.

DE ARAÚJO, I. F. et al. Larvicidal effect of hydroethanolic extract from the leaves of *Acmella oleracea* LRK Jansen in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **South African Journal of Botany**, v. 117, p. 134-140, 2018.

ASARI, S. et al. Multiple effects of *Bacillus amyloliquefaciens* volatile compounds: plant growth promotion and growth inhibition of phytopathogens. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n. 6, p. fiw070, 2016.

AZEVEDO, J. L. et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 15-16, 2000.

AZEEM, H. et al. Biological control of plant pathogens by using antagonistic bacteria: A review. **Pakistan Journal of Phytopathology**, v. 32, n. 2, p. 273-290, 2020.

AZUDDIN, N. F. et al. Molecular phylogeny of endophytic fungi from rattan (*Calamus Castaneus* Griff.) spines and their antagonistic activities against plant pathogenic fungi. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 4, p. 301, 2021.

BADRI, D. V. et al. Rhizosphere chemical dialogues: plant–microbe interactions. **Current opinion in biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 642-650, 2009.

BAILEY, K. L. Canadian innovations in microbial biopesticides. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 32, n. 2, p. 113-121, 2010.

BAILEY, B. A.; MEINHARDT, L. W. (Ed.). **Cacao diseases: a history of old enemies and new encounters**. Springer, 2016.

BANHOS, E. F. dos et al. Endophytic fungi from *Myrcia guianensis* at the Brazilian Amazon: distribution and bioactivity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 153-162, 2014.

BAHADOU, S. A. et al. New potential bacterial antagonists for the biocontrol of fire blight disease (*Erwinia amylovora*) in Morocco. **Microbial pathogenesis**, v. 117, p. 7-15, 2018.

DE BARY, A. **Morphologie und physiologie der pilze, flechten und myxomyceten**. Engelmann, 1866.

BECKER, K.; STADLER, M. Recent progress in biodiversity research on the Xylariales and their secondary metabolism. **The Journal of Antibiotics**, v. 74, n. 1, p. 1-23, 2021.

BERENDSEN, R. L.; PIETERSE, C. M. J; BAKKER, P. A. H. M. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in plant science**, v. 17, n. 8, p. 478-486, 2012

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Controle biológico de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Brasília: Embrapa Meio Ambiente, 2009.

BONATELLI, M. L. et al. Comunidades bacterianas associadas às folhas sintomáticas e assintomáticas da antracnose do guaraná, uma cultura tropical endógena, e seus efeitos antagônicos aos patógenos. **Arquivos de microbiologia**, v. 201, n. 8, pág. 1061-1073, 2019.

BURKETOVA, L. et al. Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 6, p. 994-1004, 2015.

BUSBY, P. E.; PEAY, K. G.; NEWCOMBE, G. Common foliar fungi of *Populus trichocarpa* modify *Melampsora* rust disease severity. **New Phytologist**, v. 209, n. 4, p. 1681-1692, 2016.

BUSBY, P. E.; RIDOUT, M.; NEWCOMBE, G. Fungal endophytes: modifiers of plant disease. **Plant Molecular Biology**, v. 90, n. 6, p. 645-655, 2016.

CAI, L.; HYDE, K. D.; TSUI, C. K. M. Genera of freshwater fungi. **Fungal diversity research series** v.18, p.1-261. 2006a.

CANIATO, et al. Diversidade de cepas bacterianas em solo amazônico enriquecido com biochar e seu potencial para promoção de crescimento e controle biológico de doenças em tomate. **Acta Amazonica**, v. 50, p. 278-288, 2020.

CARNEIRO, F. F. et al. **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. EPSJV/Expressão Popular, 2015.

- CARMONA-HERNANDEZ, S. et al. Biocontrol of postharvest fruit fungal diseases by bacterial antagonists: a review. **Agronomy**, v. 9, n. 3, p. 121, 2019.
- CARVALHO F. P. Pesticides, environment and food safety. *Food Energy Secur* 2017; v. 6; n. 2, p. 48-60, 2017.
- CHAIM, A. Tecnologia de aplicação de agrotóxicos: fatores que afetam a eficiência e o impacto ambiental. **Silva CMMS, Fay EF, organizadores. Agrotóxicos & Ambiente. Brasília: Embrapa**, p. 289-317, 2004.
- CHAKRABORTY, S.; NEWTON, A C. Climate change, plant diseases and food security: an overview. **Plant pathology**, v. 60, n. 1, p. 2-14, 2011.
- CHAMBERGO, F. S.; VALENCIA, Estela Y. Fungal biodiversity to biotechnology. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2567-2577, 2016.
- CELY, M. VT et al. Inoculation of *Schizolobium parahyba* with mycorrhizal fungi and plant growth-promoting rhizobacteria increases wood yield under field conditions. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1708, 2016.
- COMPANT, S., K. et al. Mercado: Editorial special issue soil, plants and endophytes. **Plant Soil**, v. 422, n. 1, p. 1-5, 2018
- COMPANT, S. et al. The plant endosphere world–bacterial life within plants. **Environmental Microbiology**, v. 23, n. 4, p. 1812-1829, 2021.
- CONTRERAS-CORNEJO, H. A. et al. Mitogen-activated protein kinase 6 and ethylene and auxin signaling pathways are involved in Arabidopsis root-system architecture alterations by *Trichoderma atroviride*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 28, n. 6, p. 701-710, 2015.
- CONTRERAS-CORNEJO, H.A. et al. *Trichoderma* Modulates Stomatal Aperture and Leaf Transpiration Through an Abscisic Acid-Dependent Mechanism in *Arabidopsis*. **Journal of Plant Growth Regulation** v. 34, p. 425–432 (2015).
- DEBBAB, A.; ALY, H.; PROKSCH, P. Mangrove derived fungal endophytes—a chemical and biological perception. **Fungal diversity**, v. 61, n. 1, p. 1-27, 2013.
- DE FRANÇA, S. K. S. et al. Biocontrol of sheath blight by *Trichoderma asperellum* in tropical lowland rice. *Agronomy for Sustainable Development*, v. 35, n. 1, p. 317-324, 2015.
- DE SILVA, N I. et al. Use of endophytes as biocontrol agents. **Fungal Biology Reviews**, v. 33, n. 2, p. 133-148, 2019.

DE OLIVEIRA, P. R. et al. Cytotoxic effects of extract of *Acmella oleraceae* (Jambú) in *Rhipicephalus microplus* females ticks. **Microscopy research and technique**, v. 79, n. 8, p. 744-753, 2016.

DI FRANCESCO, A.; MARTINI, C.; MARI, M. Biological control of postharvest diseases by microbial antagonists: how many mechanisms of action?. **European Journal of Plant Pathology**, v. 145, n. 4, p. 711-717, 2016.

DESHMUKH, S. K. et al. Anti-infectives from mangrove endophytic fungi. **South African Journal of Botany**, v. 134, p. 237-263, 2020.

DOWNIE, J. A. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. **FEMS microbiology reviews**, v. 34, n. 2, p. 150-170, 2010.

FAO. **Water pollution from agriculture: a global review**. Rome: 2017.

FESEL, P. H.; ZUCCARO, A.. Dissecting endophytic lifestyle along the parasitism/mutualism continuum in *Arabidopsis*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 32, p. 103-112, 2016.

FIRA, D. et al. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. **Journal of biotechnology**, v. 285, p. 44-55, 2018.

FEICHTMAYER, J.; DENG, L.; GRIEBLER, C. Antagonistic microbial interactions: contributions and potential applications for controlling pathogens in the aquatic systems. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2192, 2017.

FONTANA, D. C. et al. Endophytic fungi: Biological control and induced resistance to phytopathogens and abiotic stresses. **Pathogens**, v. 10, n. 5, p. 570, 2021.

GASPAROTTO, L. Doenças da seringueira nas áreas tradicionais de cultivo e de escape da Amazônia. In: FRAZÃO, D. A. C.; CRUZ, E. de S.; VIEGAS, I. de J. M. (Ed.). **Seringueira na Amazônia: situação atual e perspectivas**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2003. p. 207-215.

GHINI, R.; HAMADA, E.; BETTIOL, W. Climate change and plant diseases. **Scientia Agricola**, v. 65, p. 98-107, 2008.

GLARE, T. et al. Have biopesticides come of age? **Trends in biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 250-258, 2012.

GRABKA, R. et al. Fungal Endophytes and Their Role in Agricultural Plant Protection against Pests and Pathogens. **Plants**, v. 11, n. 3, p. 384, 2022.

GOLONKA, R.; SAN YEOH, B.; VIJAY-KUMAR, M. The iron tug-of-war between bacterial siderophores and innate immunity. **Journal of innate immunity**, v. 11, n. 3, p. 249-262, 2019.

- GWINNER, R. et al. *Trichoderma juruarensis* sp. nov. (Hypocreaceae) a new fungal species from sediments of the Amazonian Juruá River with agricultural potential. 2022.
- HANADA, R. E. et al. Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuaçu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. **Fungal Biology**, v. 114, n. 11-12, p. 901-910, 2010.
- HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D.. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in microbiology**, v. 16, n. 10, p. 463-471, 2008.
- HARDOIM, Pablo R. et al. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 79, n. 3, p. 293-320, 2015.
- HENDERSON, A. **The palms of the Amazon**. New York: Oxford University Press, 1995.
- HEIMPEL, George E.; MILLS, Nicholas J. **Biological control**. Cambridge University Press, 2017.
- HERNANDEZ-MONTIEL, L. G. et al. Mechanisms employed by *Debaryomyces hansenii* in biological control of anthracnose disease on papaya fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 139, p. 31-37, 2018.
- HERMOSA, Rosa et al. Plant-beneficial effects of **Trichoderma** and of its genes. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 17-25, 2012.
- HYDE, K. D.; WONG, S. *Annulatascus fusiformis* sp. nov., a new freshwater ascomycete from the Philippines. **Mycologia**, v. 92, n. 3, p. 553-557, 2000.
- HYDE, K. D. et al. *Colletotrichum*—names in current use. **Fungal Diversity**, v. 39, n. 1, p. 147-182, 2009.
- HYDE, K. D. et al. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. **Fungal Diversity**, v. 39, n. 1, p. 1-17, 2009.
- HYDE, K. D. et al. Families of dothideomycetes. **Fungal diversity**, v. 63, n. 1, p. 1-313, 2013.
- JANSEN, R. K. The systematics of *Acmella* (Asteraceae-Heliantheae). **Systematic Botany Monographs**, p. 1-115, 1985.
- JONES, E. B. G. et al. Classification of marine Ascomycota, anamorphic taxa and Basidiomycota. **Fungal Diversity**, v. 35, n. 1, p. 187, 2009.
- JONES, E. B. et al. Classification of marine ascomycota, basidiomycota, blastocladiomycota and chytridiomycota. **Fungal Diversity**, v. 73, n. 1, p. 1-72, 2015.
- KAEWCHAI, S. Mycofungicides and fungal biofertilizers. **Fungal Divers**, v. 38, p. 25-50, 2009.

KANNAN, V. R.; BASTAS, K. K.; DEVI, R. 20 Scientific and Economic Impact of Plant Pathogenic Bacteria. **Sustainable approaches to controlling plant pathogenic bacteria**, p. 369, 2015.

KEIM, J. et al. Root-associated fungi of *Arabidopsis thaliana* and *Microthlaspi perfoliatum*. **Fungal Diversity**, v. 66, n. 1, p. 99-111, 2014.

KIRK, P.M. et al. **Dictionary of the fungi**, 10th edn. CABI, Wallingford. 2008.

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

KOTTB, M. et al. *Trichoderma* volatiles effecting *Arabidopsis*: from inhibition to protection against phytopathogenic fungi. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 995, 2015.

LATZ, M.A.C.; JENSEN, B.; COLLINGE, D.B.; JØRGENSEN, H.J.L. Endophytic Fungi as Biocontrol Agents: Elucidating Mechanisms in Disease Suppression. **Plant Ecology Divers**, v. 11, p. 555–567, 2018.

LE COCQ, K. et al. Exploitation of endophytes for sustainable agricultural intensification. **Molecular Plant Pathology**, v. 18, n. 3, p. 469-473, 2017.

LEGEIN, M. et al. Modes of action of microbial biocontrol in the phyllosphere. **Frontiers in Microbiology**, p. 1619, 2020.

LEON-TTACCA, B.; ARÉVALO-GARDINI, E.; BOUCHON, A. Muerte repentina de *Theobroma cacao* L. causado por *Verticillium dahliae* Kleb. en el Perú y su biocontrol *In vitro*. **Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, v. 20, n. 1, p. 117-148, 2019.

LI, Y. et al. Biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* LJ02 induces systemic resistance against cucurbits powdery mildew. **Front Microbiol** n.6, p. 1–15. 2015.

LIU, X. et al. Biocontrol potential of an endophytic *Serratia* sp. G3 and its mode of action. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 1465-1471, 2010.

LO PRESTI, Libera et al. Fungal effectors and plant susceptibility. **Annual review of plant biology**, v. 66, p. 513-545, 2015.

LODEWYCKX, Cindy et al. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical reviews in plant sciences**, v. 21, n. 6, p. 583-606, 2002.

LOPES, M. J. S. et al. Microbial biotechnology: inoculation, mechanisms of action and benefits to plants. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 12, p. e356101220585, 2021.

LUMACTUD, R. et al. Bacterial endophytes isolated from plants in natural oil seep soils with chronic hydrocarbon contamination. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 755, 2016.

LUNGE, A. G.; PATIL, A. S. Characterization of efficient chitinolytic enzyme Producing *Trichoderma* species: a tool for better antagonistic approach. **International Journal of Science**, v. 1, n. 5, p. 377-385, 2012.

MACHADO, R. et al. Inoculação foliar de plantas de milho com *Bacillus subtilis* e *Azospirillum brasilense*. **Enciclopédia Biosfera**, v. 17, n. 34, 2020.

MANAMGODA, D. S. L et al. *Cochliobolus*: an overview and current status of species Fungal Divers., v. 51, n. 1, p. 3-42, 2011.

MAMTA, B.; RAJAM, M. V. RNAi technology: a new platform for crop pest control. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 23, n. 3, p. 487-501, 2017.

MAUGHAN, H.; VAN DER AUWERA, G. *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 5, p. 789-797, 2011.

MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMAKERS, J. M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 5, p. 634-663, 2013.

MILIUTE, I. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance: a review. **Zemdirbyste-Agriculture**, v. 102, n. 4, p. 465-478, 2015.

MNIF, I.; GHRIBI, D. Potential of bacterial derived biopesticides in pest management. **Crop Protection**, v. 77, p. 52-64, 2015.

NARAYANASAMY, P. Mechanisms of action of bacterial biological control agents. In: **Biological management of diseases of crops**. Springer, Dordrecht, 2013. p. 295-429.

NIU, B. et al. Microbial interactions within multiple-strain biological control agents impact soil-borne plant disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 585404, 2020.

NUNES, C.; MANSO, T.; LIMA-COSTA, M. E. Postharvest biological control of citrus fruit. **Tree and Forestry Science and Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 116-126, 2009.

ORTIZ-OJEDA, C. P.; ANDRADE, S. L.; PROCÓPIO, R. E. L. Antifungal activity of endophytic microorganisms isolated from *Acmella ciliate* (Asteraceae). **Genetic and Molecular Research**, v. 19, p. GMR18570, 2020.

PANDEY, P. K. et al. Inside the plants: bacterial endophytes and their natural products. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, p. 33-41, 2017.

PANDEY, V. et al. Strong larvicidal activity of three species of *Spilanthes* (Akarkara) against malaria (*Anopheles stephensi* Liston, *Anopheles culicifacies*, species C) and filaria vector (*Culex quinquefasciatus* Say). **Parasitology Research**, v. 102, n. 1, p. 171-174, 2007.

- PANYADEE, PRATEEP; INTA, ANGKHANA. Taxonomy and ethnobotany of *Acmella* (Asteraceae) in Thailand. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 23, n. 4, 2022.
- PRATIBHA, J. et al. Phylogenetic placement of Bahusandhika, *Cancellidium* and *Pseudoepicoccum* (asexual Ascomycota). **Phytotaxa**, v. 176, n. 1, p. 68–80, 2014.
- PATRICK, M. et al, “Safety of guarana seed as a dietary ingredient: a review,” **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 41, p. 11281–11287, 2019.
- PÉREZ-CONSUEGRA N. Alternativas a los plaguicidas altamente peligrosos na América Latina y el Caribe. INPE/ACTAF. La Habana: Agroecológica; 2018.
- PETERS, L. P. et al. Selection of endophytes as antagonists of *Colletotrichum gloeosporioides* in açáí palm. **Biological Control**, v. 150, p. 104350, 2020.
- PUJADE-RENAUD, V. et al. Endophytes from wild rubber trees as antagonists of the pathogen *Corynespora cassiicola*. **Phytopathology**, v. 109, n. 11, p. 1888-1899, 2019.
- RAHMAN, Ahmad Yamin Abdul et al. Draft genome sequence of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 1-15, 2013.
- RESENDE, M. et al. Host specialization of *Verticillium dahliae*, with emphasis on isolates from cocoa (*Theobroma cacao*). *Plant Pathology*, v. 43, n. 1, p. 104-111, 1994.
- REUVENI, R.; REUVENI, M. Foliar-fertilizer therapy—a concept in integrated pest management. **Crop protection**, v. 17, n. 2, p. 111-118, 1998.
- RODRÍGUEZ-EUGENIO, N.; MCLAUGHLIN, M.; PENNOCK, D. **Soil pollution: a hidden reality**. FAO, 2018.
- DOS SANTOS LOPES, M. J. et al. Efficiency of Biostimulants for Alleviating Shade Effects on Forage Grass. **Journal of Agricultural Studies**, v. 9, n. 3, p. 14-30, 2021.
- SHARMA, A. et al. Insecticidal toxicity of spilanthol from *Spilanthes acmella* Murr. Against *Plutella xylostella* L. **American Journal of Plant Sciences**, v. 3, n. 11, p. 1568, 2012.
- SHEORAN, N. et al. Genetic analysis of plant endophytic *Pseudomonas putida* BP25 and chemo-profiling of its antimicrobial volatile organic compounds. **Microbiological research**, v. 173, p. 66-78, 2015.
- E SILVA, M. C. S. et al. Endophytic cultivable bacterial community obtained from the *Paullinia cupana* seed in Amazonas and Bahia regions and its antagonistic effects against *Colletotrichum gloeosporioides*. **Microbial pathogenesis**, v. 98, p. 16-22, 2016.
- DE SOUZA SALES, L. Z. et al. Inoculação com *Azospirillum brasilense* e redução da adubação nitrogenada em arroz de terras altas. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e9110716345-e9110716345, 2021.

STRANGE, R. N.; SCOTT, P. R. Plant disease: a threat to global food security. **Annual review of phytopathology**, v. 43, n. 1, p. 83-116, 2005.

SAFDARPOUR, F.; KHODAKARAMIAN, G. Assessment of antagonistic and plant growth promoting activities of tomato endophytic bacteria in challenging with *Verticillium dahliae* under in-vitro and in-vivo conditions. **Biological Journal of Microorganism**, v. 7, n. 28, p. 77-90, 2018.

SCHIMPL, F. C. et al. Guarana: revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. **Journal of ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 14-31, 2013.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological research**, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. What are endophytes? In: **Microbial root endophytes**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2006. p. 1-13.

SEMENOVA, E. F.; SHPICHKA, A. I.; MOISEEVA, I. Ya. About essential oils biotechnology on the base of microbial synthesis. **European Journal of Natural History**, n. 4, p. 29-31, 2012.

SHE, W.; SUN, Z.; YI, L.; ZHAO, S.; LIANG, Y. *Streptomyces alfalfae* sp. Nov. and comparisons with its closest taxa *Streptomyces silaceus*, *Streptomyces flavofungini* and *Streptomyces intermedius*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 44-49, 2016.

SHORESH, M. et al. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. **Annual review of phytopathology**, v. 48, n. 1, p. 21-43, 2010.

SILVEIRA, N. et al. A new alkamide with an endoperoxide structure from *Acmella ciliata* (Asteraceae) and its In vitro antiplasmodial activity. **Molecules**, v. 21, n. 6, p. 765, 2016.

SILVEIRA, R. D. et al. *Aspergillus carbonarius*-derived ochratoxins are inhibited by Amazonian *Bacillus* spp. used as a biocontrol agent in grapes. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 39, n. 1, p. 158-169, 2022.

SMITH, A. et al. Diversity of soil-dwelling *Trichoderma* in Colombia and their potential as biocontrol agents against the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Journal of general plant pathology**, v. 79, n. 1, p. 74-85, 2013.

SIMAS, N. K. et al. Acetylenic 2-phenylethylamides and new isobutylamides from *Acmella oleracea* (L.) RK Jansen, a Brazilian spice with larvicidal activity on *Aedes aegypti*. **Phytochemistry Letters**, v. 6, n. 1, p. 67-72, 2013.

SOOD, M. et al. *Trichoderma*: The “secrets” of a multitalented biocontrol agent. **Plants**, v. 9, n. 6, p. 762, 2020.

- SPADARO, D.; DROBY, S. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. **Trends in Food Science & Technology**, v. 47, p. 39-49, 2016.
- STRANGE, R. N.; SCOTT, P. R. Plant disease: a threat to global food security. **Annual review of phytopathology**, v. 43, n. 1, p. 83-116, 2005.
- STROBEL, G. Harnessing endophytes for industrial microbiology. **Current opinion in microbiology**, v. 9, n. 3, p. 240-244, 2006.
- SUÁREZ-ESTRELLA, F. et al. Biological control of plant pathogens by microorganisms isolated from agro-industrial composts. **Biological Control**, v. 67, n. 3, p. 509-515, 2013.
- TALUKDAR, R.; TAYUNG, K. Endophytic fungal assemblages of *Zanthoxylum oxyphyllum* Edgew. and their antimicrobial potential. **Plant Science Today**, v. 8, n. 1, p. 132-139, 2021.
- THOKCHOM, E. et al. Root colonization by host-specific rhizobacteria alters indigenous root endophyte and rhizosphere soil bacterial communities and promotes the growth of mandarin orange. **European Journal of Soil Biology**, v. 79, p. 48-56, 2017.
- TORRES, R. et al. Optimization of packaging and storage conditions of a freeze-dried *P. antioea* agglomerans formulation for controlling postharvest diseases in fruit. **Journal of applied microbiology**, v. 117, n. 1, p. 173-184, 2014.
- UDAYANGA, Dhanushka et al. Insights into the genus *Diaporthe*: phylogenetic species delimitation in the *D. eres* species complex. **Fungal Diversity**, v. 67, n. 1, p. 203-229, 2014.
- VELHO, R. V. et al. Production of lipopeptides among *Bacillus* strains showing growth inhibition of phytopathogenic fungi. **Folia microbiologica**, v. 56, n. 4, p. 297-303, 2011.
- VILLAMIZAR-GALLARDO, R. A.; ORTÍZ-RODRIGUEZ, Oscar Orlando; ESCOBAR, Jhon Wilmer. Symbiotic and endophytic fungi as biocontrols against cocoa (*Theobroma cacao* L.) phytopathogens. **Summa Phytopathologica**, v. 43, p. 87-93, 2017.
- VILLAVICENCIO-VÁSQUEZ, M. et al. Foliar endophyte fungi as candidate for biocontrol against *Moniliophthora* spp. of *Theobroma cacao* (Malvaceae) in Ecuador. **Acta Biológica Colombiana**, v. 23, n. 3, p. 235-241, 2018.
- XU, Jing; YANG, Xiaobo; LIN, Qiang. Chemistry and biology of *Pestalotiopsis*-derived natural products. **Fungal Diversity**, v. 66, n. 1, p. 37-68, 2014.
- WAEWTHONGRAK, W.; PISUCHPEN, S.; LEELASUPHAKUL, W. Effect of *Bacillus subtilis* and chitosan applications on green mold (*Penicillium digitatum* Sacc.) decay in citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 99, p. 44-49, 2015.
- WANG, X. et al. *Bacillus cereus* AR156-induced resistance to *Colletotrichum acutatum* is associated with priming of defense responses in loquat fruit. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e112494, 2014.

WANG, X. et al. Isolation and characterization of antagonistic bacteria *Paenibacillus jamilae* HS-26 and their effects on plant growth. **BioMed Research International**, v. 2019, 2019.

WEBER, R. W. S. et al. Anti-Candida metabolites from endophytic fungi. **Phytochemistry**, v. 68, n. 6, p. 886-892, 2007.

WIESEL, L. et al. Molecular effects of resistance elicitors from biological origin and their potential for crop protection. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 655, 2014.

WRAIGHT, S. P. et al. Pathogenicity of the Entomopathogenic Fungi *Paecilomyces* spp. and *Beauveria bassiana* against the Silverleaf Whitefly, *Bemisia argentifolii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 71, n. 3, p. 217-226, 1998.

YAMAMOTO, S. Impact of *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 on control of bacterial wilt and powdery mildew in tomato. **Pest Management Science**, v. 71, n. 5, p. 722-727, 2015.

YUYAMA, L. K. O. et al. Caracterização físico-química do suco de açaí de *Euterpe precatoria* Mart. oriundo de diferentes ecossistemas amazônicos. **Acta Amazonica**, v. 41, n. 4, p. 545-552, 2011.

ZANUDIN, N. A. B. M. et al. Antagonistic activity of fungal endophytes isolated from *Garcinia atroviridis* against *Colletotrichum gloeosporioides*. **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 27, n. 3, p. 209-209, 2020.

ZAREI, M. et al. Characterization of a chitinase with antifungal activity from a native *Serratia marcescens* B4A. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1017-1029, 2011.

ZHANG, D. et al. Cloning, characterization, expression and antifungal activity of an alkaline serine protease of *Aureobasidium pullulans* PL5 involved in the biological control of postharvest pathogens. **International journal of food microbiology**, v. 153, n. 3, p. 453-464, 2012.

ZHANG, D.; MOTILAL, L. Origin, dispersal, and current global distribution of cacao genetic diversity. In: **Cacao diseases**. Springer, Cham, 2016. p. 3-31.

ZHANG, W. Global pesticide use: Profile, trend, cost/benefit and more. **Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences**, v. 8, n. 1, p. 1, 2018.

ZHUANG, X. et al. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. **Environment international**, v. 33, n. 3, p. 406-413, 2007.

ZIN, N. A.; BADALUDDIN, N. A. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 65, n. 2, p. 168-178, 2020.

ZOHORA, U.S.; ANO, T.; RAHMAN, M.S. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* K1 by Iturin A Producer *Bacillus subtilis* RB14 Seed Treatment in Tomato Plants. **Advances in Microbiology**, v. 6, n. 06, p. 424, 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), “SIDRA—
banco de Tabelas estatísticas,” 2019, Disponível em <https://sidra.ibge.gov.br/>

CAPÍTULO II

Shortcommunication submetida na revista: Anais da Academia Brasileira de Ciências (ABC).

OCCURRENCE OF *MONILIOPHTHORA PERNICIOSA* IN *HETEROPTERYS ACUTIFOLIA* IN THE SOUTHWESTERN BRAZILIAN AMAZON, ACRE, BRAZIL

JUSLEY S SANTOS ¹, MÁRCIA A TEIXEIRA-SILVA ², MARCOS SILVEIRA ³, CLARICE M CARVALHO ⁴, LEILA P PETERS ⁵

1. Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia (CITA), Rodovia BR 364, Km 04 - Distrito Industrial, Rio Branco - AC, 69920-900 Rio Branco, Acre, Brasil - <https://orcid.org/0000-0002-4064-0075>

2. Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (Bionorte), Rodovia BR 364, Km 04 - Distrito Industrial, Rio Branco - AC, 69920-900 Rio Branco, Acre, Brasil - <https://orcid.org/0000-0003-2178-1590>

3. Universidade Federal Do Acre. Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Laboratório de Botânica e Ecologia Vegetal. Rodovia BR 364, Km 04 - Distrito Industrial, Rio Branco - AC, 69920-900 Rio Branco 69915-559, AC, Brazil - <https://orcid.org/0000-0003-0485-7872>

4. Universidade Federal Do Acre. Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Laboratório de Microbiologia, Universidade Federal Do Acre, Rodovia BR 364, Km 04 - Distrito Industrial, Rio Branco - AC, 69920-900 Rio Branco 69915-559, AC, Brazil - <https://orcid.org/0000-0003-1092-73>

5. Universidade Federal do Acre. Centro de Ciências da Saúde e do Desporto. Rodovia BR 364, Km 04 - Distrito Industrial, Rio Branco - AC, 69920-900 Rio Branco, Acre, Brasil - <https://orcid.org/0000-0002-9469-5290>

Abstract: *Moniliophthora perniciosa* is a basidiomycete fungus that has multiple hosts. In this report, we found *M. perniciosa* isolates on unidentified wood debris in Chandless State Park-Acre. In order to identify their hosts, the fungi were characterized micro and macro-morphological, in addition to having been molecularly identified in two DNA regions (ITS and LSU). The results, when searched in a database and compared with other studies, proved that both isolates belong to the species *M. perniciosa* and to the host *H. acutifolia*, thus constituting the first report of the occurrence of this biotype in the region.

Keywords

H-biotipe, host; *Theobroma cacao*, Witches' broom

INTRODUCTION

Moniliophthora perniciosa belongs to the order Agaricales and the family Marasmiaceae (Stahel, 1915). Several biotypes were delimited for *M. perniciosa* based on the adaptation in different hosts (LISBOA et al., 2020). C-Biotype infects members of

the *Malvaceae* family (Evans, 1977, 1981); the S-biotype infects members of the *Solanaceae* family (Bastos & Evans, 1985; Evans & Barreto, 1996; Rincones et al., 2006); the L-biotype is found in association with members of the *Bignoniaceae* family (Evans, 1977, 1978; Griffith & Hedger, 1994a); B-biotype infects *Bixa orellana*, a member of the *Bixaceae* (Bastos & Anderbrhan, 1986). Additionally, there is a non-pathogenic biotype isolated from *Allophylus edulis* (*Sapindaceae*), setting up a new host family record (Lisboa et al. 2020).

First report of *M. pernicioso* infecting the *Malpighiaceae* family was in the Brazilian Amazon in the host *Mascagnia cf. sepium* (H-biotype), which showed broom symptoms and subsequently was pathogenic for cacao seedlings, inducing typical symptoms such as development of swollen stems and lateral branching (Bastos et al., 1998). In Minas Gerais (Brazil), *M. pernicioso* basidiospores from brooms of *Heteropterys acutifolia* were inoculated into cacao seedlings (cultivars Catongo and Theobroma) and induced the development of witches' broom symptoms in both cultivars (Resende et al., 2000). Recently, also in Minas Gerais, *M. pernicioso* was found on a woody vine from *H. acutifolia* (Lisboa et al., 2020).

This is the first report of *M. pernicioso* from *H. acutifolia* collected in the State of Acre. Therefore, the aim of this study was to expand knowledge about the geographic distribution of the species and its hosts, in addition to presenting photographs of the collected material, as well as a description of macro and microscopic characteristics and molecular characterization.

Materials and methods

1. Collection Location

The fungi were collected from unidentified wood debris in Chandless State Park (Parque Estadual Chandless- PEC); wich is located in the center-south of the state of Acre (9°55'07''S 70°09'27''W). This Park is an Integral Protection Conservation Unit (IPCU) with 695,303 ha, which also cover part of the municipalities of Sena Madureira and Santa Rosa do Purus (ACRE 2010).

Chandless State Park is the largest conservation unit of the state, and its location is part of the border between Brazil and Peru, with an open rainforest as dominant

vegetation (Mielke et al. 2010). The local climate at PEC is hot and humid, with an average temperature above 18°C (Acre 2010).

2. Molecular identification and alignments

DNA extraction was performed from the basidiomata using the method of Doyle e Doyle (1987). The quality of DNA extractions was checked by 1% agarose gel electrophoresis and quantification was performed using NanoDrop (Thermo Scientific). Sequences were obtained from three loci: ribosomal internal transcribed spacer (ITS) and ribosomal large subunit (LSU). The sets of primers ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE et al., 1990); LROR (GTACCC GCTGAACTTAAGC) (Rehner & Samuels, 1994) e LR5 (TCCTGAGGGAAA CTTCG) (Vilgalys & Hester, 1990) were used for amplification and sequencing for ITS and LSU regions. Amplification was performed in a 50 µL reaction, which included 2 µL DNA template (1–20 ng), 0.4 µM of each primer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 µM dNTPs, 5 µL of Taq buffer, and 1.25 U Taq DNA polymerase (Ludwig). The PCR amplification was performed on a cycler PCR machine (Bio-Rad) with the initial denaturation at 95 °C for 2 mins, followed by 35 cycles of amplification (95 °C for 30 sec, 55 °C for 30 sec and 72 °C for 1 min) and an extension step of 72 °C for 7 mins. The PCR products were purified using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) and quantified in 2% agarose gel. Forward and reverse sequencing reactions were carried out on a 7330xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

The nucleotide sequences were edited using the Chromas software (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>). All the sequences were checked manually, and nucleotides with ambiguous positions were edited manually. The consensus sequences were assembled using the Bioedit software (Hall et al., 2011). New sequences generated in the present study were deposited in the NCBI-GenBank database and sequences obtained from other study were retrieved from the NCBI-GenBank database (Table 1). Multiple alignments were produced with the Clustal W 1.7 using MEGA 11 (Tamura et al., 2021). The PEC11 and PECT1 sequences were compared with isolates sequences from *Heteropterys acutifolia*, Liana, unidentified wood debris and *Theobroma cacao* using two DNA regions (ITS and LSU).

Table 1: GenBank accession numbers of DNA sequences of *Moniliophthora perniciosa* used in the alignments analysis.

<i>M. perniciosa</i> isolates	Locality in Brazil	Host	GenBank accession number*	
			ITS	LSU
PEC11	Chandless State Park - AC	Unknown host	OP937176	OP937981
PECT1	Chandless State Park - AC	Unknown host	OP937177	OP937982
COAD2614	Itumirim - MG	<i>Heteropterys acutifolia</i>	MK785156	MK785252
COAD2615	Itumirim - MG	<i>Heteropterys acutifolia</i>	MK785157	MK785253
RWB1267	Itumirim - MG	<i>Heteropterys acutifolia</i>	MK785161	-
COAD2598	Viçosa - MG	Liana	MK785140	MK785236
COAD2606	Viçosa - MG	Liana (Bignoniaceae)	MK785148	MK785244
COAD2608	Viçosa - MG	Unknown host	MK785150	MK785246
COAD2609	Viçosa - MG	Unknown host	MK785151	MK785247
COAD2610	Viçosa - MG	Unknown host	MK785152	MK785248
COAD2616	Linhares - ES	<i>Theobroma cacao</i>	MK785158	MK785254

*GenBank accession numbers: OP937176, OP937177, OP937981 and OP937982 are sequences of this study; the other are of study Lisboa et al. (2020)

3. Morphological characterization

Basidiomata were photographed *in situ* and removed from the substrate with the aid of a penknife and packed in a paper bag for later laboratory analysis. The basidiomata were examined macro-morphological (pileus shape, colour and diameter; stipe colour and size; lamellae colour).

For microscopic analysis, small portions of the hymenium were sectioned freehand with a steel blade and the glass slide was mounted with 3% potassium hydroxide (KOH) and 1% phloxine dye. Spores were visualized and measured using TCCapture software (NOVEL BM2100 microscope with 16megapixel TUCSEN DIGIRETINA camera). The measurements carried out were the width and length of the spore and cheilocystidia. At least 20 individual structures of basidiospores and cheilocystidia were examined and measured. The material studied is deposited at the Botanical Laboratory (LABEV) at the Federal University of Acre.

Results and discussion

In the present study the fungi were found in unidentified wood debris located in an area of primary forest in the Chandless State Park in Acre. Sequences for the two *Moniliophthora* isolates were generated with the size of the amplified regions ranging from 697 to 705 (ITS) and 744 (LSU) base pairs (bp). A highly similar sequences match

search done using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) on the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database indicated that the *Moniliophthora* isolates were *M. pernicioso* (Table 2). Based on ITS *locus*, PEC11 and PECT1 shared 99.15 and 100% identity with *M. pernicioso* isolated from *Heteropterys acutifolia*, collected in Minas Gerais-Brazil, respectively (Lisboa et al., 2020). The LSU sequences revealed that the fungi found in Acre, PEC11 and PECT1, shared 100% and 99.8% identity respectively with *M. pernicioso* isolated from unidentified wood debris, also collected in Minas Gerais-Brazil (Table 2) (Lisboa et al., 2020).

Table 2: Maximum nucleotide identity match for *Moniliophthora pernicioso* isolates (PEC11 and PECT1) based on ITS and LSU sequences using BLAST analysis.

Fungi n°	Loci	Closest match in GenBank	Identity	Isolate/host*
PEC11	ITS	<i>Moniliophthora pernicioso</i> (MK785161)	99.15%	RWB1267/ <i>Heteropterys acutifolia</i>
PECT1	ITS	<i>Moniliophthora pernicioso</i> (MK785161)	100%	RWB1267/ <i>Heteropterys acutifolia</i>
PEC11	LSU	<i>Moniliophthora pernicioso</i> (MK785248)	100%	COAD2610/ unidentified wood debris
PECT1	LSU	<i>Moniliophthora pernicioso</i> (MK785248)	99.8%	COAD2610/unidentified wood debris

**M. pernicioso* isolates and their hosts (Lisboa et al., 2020)

To further determine the similarity between these fungi, the sequences containing ITS and LSU regions were compared using ClustalW (Figure 1 and 2). Alignment of nucleotide based on ITS sequences showed genetic proximity between PEC11 and PECT1 with *M. pernicioso* isolated from *H. acutifolia* (Figure 1). In contrast, the results using LSU sequences were not informative, as there was no difference between the isolates from *H. acutifolia*, unidentified wood debris and PEC11/PECT1 (Figure 2). Based on morphological and molecular data, *M. pernicioso* isolated from *H. acutifolia* was originally described as *Crinipellis brasiliensis* (Arruda et al., 2005). This fungus was recovered from *H. acutifolia* collected in Minas Gerais-Brazil. However, another study with phylogenetic analysis showed that *C. brasiliensis* is extremely similar to *M. pernicioso*, recombining this fungus into *M. brasiliensis* (Niveiro et al., 2020). Nevertheless, Lisboa et al. (2020) recovered three isolates (COAD2614, COAD2615 and RWB1267) from *H. acutifolia* in Minas Gerais-Brazil and the phylogenetic analysis, based on three concatenated gene regions (ITS, RPB1 and LSU), revealed that all these isolates of *H. acutifolia* belong to *M. pernicioso*.

Morphologically, PEC11 and PECT1 were easily classified in *Marasmiaceae* Singer's system (Singer 1976). The PEC11 basidiomata were similar to *M. pernicioso* isolated from *H. acutifolia* described by Lisboa et al. (2020). Pileus 13 mm

diam x 1mm height, pink center and clear margins pale, convex, with depressed center; rough surface, striate furrowed, membranous consistency; margin irregular. This fungus had lamellae free, wide apart, with lamellulae (1-3 lamellulae), membranose, concolor to pileus; stipe 7-8 x 1 mm, central, cylindrical, slender, fragile, wine color with the apex concolor to the lamellae, rigid texture, smooth surface; no ring, volva and basal mycelium. The basidiospores size ranged from 9-11 × 5-6 μm, ellipsoids, hyalines, lisos, with slightly thickened walls. Cheilocystidia had 22-34 x 5-6-8 μm, clavate, hyaline, thin-walled (Figure 1. a, b e c) (Table 3).

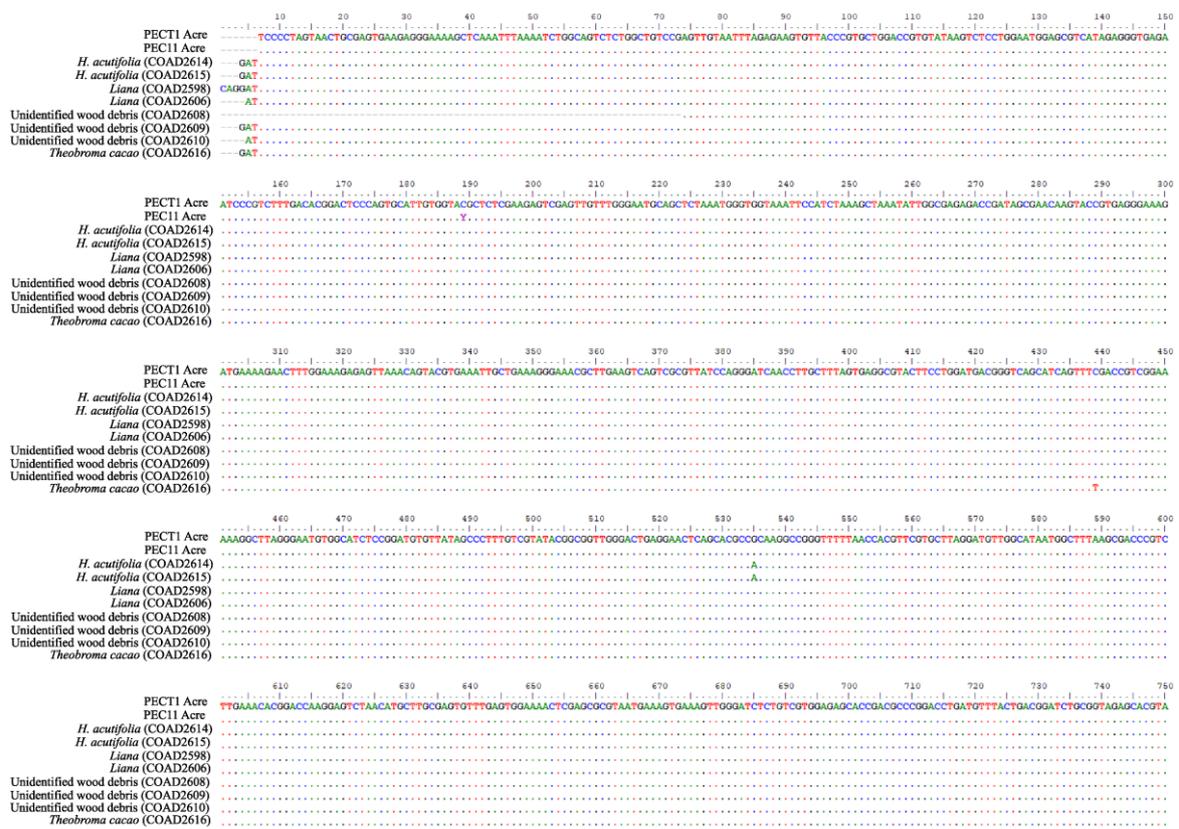
Figure 1: DNA alignment of the ITS region sequences of *Moniliophthora perniciosa* isolated from *Heteropterys acutifolia*, Liana, unidentified wood debris and *Theobroma cacao*. Black frames indicate variations in the DNA sequences of isolates from *H. acutifolia* of other hosts (Liana, unidentified wood debris and *Theobroma cacao*). The numbers in parentheses represent the reference numbers of the *M. perniciosa* isolates.



Unlike PECT11, the pileus color of the fungus PECT1 was different of *M. perniciosa* isolated from *H. acutifolia* found in Minas Gerais-Brazil (Lisboa et al., 2020). The fungus PECT1 showed pileus 6-10-20 mm diam x 1mm height, pale cream, plano-convex, with umboned center; rough surface, striate furrowed, membranous consistency;

margin irregular. Lamellae are subdecurrent, wide apart, with lamellulae (3-5 lamellulae), membranose, concolor to pileus. Stipe 5-6-9 x 1 mm, central, cylindrical, equal, fragile, brownish, with the apex concolor to the lamellae, rigid texture, ribbed surface; no ring, volva and basal mycelium. The basidiospores size ranged from 9-11 × 5-6 μm, ellipsoids, hyalines, lisos, with slightly thickened walls. Cheilocystidia had 24-30 x 6-9 μm, clavate, hyaline, thin-walled (Figure 3. d, e e f) (Table 3).

Figure 2: DNA alignment of the LSU region sequences of *Moniliophthora perniciosa* isolated from *Heteropterys acutifolia*, Liana, unidentified wood debris and *Theobroma cacao*. The numbers in parentheses represent the reference numbers of the *M. perniciosa* isolates.



The cheilocystidia shape has also been used to classify *M. perniciosa* isolates from *H. acutifolia*. Arruda et al. (2005) described that the isolates from *H. acutifolia* produced lageniform cheilocystidia. However, Lisboa et al. (2020) affirmed that the isolates from *H. acutifolia* produced clavate to pyriform cheilocystidia. Similarly, in the current study PECT11 and PECT1 produced clavate cheilocystidia. Thus, based on morphological characteristics combined with molecular analyzes and according to the data showed by Lisboa et al. (2020), it is suggested that the PECT11 basidiomata belong to *M. perniciosa* isolated from *H. acutifolia* (biotype H). Additionally, the results found for the PECT1

fungus also indicate that it belongs to the H biotype (*H. acutifolia*). Nevertheless, the cream color of the pileus this fungus is different from others *M. perniciosus* isolates, which usually have different shades of crimson. Thus, further studies are needed to expand knowledge on the geographical distribution of *M. perniciosus* hosts.

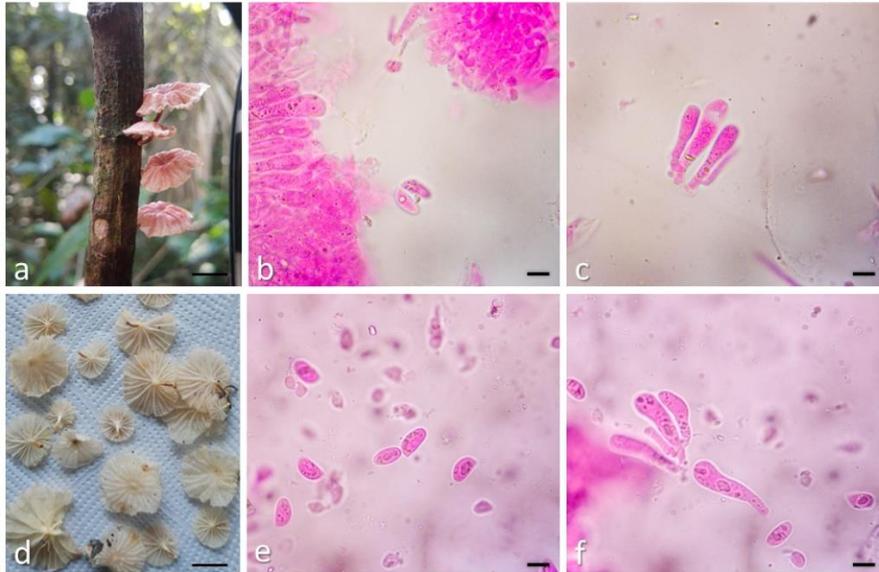


Figura 3. *Moniliophthora perniciosus* isolates (H-biotipe) on *Heteropterys acutifolia*. **a)** Basidioma from *M. perniciosus* (PEC 11). **b)** Basidiospores ellipticals and apiculate. **c)** Cheilocystidia clavate. **d)** Basidiomatas from *M. perniciosus* (PEC T1). **e)** Basidiospores ellipticals and apiculate. **f)** Cheilocystidia clavate. Scale bar: **a e d** = 1 cm. - **b, c, e e f** = 6 μ m.

Table 3. Morphology of *Moniliophthora* isolates associated with *Heteropterys acutifolia* collected in Chandless State Park.

Characteristics	Host	
	Unidentified wood debris	Unidentified wood debris
Code Isolate	PEC T1	PEC 11
Morphology of cheilocystidia	Clavate	Clavate
Basidiospores shape and size (μm)	Elíptical, apiculate/ 9-11 \times 5-6 μ m	Elíptical, apiculate/ 9-11 \times 5-6 μ m
Pileo shape, colour and diameter (mm)	Convex, with umboned center/ pale cream/ 0.6-2.0 (1.0)	Convex, with depressed center / pink center and clear margins / 1.3
Stipe colour and size (mm)	Brownish/ apex concolor with lamellae/ 6-9 mm	Crimson with the apex concolor with the lamellae / 7 mm
Lamellae colour and size (mm)	Cream/ 0.5-1.0 (0.7)	Light pink/ 0.4-0.6 (0.5)

References

- ACRE. 2010. Governo do Estado do Acre. Zoneamento Ecológico-Econômico do Estado do Acre, Fase II - Escala 1:250.000: Documento Síntese. Rio Branco: SEMA.
- AIME, M.C., PHILLIPS-MORA, W. 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycol* 97(5):1012-1022.
- ALMEIDA, D. S. M., GRAMACHO, K. P., CARDOSO, T. H. S., MICHELI, F., ALVIM, F. C., & PIROVANI, C. P. 2017. Cacao phylloplane: the first battlefield against *Moniliophthora perniciosa*, which causes witches' broom disease. *Phytopathology*, 107(7): 864-871.
- ALVES, R.M; RESENDE, M.D.V. 2008. Avaliação genética de indivíduos e progênies de cupuaçuzeiro no estado do Para e estimativas de parâmetros genéticos. *Rev Bras Frutic* 30:696-701.
- ARRUDA, M.C.C., SEPULVEDA, G.F., MILLER, R.N.G., FERREIRA, M.A.S.V., SANTIAGO, D.V.R., RESENDE, M.L.V., DIANESE, J.C., FELIPE, M.S.S. 2005. *Crinipellis brasiliensis*, a new species based on morphological and molecular data. *Mycologia* 97(6):1348-1361.
- BASTOS, C.N., ANDERBRHAN, T., 1986. Urucu (*Bixa orellana*): Nova espécie hospedeira da vassoura de bruxa (*Crinipellis perniciosa*) do cacauzeiro. *Fitopatol Bras* 11(4): 963-965.
- BASTOS, C.N., EVANS, H.C., 1985. A new pathotype of *Crinipellis perniciosa* (witches' broom disease) on solanaceous hosts. *Plant Pathol* 34(2); 306-312.
- BASTOS, C.N., FONSECA, S.E.A., MELO, W.F. 1998. *Masagonia cf. sepium*, cipo nativa da Amazônia Brasileira: hospedeiro de *Crinipellis perniciosa*. *Fitopatol Bras* 23; 504.
- COELHO, M. A. BAKKEREN, G., SHENG, S., HOOD, M. E., GIRAUD, T. 2017. Fungal sex: the Basidiomycota. *Microbiol spectr* 5(3): 5.3-12.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. 1987. Um procedimento rápido de isolamento de DNA para pequenas quantidades de tecido foliar fresco *Bol Fitoquim* 19(6):11-15.
- EVANS, H.C. 1977. The occurrence of pathotypes of *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer in the tropical rainforest ecosystem. In: *Proceedings of the Sixth International Cocoa Research Conference*, Caracas, Venezuela. COPAL Lagos, Nigeria, 166-170.
- EVANS, H.C. 1978. Witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis perniciosa*) in Ecuador. *Ann Appl Biol* 89(2):185-192.
- EVANS, H. C. 1980. Pleomorphism in *Crinipellis perniciosa*, causal agent of witches' broom disease of cocoa. *Trans Br Mycol* 74(3):515-523.

- EVANS, H. C. 1981. Witches' broom disease: A case study. *Cocoa Grow. Bull* (32):5-19.
- EVANS, H.C., BARRETO, R.W. 1996. *Crinipellis perniciosa*: a much investigated but little understood fungus. *Mycologist* 10(2):58-61.
- EVANS, H.C., BEZERRA, J.L., BARRETO, R.W. 2013. Of mushrooms and chocolate trees: aetiology and phylogeny of witches' broom and frosty pod diseases of cacao. *Plant Pathol* 62(4):728-740.
- GRIFFITH, G.W., HEDGER, J.N. 1994a. Spatial distribution of mycelia of the liana (L) biotype of the agaric *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer in tropical forest. *New Phytol.* 127(2):243-259.
- GRIFFITH, G. W., NICHOLSON, J., NENNINGER, A., BIRCH, R. N., & HEDGER, J. N. 2003. Witches' brooms and frosty pods: Two major pathogens of cacao. *N Z J Bot* 41(3):423-435.
- HALL, T., BIOSCIENCES, I., & CARLSBAD, C. J. G. B. B. 2011. BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bull Biosci*, 2(1): 60-61.
- LISBOA, D. O., EVANS, H. C., ARAÚJO, J. P., ELIAS, S. G., & BARRETO, R. W. (2020). *Moniliophthora perniciosa*, the mushroom causing witches' broom disease of cacao: insights into its taxonomy, ecology and host range in Brazil. *Fungal biol*, 124(12): 983-1003.
- MEINHARDT, L.W., RINCONES, J., BAILEY, B.A., AIME, M.C., GRIFFITH, G.W., ZHANG, D., PEREIRA, G.A.G. 2008. *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: what's new from this old foe? *Mol plant pathol* 9(5):577-588.
- MIELKE, O. H. H., CARNEIRO, E., CASAGRANDE, M. M. 2010. Lepidopteroфаuna (Papilionoidea e Hesperioidea) do Parque Estadual do Chandless e arredores, Acre, Brasil. *Biota Neotrop* 10:285-299.
- NIVEIRO, N., RAMÍREZ, N.A., MICHLIG, A., LODGE, D.J., AIME, M.C., 2020. Studies of Neotropical tree pathogens in *Moniliophthora*: a new species, *M. mayarum*, and new combinations for *Crinipellis ticoi* and *C. brasiliensis*. *MycoKeys* 66: 39-54.
- PEREIRA, J. L., RAM, A., DE FIGUEIREDO, J. M., DE ALMEIDA, L. C. 1989. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. *Agrotrópica (Brasil)* 1(1): 79-81.
- RESENDE, M.L.V., GUTEMBERG, B.A.N., SILVA, L.H.C.P., NIELLA, G.R., CARVALHO, G. A., SANTIAGO, D.V.R., BEZERRA, J.L. 2000. *Crinipellis perniciosa* proveniente de um novo hospedeiro, *Heteropterys acutifolia*, e patogênico ao cacauero. *Fitopatol Bras* 25(1):88-91.

- REHNER, S. A., SAMUELS, G. J. 1994. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycol Res* 98(6):625-634.
- RINCONES, J., MAZOTTI, G.D., GRIFFITH, G.W., POMELA, A., FIGUEIRA, A., LEAL, G.A., QUEIROZ, M.V., PEREIRA, J.F., AZEVEDO, R.A., PEREIRA, G.A.G., MEINHARDT, L.W. 2006. Genetic variability and chromosome-length polymorphisms of the witches' broom pathogen *Crinipellis pernicioso* from various plant hosts in South America. *Mycol Res* 110(7): 821-832.
- ROSA, L. H., & CAPELARI, M. 2009. Agaricales fungi from Atlantic rain forest fragments in Minas Gerais, Brazil. *Braz J Microbiol* 40: 846-851.
- ROSKOV, Y., OWER, G., ORRELL, T., NICOLSON, D., BAILLY, N., KIRK, P.M., BOURGOIN, T., DEWALT, R.E., DECOCK, W., VAN NIEUKERKEN, E., ZARUCCHI, J. & PENEV, L. (eds.) 2019. Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2019 Annual Checklist. Disponível em: <http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2019>.
- SENA, K., ALEMANNI, L., AND GRAMACHO, K. P. 2014. The infection process of *Moniliophthora pernicioso* in cacao. *Plant Pathol* 63(6):1272-1281.
- SINGER, R. 1942. A monographic study of the genera *Crinipellis* and *Chaetocalathus*. *Lilloa* 8:441-534.
- SINGER, R., 1976. Marasmiaceae (basidiomycetes- tricholomataceae). *Flora Neotrop.* 17: 1-347.
- STAHEL, G., 1915. *Marasmius perniciosus* nov. spec.: the cause of the krulloten-disease of cacao in Suriname [Translated from German by AMW Ter Laag]. *Bull Departam Landbouw* 33:5-25.
- TAMURA, K., STECHER, G., KUMAR, S. 2021. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol Biol Evol* 38(7): 3022-3027.
- TEIXEIRA, P. J. P. L., THOMAZELLA, D. P. D. T., PEREIRA, G. A. G. 2015. Time for chocolate: current understanding and new perspectives on cacao witches' broom disease research. *PLoS Pathog* 11(10):e1005130.
- VILGALYS, R., HESTER, M., 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J Bacteriol* 172(8):4238-4246.
- WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S. J. W. T., & TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1): 315-322.

CAPÍTULO III

AVALIAÇÃO DO ANTAGONISMO E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS CONTRA *MONILIOPHTORA PERNICIOSA* EM CUPUAÇUZEIRO

RESUMO

O uso indiscriminado de defensivos agrícolas e o aumento populacional tem demandado novas práticas para tratamentos de doenças em culturas, de maneira mais sustentável e segura. *Moniliophthora perniciosa* é considerado o principal problema encontrado pelos produtores de cupuaçu. Os micro-organismos tem potencial para proporcionar benefícios às plantas, como controlar os patógenos por meio da competição de nutrientes, com a produção de toxinas prejudiciais aos patógenos, diminuindo suscetibilidade a doenças. O presente trabalho investiga um potencial fungo antagonista a *M. perniciosa*, a fim de entender seus mecanismos de ação contra o patógeno. Mudanças de cupuaçu mantidas em casa de vegetação foram inoculadas com três potenciais antagonistas e com o patógeno. Ao surgirem os sintomas as mudas foram avaliadas quanto à altura, número de folhas, peso seco da biomassa da raiz e parte aérea, além do teor de clorofila foliar. Os resultados foram positivos para os tratamentos com *Cunninghamella blaskleeana* e *Trichoderma tawa* que apresentaram as maiores médias para as variáveis citadas acima além de não manifestarem a doença. A partir das análises de RNA-seq espera-se entender melhor sobre os mecanismos ativados nessas interações fungo-planta-patógeno.

Palavras-chave:

Controle biológico; Teor de clorofila; Cupuaçu

ABSTRACT

The indiscriminate use of pesticides and population growth has demanded new practices for treating diseases in crops, in a more sustainable and safe way. *Moniliophthora perniciosa* is considered the main problem faced by cupuaçu producers. Microorganisms have the potential to provide benefits to plants, such as controlling pathogens through competition for nutrients, producing toxins to pathogens, checking susceptibility to diseases. The present work investigates a potential antagonist fungus to *M. perniciosa*, in

order to understand its action switches against the pathogen. Cupuaçu seedlings maintained in a greenhouse were inoculated with three potential antagonists and the pathogen. When symptoms appeared, seedlings were evaluated for height, number of leaves, dry weight of root and shoot biomass, in addition to leaf chlorophyll content. The results were positive for treatments with *Cunninghamella blaskeleana* and *Trichoderma tawa*, which showed the highest averages for the variables mentioned above, in addition to not manifesting the disease. Based on the RNA-seq analyses, it is expected to better understand the buttons activated in that quiet fungus-plant-pathogen.

Key words:

Biological control; Chlorophyll content; cupuaçu

1. INTRODUÇÃO

O uso de fungicidas para o manejo de doenças ocasionadas por patógenos na agricultura é uma prática fundamental para garantir a segurança alimentar mundial. Entretanto, essa medida de controle gera impactos negativos ao meio ambiente, à saúde humana e animal. Além do mais, a contaminação excessiva do solo pelos defensivos agrícolas gera o desequilíbrio da microbiota, fazendo com que microrganismos fitopatogênicos desenvolvam mecanismos de resistência a esses compostos (BAĆMAGA; WYSZKOWSKA; KUCHARSKI, 2019; ROILIDES; IOSIFIDIS, 2019; ZUBROD et al., 2019).

Devido ao uso indiscriminado dos defensivos agrícolas, somado ao aumento populacional demandando o cultivo cada vez mais intensivo de produtos alimentícios, atualmente há uma necessidade ambiental pelo desenvolvimento de práticas sustentáveis que garantam a segurança alimentar global (SOUZA et al 2010). A população mundial atualmente tem exigido produtos livres de agroquímicos, e somado ao alto custo e danos ecológicos associados a esses produtos químicos, alternativas devem ser consideradas, entre elas o controle biológico (GABARDO et al. 2020, AGUIRRE-GÜITRÓN et al., 2019, DE SILVA et al., 2019), o qual caracteriza-se pelo uso de microrganismos antagonistas aos fitopatógenos. Os fungos endofíticos por pertencerem ao mesmo habitat dos patógenos, tornam-se potenciais agentes de biocontrole (HUANG et al. 2020).

Microrganismos endofíticos são fungos e bactérias que vivem de maneira assintomática e simbiótica no interior das plantas (KUSARI et al., 2014; RAHMAN et

al., 2017, FERREIRA et al., 2018). Esses microrganismos podem proporcionar muitos benefícios às plantas (LACAVA E AZEVEDO, 2014; ELJOUNAIDI, LEE, BAE, 2016), como o controlar os patógenos por meio da (competição de nutrientes, com a produção de toxinas prejudiciais aos patógenos (HAZARIKA et al., 2019, PUJADE-RENAUD et al., 2019), diminuindo suscetibilidade a doenças (BUSBY et al. 2016; CHRISTIAN et al. 2019; COMPANT et al. 2005). Além disso, também podem aumentar a resistência a fatores abióticos (MÁRQUEZ et al. 2007; RODRIGUEZ et al. 2008, LATA et al., 2018), moldar perfis fitoquímicos (KUSARI et al. 2012; PANACCIONE et al. 2014), mediar a expressão de características funcionais da planta (HARRISON E GRIFFIN, 2020), e promover crescimento das plantas (BAMISILE et al., 2018).

Durante aproximadamente 30 anos de cultivo de cupuaçu na Amazônia brasileira, tem se obtido bons resultados apesar de haver algumas dificuldades, como doenças fúngicas, que interferem no desenvolvimento em larga escala das plantações de cupuaçu (ALVES et al. 2010; ALVES et al 2013). Nesse contexto, o fungo *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Singer, agente causador da vassoura-de-bruxa, é considerado o principal problema encontrado pelos produtores de cupuaçu (FERRAZ et al. 2022). Essa doença tem gerado perdas significativas na produtividade em plantios comerciais, consorciados ou individuais de cupuaçu (ALVES; RESENDE, 2008).

Moniliophthora perniciosa afeta principalmente as regiões meristemáticas das folhas, caules, flores e frutos, causando hipertrofia dos órgãos de interesse. A infecção das almofadas florais resulta em um aumento de seu tamanho durante a fase inicial de secagem. Em frutos jovens, a infecção promove a formação anormal e interrompe o crescimento e mumificação dos frutos, que não atingem a maturidade e permanecem aderidos à planta (ALVES; RESENDE, 2009). Quando a infecção ocorre mais tarde durante o desenvolvimento do fruto, a maturação pode ser completa; no entanto, a polpa e as sementes podem ser comprometidas (ALVES; RESENDE, 2009).

O RNA-seq (sequenciamento de nova geração NGS) é uma alternativa para sequenciar o transcriptoma inteiro de um organismo e para caracterização, especificamente para caracterizar e quantificar suas expressões gênicas (MORTAZAVI et al., 2008; WANG et al., 2009). Com vantagens de alto rendimento, alta velocidade e alta sensibilidade, o RNA-seq é reconhecido como uma ferramenta poderosa para estudar perfis transcricionais de vários organismos, incluindo os patógenos fúngicos (BRUNO et al., 2010; GUIDA et al., 2011; ZHAO et al., 2013; GERIN et al., 2016). Esta técnica tem

sido relatada para superar as limitações de ambos os microarrays e métodos clássicos baseados em sequência que são construídos sobre o fundo de sequenciamento Sanger e para eficientemente melhorar a previsão do modelo genético e identificar novos genes ou roteiros (WANG et al., 2009; TRAPNELL et al., 2010; GAN et al., 2011).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho é selecionar fungo antagonista a *M. pernicioso* em cupuaçuzeiro e analisar o perfil transcricional dessa interação para entender os mecanismos envolvidos e validar genes para o biocontrole do fitopatógeno.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O *screening* para selecionar fungos antagonistas a *M. pernicioso* em plântulas de cupuaçu foi realizado no trabalho “Avaliação de fungos endofíticos no controle da vassoura-de-bruxa em cupuaçuzeiro” (SOUZA et al. 2021). Nessa pesquisa, as análises de antagonismos foram realizadas *in vitro* e em plântulas de cupuaçu.

A partir desse estudo os três melhores antagonistas foram selecionados para serem testados novamente e confirmar a capacidade de controlar a vassoura-de-bruxa em cupuaçuzeiro. Os fungos endofíticos que controlaram a doença foram: *Trichoderma tawa* (isolado T156), *Clonostachys rosea* (isolado T243) e *Cunninghamella blakesleeana* (isolado T229).

Reativação dos fungos endofíticos

Os três fungos endofíticos isolados de *Theobroma grandiflorum* e antagonistas a *M. pernicioso* (*Trichoderma tawa*, *Clonostachys rosea* e *Cunninghamella blakesleeana*) foram reativados e, para isso, foram inoculados em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) e meio aveia (aveia e ágar) e mantido a 28°C por 10 dias (Figuras 1 a, b e c). Esses fungos fazem parte da coleção biológica pertencente ao laboratório de microbiologia da Universidade federal do Acre.

Coleta dos basidiósporos de *M. pernicioso*

Os basidiomas foram coletados de vassouras secas de cupuaçuzeiro (vassoureiro montado em ambiente natural – debaixo de seringueiras, próximo ao parque zoobotânico da UFAC) (Figura 2. A.). Os basidiomas coletados tiveram o píleo fixado em placa de Petri utilizando vaselina sólida, de modo que as lamelas do basidioma ficaram voltadas para baixo. A placa de Petri foi posicionada de modo a permitir que os basidiósporos caíssem dentro de um bécker contendo 2 ml de uma solução de glicerol 16% (FRIAS,

1995). As concentrações de esporos foram determinadas utilizando a câmara de Neubauer (Figura 2. B e c.) e concentrações acima de 10^6 esporos/ml foram armazenadas em tubos criogênicos e guardadas em nitrogênio (N_2) líquido para a preservação dos esporos.

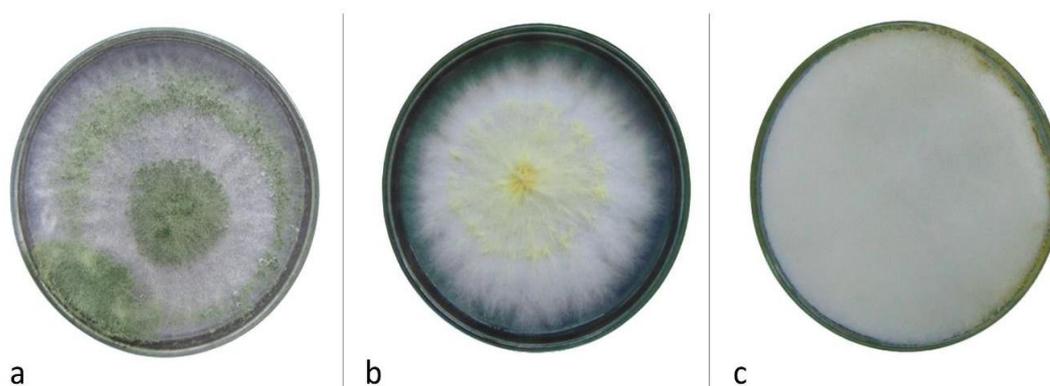


Figura 1. Fungos endofíticos antagonistas a *Moniliophthora perniciosa*. a) *Trichoderma tawa* crescido em meio BDA. B) *Clonostachys rosea* crescido em meio BDA c) *Cunninghamella blakesleeana* crescido em meio Aveia.

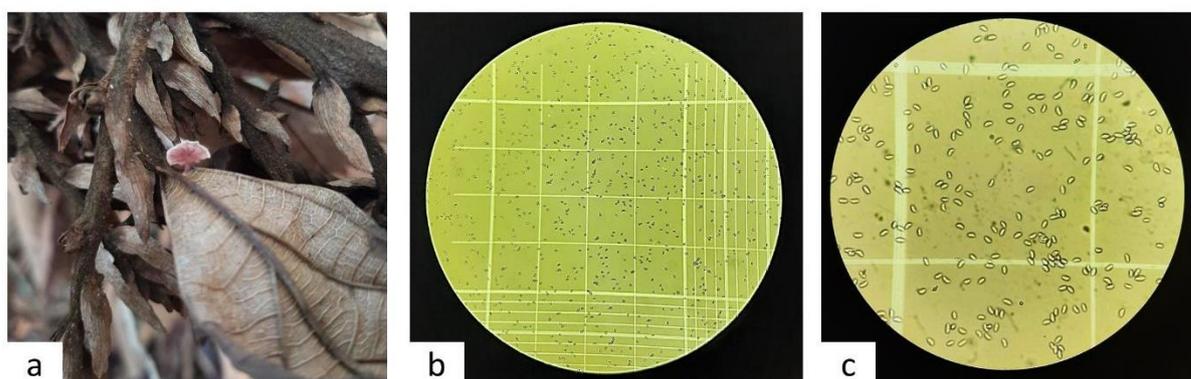


Figura 2. Coleta de basidióporos de *M. perniciosa*. a) Basidioma de *M. perniciosa* em galhos secos infectados. Basidióporos de *M. perniciosa* em câmara de Neubauer vistos com microscópio óptico. **B)** lente objetiva de 4X e **c)** lente objetiva de 40X.

Teste de antagonismo *in vivo*

Material biológico

O experimento em casa de vegetação foi realizado na Horta da UFAC. As sementes de cupuaçu (genótipo susceptível) foram obtidas por meio de doação através da Associação dos Pequenos Agrossilvicultores e Cooperativa Agropecuária e Florestal (RECA-Rondônia). Após retiradas dos frutos e separadas das polpas, as sementes foram

desinfestadas em uma solução de hipoclorito de sódio 1% (v/v) por 1 min e lavadas por 2 min em água destilada. E, seguida, as sementes foram semeadas em bandejas de polietileno, cobertas com serragem autoclavada e mantidas em casa de vegetação com fotoperíodo de 10 h de luz e 14 h de escuro, e médias de temperaturas de $32 \pm 2^\circ\text{C}$ durante o dia e $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante a noite. Após um mês, as plântulas foram transferidas para vasos de 3 L contendo uma mistura de solo, e NPK, a qual foi autoclavada e mantidas em casa de vegetação como descrito anteriormente.

Inoculação do patógeno e endofíticos

A inoculação dos endofíticos foi realizada em plântulas de aproximadamente 2 meses de idade. Para cada endofítico foi feita uma suspensão de aproximadamente 1×10^6 esporos/mL (contendo Tween 20 a 0,01%). Para obter a suspensão de esporos dos fungos endofíticos, foi adicionada água destilada em cada placa contendo fungo crescido em meio BDA ou Aveia, sendo o conteúdo da placa foi misturado e despejado em bécker. Em seguida, a quantificação foi realizada utilizando câmara de Neubauer, e a solução foi ajustada de acordo com a quantidade de conídios. As suspensões dos fungos endofíticos foram pulverizadas sobre as folhas das plântulas (Figura 3. A, b, c). Durante 24 horas após a inoculação, a umidade relativa foi mantida próximo a 100%, para favorecer a germinação dos esporos, utilizando sacos plásticos (HOYOS, 2008).

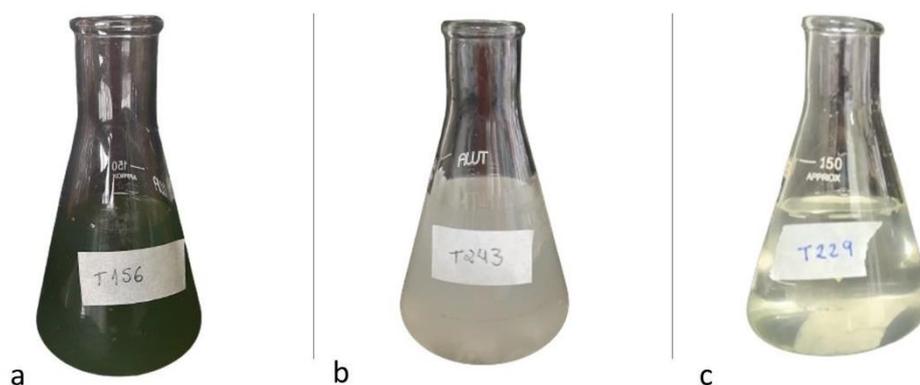


Figura 3. Soluções contendo esporos de isolados de a) *Trichoderma tawa.*, b) *Clonostachys rosea* c) *Cunninghamella blakesleeana*.

Passados 14 dias após a inoculação dos três fungos endofíticos, o processo foi repetido com os três fungos biocontroladores utilizando o mesmo processo de preparo das soluções citado acima. *Moniliophthora perniciosa* foi inoculado nas plântulas após 15

dias passados da primeira inoculação de endofítifcos. As soluções anteriormente conservadas em nitrogênio líquido foram descongeladas e ajustadas utilizando a câmara de Neubauer, de modo que a concentração estivesse a 5×10^5 basidiósporos/ml, e em seguida foi adicionado Tween 20 a 0,01%. Depois de ajustada, 30 μ L da suspensão foi inoculado no meristema apical de cada plântula (Figura 4. A) (NUNES et al. 1996). Durante 24 horas após a inoculação, a umidade relativa foi mantida próximo a 100%, para favorecer a germinação dos esporos, utilizando sacos plásticos (Figura 4. B) Após a inoculação do patógeno as mudas foram transferidas para estufas cobertas com plástico para favorecer a umidade e o possível desenvolvimento de sintomas (Figura 4.b).

O experimento em casa de vegetação foi instalado no delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições, uma para cada fungo utilizando parcelas de 12 plantas cada. Assim, temos as seguintes repetições: 24 plantas mudas para *T. tawa*, 24 para *C. rosea* e 24 para *C. blakesleeana* onde 12 plantas de cada repetição irão receber o patógeno. Para o controle positivo e negativo há 6 plantas dentro de cada tratamentos.



Figura 4. Inoculação do patógeno. A) Suspensão de 30 μ L contendo basidiósporos de *M. pernicioso* inoculados no meristema apical de plântula de *T. grandiflorum*. b) Sacos plásticos colocados em cada muda após a inoculação do patógeno a fim de manter a umidade.

Avaliação da doença

A incidência da doença será avaliada nas plântulas aos 30, 45 e 60 dias, estabelecendo notas, e no fim do experimento o patógeno foi isolado novamente. Além disso, os endofítifcos também serão isolados novamente. O experimento em casa de

vegetação foi instalado no delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições para cada fungo endofítico, utilizando parcelas de 10 plantas cada. Para estimar os componentes de variância e verificar se a interação do inóculo (hospedeiro x patógeno) foi significativa, o seguinte modelo de equação foi usado:

DI = Índice da doença calculado pela seguinte fórmula:

$$DI = TB + AB (0.5CVT) + NAB$$

Onde:

TB é o número de vassouras terminais; AB é o número de vassouras axilares; CVT é o comprimento da vassoura terminal e NAB é o número de vassouras axilares maior que 1 cm (GRAMACHO et al, 2016).

Teor de clorofila e carotenoides

Para determinação dos teores de clorofilas e carotenoides, 50 mg de uma folha de cada tratamento foi retirada e cortada em pequenos fragmentos, em seguida foram colocadas em tubos de ensaio protegidos da luz (envolvidos com papel alumínio) contendo 7 mL de acetona 80%. Os tubos foram colocados em geladeira a 4 °C por 48h para extração dos pigmentos. Posteriormente, a acetona com os pigmentos extraídos foi levada ao espectrofotômetro para leitura da absorbância nos comprimentos de onda 663 nm, 647 nm e 470 nm. De posse das leituras observadas nos respectivos comprimentos de ondas determinou-se de acordo com as equações de Lichtenthaler e Wellburn (1983): Clorofila total = (17,3 x A647 + 7,18 x A663); Clorofila a = (12,21 x A663 - 2,81 x A647); Clorofila b = (20,13 x A647 - 5,03 x A663) e Carotenoides = (1000 x A470 - 3,27 x [clorofila a] - 104 x [clorofila b]) / 229). Os resultados foram obtidos em mg/L e posteriormente transformados para mg/g de massa fresca.

Promoção de crescimento

Para investigar a promoção de crescimento, os indivíduos tiveram suas alturas medidas utilizando fita métrica a partir da superfície do substrato, e o número de folhas maduras foi contabilizado com exceção de folíolos. Os números foram planilhados para posterior análise estatística

Para o peso da biomassa seca, os tecidos das plantas, foram lavados cuidadosamente com um enxágue suave em água corrente até que todas as partículas de

solo aderentes fossem removidas (ARSLAN et al. 2014). A parte aérea e as raízes das plantas foram separadas e acondicionadas em sacos de papel e então permaneceram em estufa de termocirculação forçada a 45°C por 72 horas (DA SILVA SANTOS et al. 2022). O material foi pesado em balança de precisão e os dados foram analisados estatisticamente.

Para comparar os tratamentos entre si, a análise de variância (ANOVA) foi realizada para determinar se houve um efeito significativo dos endofíticos em cada tratamento.

Reisolamento de fungos endofíticos

Amostras de folhas de *T. grandilforum* inoculadas neste experimento contendo apenas o endofítico e o endofítico e o patógeno foram lavadas com uma esponja e detergente em água corrente para remover resíduos sólidos e microrganismos epífitos. O material foi manuseado em câmara de fluxo laminar para desinfecção de superfície com imersão em 70% etanol (1 min), hipoclorito de sódio 2% (3 min), e lavagem em água destilada (1 min) 2 vezes. O material vegetal desinfetado foi cortado em fragmentos de 5 mm em diâmetro e inoculado em placa de Petri contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Agar (BDA) previamente esterilizado em autoclave por 20 minutos e suplementado com antibiótico cloranfenicol (100 mg. L-1 para suprimir o crescimento bacteriano) (DINIZ et al. 2021).

Colônias de fungos com características distintas segundo observações macroscópicas (cor e características de crescimento em meio de cultura) foram purificados pela técnica de estrias por depleção em placas de Petri com meio de cultura BDA e incubadas por 48 h. Após a pureza das colônias foi confirmado, os fungos foram inoculados em tubos com meio BDA (ARAÚJO et al., 2010), e conservados em água destilada (CASTELLANI, 1963) e óleo mineral (BUELL; WESTON, 1947).

Extração do RNA total

O RNA será extraído de acordo com Azevedo et al. (2003). As amostras foram coletadas após 120 dias após a inoculação do patógeno, mediante estabelecimento de diferenças aparentes entre os tratamentos. Para a extração do RNA serão coletados uma porção de aproximadamente 100 gramas do meristema apical.

As amostras serão maceradas em nitrogênio, utilizando almofariz e pistilo até formar um pó fino. Em um tubo de 50 mL será adicionado 15 mL do tampão de extração adicionando 2% (p/v) PVPP e 2% (v/v) 2-mercaptoetanol. Será ainda adicionado proteinase K (10 mg/mL) para uma concentração final de 1,5 mg / mL. Em seguida o tampão de extração será incubado por 10 min a 42 °C.

Após a incubação será adicionado 1,3 g de tecido congelado moído ao tampão de extração e posteriormente misturado vigorosamente em vórtex. Essa mistura contendo o tampão de extração e o tecido moído será incubada por 90 min a 42°C. Prosseguindo, será extraído adicionando 1 vol de clorofórmio-álcool isoamílico (24: 1 [v / v]). Após isso, será agitado no vórtex e centrifugado a 15.000 g por 15 min a 4°C para separar as fases. A fase aquosa superior será transferida para outro tubo, e a extração com clorofórmio-álcool isoamílico será repetida e centrifugada nas mesmas condições. A fase superior será recuperada e adicionada 1/4 vol de 10 M LiCl. Em seguida, será armazenada em 4°C permitindo precipitação durante a noite.

Após a precipitação, será centrifugado a 15.000 g por 25 minutos a 4°C. O sobrenadante será descartado. O pellet deverá ser lavado em 2 mL de 2 M LiCl e centrifugado a 15.000 g por 25 min em 4°C. O sobrenadante será descartado e o pellet será dissolvido em 100-200 µL de tratamento com água DEPC.

A concentração e a pureza do RNA serão determinadas neste estágio. Se o RNA estiver contaminado por polissacarídeos, a amostra de RNA será incubada a 65° C por 10 min e imediatamente transferida para 4°C por 10 min. Posteriormente, será centrifugada a 18.000 g por 15 min a 4°C e suavemente recuperada a solução de RNA, que deve ser armazenada imediatamente a 80°C.

Construção das bibliotecas de cDNA

Para cada amostra, será utilizado 5 µg de RNA total para construir a biblioteca de cDNA. As bibliotecas serão construídas usando o kit 'TruSeq RNA Sample Prep v2 Low Throughput (LT)', conforme descrito nas instruções do fabricante (Illumina). As bibliotecas serão sequenciadas no modo paired-end (250 pares de bases) utilizando o sistema Illumina (HiScanSQ).

Verificação da qualidade das leituras geradas (*reads*), alinhamento de *reads* e montagem dos transcritos

A qualidade dos conjuntos de *reads* gerados no sequenciamento será feita usando o software FastQC v. 0.11.7 (ANDREWS, 2010). Em seguida, os adaptadores utilizados na construção das bibliotecas de cDNA e *reads* de baixa qualidade ($Q < 20$) e de tamanho muito reduzido (< 40 pb) serão removidos, utilizando a ferramenta Trimmomatic v. 0.36 (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>) (BOLGER et al. 2014). Os *reads* restantes, qualidade equivalente Phred20, serão utilizados no mapeamento e na montagem dos transcriptomas.

Os programas Bowtie2 V2.1.0 (LANGMEAD et al. 2012) e BWA (LI & DURBIN, 2009) serão utilizados para o alinhamento das *reads* contra os respectivos genomas de referência. Apesar do genoma do cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum*, não estar disponível, essa espécie é filogeneticamente próxima ao cacauzeiro, *T. cacao*, que possui o genoma sequenciado (ARGOUT et al. 2011), o qual será utilizado como genoma de referência. Em relação ao genoma do fungo antagonista, a escolha será baseada na identificação molecular da espécie, utilizando-se o genoma de linhagens ou espécies próximas que tenham o genoma sequenciado. Na ausência de um genoma de referência, as análises serão baseadas apenas no RNAseq das plântulas na presença do antagonista. Reads de RNAseq não-mapeadas serão selecionadas e montadas em novos transcritos usando o programa de montagem de novo Trinity v.2.4.0 (GRABHERR et al. 2011).

Identificação e anotação dos genes diferencialmente expressos (DEGs)

Para normalizar, quantificar e identificar os DEGs serão utilizados 2 pacotes estatísticos (DESeq2, Robinson et al., 2010). Serão considerados DEGs os transcritos apresentando $\log_2 \text{fold change} \geq 0.5$ ou $\log_2 \text{fold change} \leq -0.5$ com q -valor de 0.01 como correção para múltiplos testes. Anotação funcional relacionada a processo biológico, função molecular e componente celular será realizada utilizando BLAST2GO 3.1.3 (CONESA et al. 2008). O banco de dados do KEGG também será usado para relacionar os DEGs a vias metabólicas usando o anotador automático disponível no servidor KAAS (MORIYA et al. 2007).

3. RESULTADOS

Após 2 meses de semeadura, as mudas de cupuaçuzeiro foram inoculadas com a solução de fungos endofíticos, onde após a inoculação as plantas ficaram 24 horas cobertas com sacos plásticos para manter a umidade. Passados 15 dias, o patógeno *M. pernicioso* também foi inoculado em uma quantidade de 30 µl da solução contendo 5×10^5 de esporos no meristema de cada muda dos tratamentos correspondentes. Após a inoculação, as mudas foram cobertas 24 horas com sacos plásticos para manter a umidade.

Os tratamentos ficaram em casa de vegetação aberta distribuídas em três mesas (figura 1.a). As mesas estavam cobertas com sacos plásticos simulando um tipo de estufa (Figura 1. b), onde as plantas permaneceram por 3 meses, até aparecer os primeiros sintomas no controle positivo para a avaliação do controle da doença. Durante os 3 meses, alguns indivíduos do controle positivo manifestaram a doença (Figura 1. c)

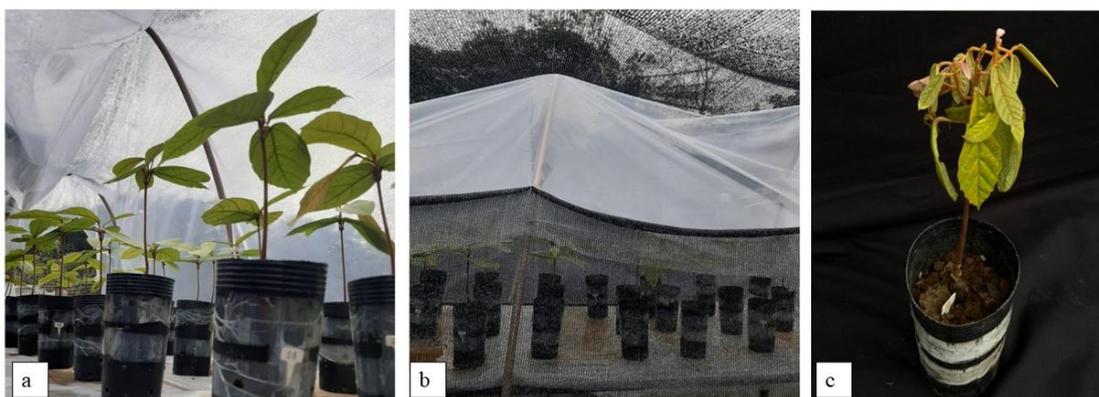


Figura 1. Mudanças de cupuaçuzeiro em estufa. a) ângulo de dentro da estufa. b. visão geral da estufa. c) Muda de cupuaçuzeiro pertencente ao controle positivo (inoculada apenas com patógeno) com sintomas da doença vassoura-de-bruxa.

Controle da doença e promoção de crescimento

Entre os tratamentos testados houve diferenças significativas quanto a promoção de crescimento (Figura 2. a e b). Os fungos *C. blaskleeana* (T229) e *T. tawa* (T156) quando nas repetições apenas com os respectivos endofíticos apresentaram maiores teores de clorofila, aumento de altura e peso seco da biomassa com relação aos controles positivos e negativos. Além disso, não houve quaisquer manifestações de sintomas da doença nos indivíduos inoculados também com os patógenos. O tratamento em que foi aplicado o fungo endofítico *C. rosea*, não apresentou diferenças significativas quanto a

altura. Neste tratamento também houve aparição de indivíduos com sintomas sinalizando menor controle da doença.

Embora que nos tratamentos com *C. blaskleeana* e *T. tawa* as repetições tratadas apenas com endofíticos tenham apresentado indivíduos com as maiores alturas, a média do tratamento com *C. blaskleeana* não diferiu a 5% de significância. A repetição com *C. rosea* da mesma forma, não diferiu significativamente entre as repetições (Figura 02. c, d e e). O tratamento contendo *T. tawa* apresentou a repetição E com maior média entre as demais (Figura 2. d).

Em relação as quantidades de folhas por indivíduos nos três tratamentos houve média maior nas repetições apenas com endofíticos (Figura 02. f, g e h). As repetições contendo endofítico + patógeno (E+P) e o controle positivo (C+) apresentaram médias semelhantes a repetição com apenas o endofítico. O controle negativo apresentou a média mais baixa dentre as repetições (Figura 02. f, g e h).

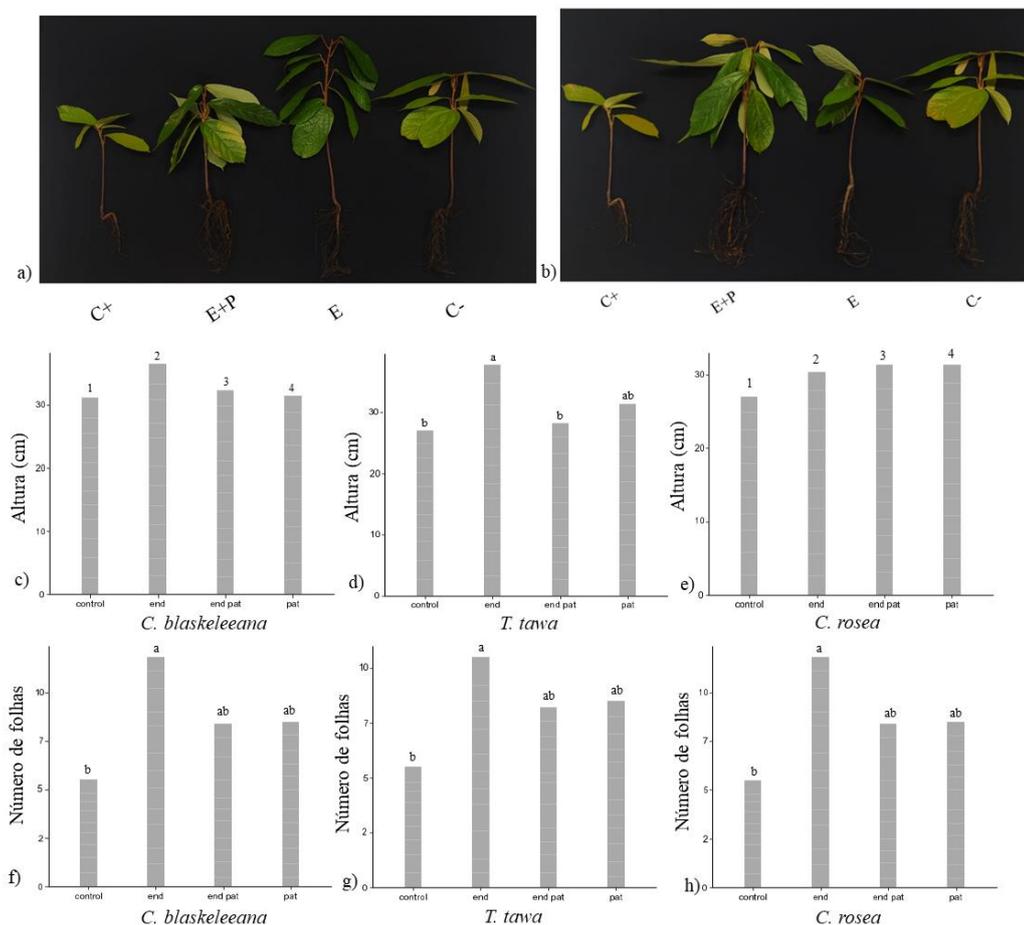


Figura 2. A) Promoção de crescimento por *Cuninghamella blaskleeana* e b) *T. tawa*. Indivíduos representantes dos tratamentos E+P (endofítico e patógeno), E (apenas endofítico), C+ (apenas patógeno) e C- (apenas água); média de alturas em centímetros das repetições com c) *C.*

blaskeleeana, **d)** *T. tawa* e **e)** *C. rosea*; média do número de folhas das repetições com **f)** *C. blaskeleeana*, **g)** *T. tawa* e **h)** *C. rosea*.

Peso seco da biomassa da parte aérea e raiz (g)

O efeito dos fungos endofíticos no peso da biomassa seca apresentou média relevante apenas no tratamento com *T. tawa* no peso seco da parte aérea, onde a média da repetição apenas com endofítico diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) (Figura 4. b). Nas outras repetições nos três tratamentos é possível visualizar que as repetições E e E+P apresentaram médias maiores que outras repetições no peso seco da parte aérea e da raiz (Figura 3. a, c, d, e e f) porém elas não diferiram estatisticamente.

Teor de clorofila e carotenoides

O efeito da presença dos fungos endofíticos e resultado da interação apresentou resultados estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) nos tratamentos com *C. blaskeleeana* (T229) e *T. tawa* (T156). Nestes tratamentos, o teor de clorofila total foi maior nas repetições apenas com os endofíticos do que na do controle (Figura 3. a e b).

As repetições contendo *C. blaskeleeana* e *T. tawa* apresentaram o teor de clorofila *a* maior para as mudas tratadas apenas com os endofíticos. Destas, *C. blaskeleeana* (T229) apresentou a maior taxa sendo de 0,010 mg por g de massa fresca, enquanto *T. tawa* apresentou 0,009 mg por cm^2 (Figura 3. **d** e **e**). Na repetição contendo o fungo *C. rosea* houve um padrão interessante onde o teor de clorofila *a* foi maior no tratamento C-, seguido de E e E +P que apresentaram as médias estatisticamente iguais, e por último o tratamento C+ apresentando a menor média (Figura 3. **f**).

Os teores de Clorofila B apresentaram taxas maiores nas repetições contendo os endofíticos *C. blaskeleeana* e *T. tawa*, sendo que nas repetições contendo *C. blaskeleeana* a média do tratamento E+P foi semelhante à do tratamento E e na repetição contendo *T. tawa* o tratamento E+P apresentou média semelhante ao controle negativo (C-). As médias do teor de clorofila B na repetição contendo *C. rosea* não foram significativas e, portanto, não diferiram estatisticamente.

Os teores de clorofila *b* apresentaram taxas maiores nas repetições contendo apenas os endofíticos *C. blaskeleeana* e *T. tawa*. As médias das demais repetições não diferiram significativamente. O tratamento com *C. rosea* não apresentou médias diferentes entre as repetições (Figura 3. g, h e i).

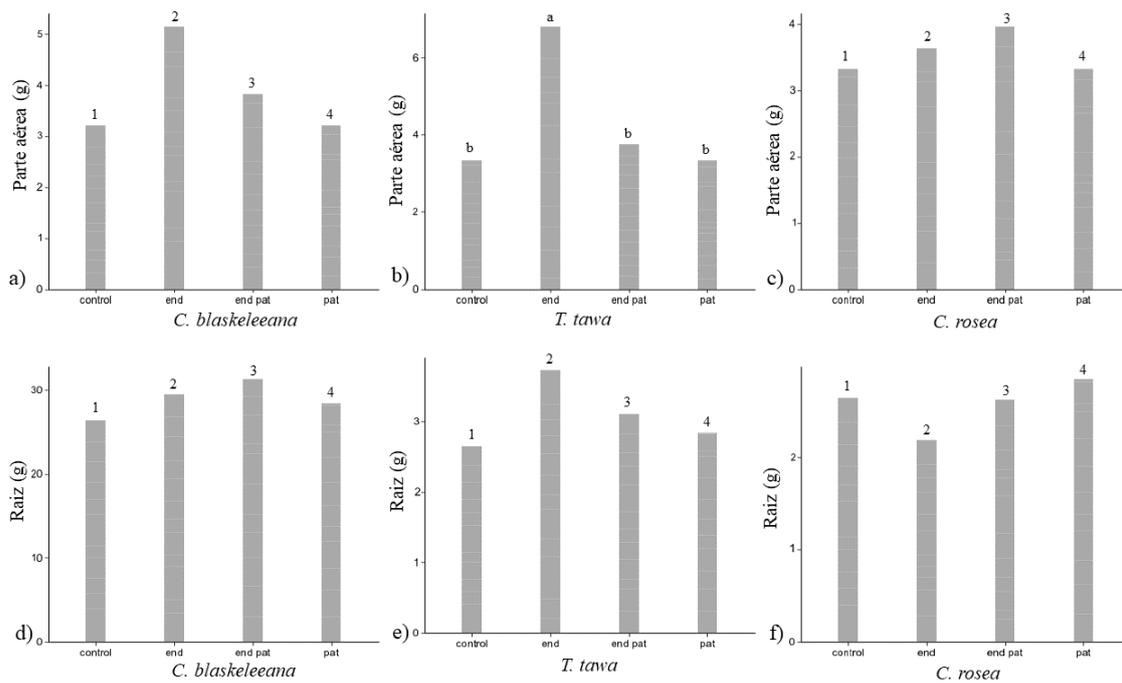


Figura 3. Peso seco da biomassa da parte aérea dos tratamentos com a) *C. blaskeleeana*, b) *T. tawa*, e c) *C. rosea*; Peso seco da biomassa da raiz dos tratamentos com d) *C. blaskeleeana*, e) *T. tawa*, e f) *C. rosea*.

O teor de carotenoides apresentou média significativa na repetição com *C. blaskeleeana* 2, 40 mg/g, sendo que o tratamento E + P apresentou média semelhante. O tratamento controle negativo e positivo ficaram dentro do mesmo grupo estatístico. O tratamento *T. tawa* elevou a produção de carotenoides na repetição E (1,25 mg/g) cuja média foi parecida com a das repetições C- e com E+P, sendo estas últimas semelhantes também ao tratamento C+ (Figura 4. a e b). As médias do teor de carotenoides na repetição contendo *C. rosea* não foram significativas e, portanto, não diferiram estatisticamente (Figura 5. c).

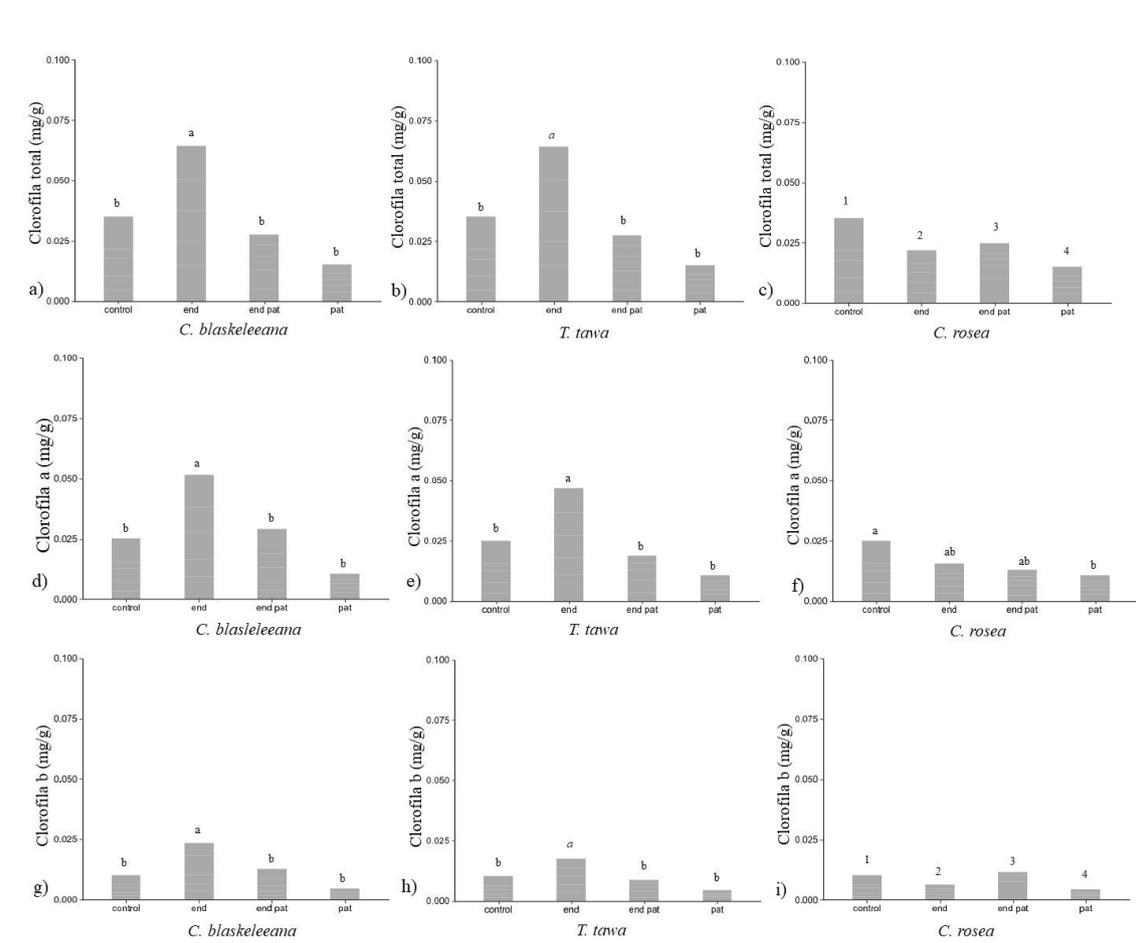


Figura 4. Efeito dos fungos endofíticos no teor de clorofila total dos tratamentos com a) *C. blaskleeana*, b) *T. tawa* e c) *C. rosea*; na clorofila a com d) *C. blaskleeana*, e) *T. tawa* e f) *C. rosea* e na clorofila b com g) *C. blaskleeana*, h) *T. tawa* e i) *C. rosea*. As barras dentro de um gráfico com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes em $p \leq 0,05$.

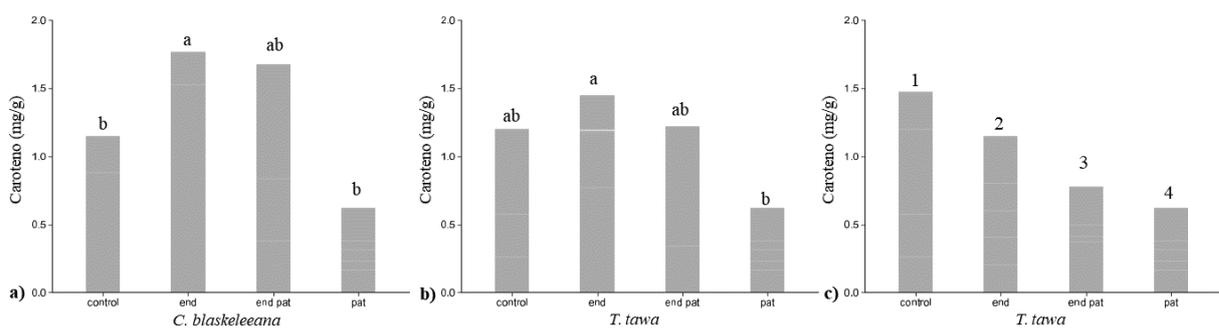


Figura 5. Efeito dos fungos endofíticos no teor de carotenoides dos tratamentos com a) *C. blaskleeana*, b) *T. tawa* e c) *C. rosea*. As barras dentro de um gráfico com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes em $p \leq 0,05$.

Reisolamento dos fungos endofíticos

Após o processo de isolamento e incubação dos fungos endofíticos isolados das folhas, foram realizadas algumas purificações até obtermos colônias livres de contaminação. Identificamos colônias semelhantes a de *T. tawa* e a do patógeno *M. pernicioso* (Figura 6. a e b). Posteriormente, serão realizadas extrações de DNA a fim de confirmar a identidades desses indivíduos.

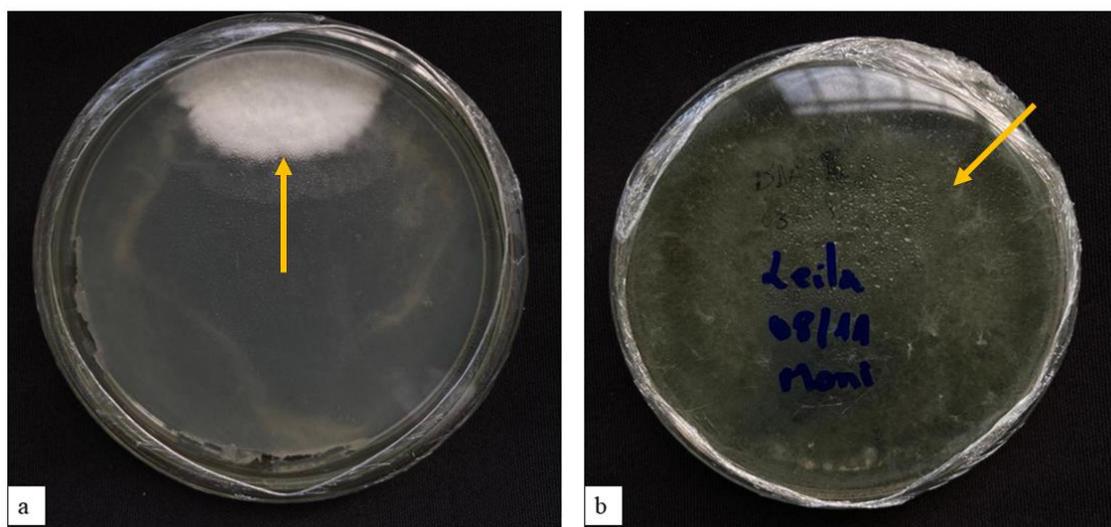


Figura 6. Fungos reisolados das folhas de cupuaçuzeiro. a) Provável colônia de *M. pernicioso*. b) Provável colônia de *T. tawa*.

Extração de RNA

Seguindo os métodos descritos acima foram realizadas extrações de RNA em amostras de plantas para testagem do método e da técnica. E obtemos os seguintes resultados (Tabela 1):

Tabela 1. Concentração e razão 260/280 de amostras de RNA extraídas de cupuaçuzeiro (*T. grandiflorum*).

Amostra	Concentração	Razão 260/280
Amostra 1	186 ng/ μ l	1,86
Amostra 2	93 ng/ μ l	1,65
Amostra 3	127 ng/ μ l	2,05

4. DISCUSSÃO

Theobroma grandiflorum (Willd. ex Spreng.) Schum. é uma árvore frutífera originária da floresta amazônica, pertencente à família Malvaceae (KUHN et al. 2010). Conhecido como cupuaçu no Brasil, *T. grandiflorum* foi disperso e domesticado pelas populações nativas da Amazônia, assim como outras árvores frutíferas de interesse (CLEMENT 1999). A cultura do cupuaçu é afetada pela doença vassoura-de-bruxa (VBD) (ALVES; RESENDE 2008) causada por *Moniliophthora perniciosa*, um basidiomiceto hemibiotrófico (AIME; PHILLIPS-MORA 2005).

A VBD é o principal fator limitante para a produção de cupuaçu, assim como para a cacauicultura no Brasil (LOPES et al. 2011). Diferentes estratégias de controle foram descritas na literatura científica para reduzir os efeitos dessa doença no cupuaçu e no cacau, entre as quais se destacam a produção de enzimas líticas por fungos e bactérias e o melhoramento genético de variedades (CUERVO-PARRA et al. 2011). A busca de microrganismos antagonistas para o controle biológico de patógenos em cultivos de importância econômica tem despertado interesse devido a suas potencialidades e à gravidade dos impactos ecológicos causados pela constante e crescente aplicação de agroquímicos nos agroecossistemas (ACEBO et al., 2012; SUÁREZ; ALBA, 2013).

Cunninghamella é um gênero de fungo pertencente à família Cunninghamellaceae que pode ser encontrado no solo, material vegetal e animal, queijo e castanha do Pará (NGUYEN et al., 2017). Membros do gênero são conhecidos pela atividade biotransformadora de fármacos antidepressivos, do metabólito ativo desloratadina (MOODY et al. 1999; KEERTHANA; VIDYAVATHI, 2018). Alguns autores relatam que *C. blaskeleeana* pode ser usado como um modelo de metabolismo de drogas em mamíferos (LIU et al. 2002).

Apesar de ainda não haver registros de atividade antagônica para fitopatógenos e promotora de crescimento, alguns autores demonstram a atividade de *C. blaskeleeana* frente a fungos e bactérias patogênicas. Alasmay et al. 2020 verificou a atividade de *C. blaskeleeana* contra *Staphylococcus aureus*, *Penicillium expansum* e *Salmonella typhimurium* identificando a produção de ácido esteárico, ácido oleico e ácido palmítico. Outra espécie do gênero, *Cunninghamella elegans*, foi capaz de biotransformar o composto piretosina em novos metabólitos ativos contra *Candida albicans* (IC₅₀ = 10–

30 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) (GALAL, 2001). *C. ellegans* associados a NPKF promoveu melhores características para tomateiros inoculados com a bactéria *Ralstonia solanacearum* indicando que o fungo pode ser utilizado como alternativa para fertilizantes convencionais, especialmente indutores de resistência para controle bacteriano (WAGNER et al. 2017).

O gênero *Trichoderma* abrange fungos filamentosos, saprofíticos, avirulentos e simbiontes vegetais oportunistas que habitam principalmente o solo. Os indivíduos do gênero empregam mecanismos diretos de biocontrole que atuam sobre patógenos, como micoparasitismo, produção de compostos antimicrobianos (antibiose), competição por espaço e nutrientes, e enzimas líticas; e mecanismos indiretos, que fortalecem as plantas, como indução de resistência sistêmica, competência da rizosfera e promoção do crescimento (SOOD 2020; CONTRERAS-CARNEJO et al. 2016).

Um estudo com *Trichoderma harzianum* demonstrou que esta espécie através da produção de ácido nanóico (AN), possui atividade inibitória *in vitro* sobre o crescimento micelial e germinação de esporos tanto para *M. pernicioso* quanto para *M. roleri* (ANEJA et al. 2005). Ainda, neste estudo foi verificada a eficácia do AN produzido por *T. harzianum*, em baixas concentrações, em comparação com o uso de fungicidas comerciais como azoxistrobina e propiconazol, que podem inibir o crescimento em 47% e 75% em *M. roleri* e *M. pernicioso*, respectivamente, até concentrações de 1 μM (ANEJA et al. 2005).

Em um estudo desenvolvido por Bailey et al. (2008), 50 isolados de *Trichoderma* sp. foram avaliados para descobrir sua capacidade de produzir metabólitos antimicrobianos que atuam tanto em *M. roleri* quanto em *M. pernicioso*. Os endófitos com grande potencial de biocontrole foram: *T. stromaticum*, *T. hamatum* e *T. asperellum*. *T. stromaticum* apresenta atividade micoparasitária em *M. pernicioso*, pelo fato de colonizar o tecido necrótico e impedir a produção de basidiocarpos através da atividade hidrolítica de proteínas secretadas no meio (LOPES et al. 2009). *T. hamatum* e *T. asperellum* indicam uma alta eficácia, porque induzem uma resposta de resistência no cacaueiro a doenças (BAILEY et al. 2008; GALARZA et al. 2015).

Um isolado de *Trichoderma harzianum* testado contra *M. pernicioso* apresentou taxas quanto ao potencial antagonista, potencial de germinação de esporos e potencial de esporulação em placa satisfatórios, configurando-o como um candidato promissor para

futuras pesquisas e produção em massa para o controle biológico da VDB (SIMÕES et al. 2012).

Entre os tratamentos, aquele cujo foi inoculado com *T. tawa* foi o que apresentou diferença significativa na altura (cm) e no número de folhas. Sabe-se que membros do gênero *Trichoderma* têm efeitos benéficos sobre as plantas, promovendo seu crescimento e melhorando sua resistência a patógenos (YU et al. 2021). A promoção do crescimento das plantas proporcionada por *Trichoderma* é atribuída à valorização da biomassa das raízes, há uma maior mobilização e absorção de nutrientes aumentando a taxa de fotossíntese na planta (HARMAN 2006), o que foi visualizado neste trabalho para altura, teores de clorofila e peso seco da biomassa da parte aérea (**Figuras 2. d e g; 3. b, d; 4. b, e, h**).

O fungo filamentososo *C. rosea* (Link: Fr.) Schroers, Samuels, Seifert & W. Gams, comb. nov. (SCHROERS et al., 1999) pode viver como micoparasita necrotrófico, matando outros fungos e alimentando-se de tecidos mortos, quanto como saprotrófico ao digerir material orgânico no solo e como colonizador benéfico de raízes de plantas (RAVNSKOV et al., 2006; KARLSSON et al., 2015). A cepa IK726 de *C. rosea* é conhecida por controlar eficazmente uma ampla gama de fungos patógenos de plantas e nematóides parasitas de plantas (JENSEN et al., 2000, 2004, 2016; COTA et al., 2008; IQBAL et al., 2018).

No presente estudo, alguns indivíduos do tratamento contendo *C. rosea* acabaram manifestando sintomas da VDB. E as médias da promoção de crescimento diferiram significativamente apenas referente ao número de folhas. A causa pode ser atribuída inoculação irregular que aconteceu neste tratamento, onde que *C. rosea* foi inoculado apenas uma vez enquanto os outros fungos endofíticos foram inoculados duas vezes em tratamento, por conta na mudança de estratégia ocorrida durante o trabalho. Além disso, o tratamento que recebeu *C. rosea*, foi inoculado com formulação *on farm* o que pode ter causado um estresse na planta por causa da alta carga de microrganismos presentes.

Porém, um estudo realizado com *M. pernicioso* destacou que a espécie foi capaz de reduzir a incidência de *M. pernicioso* em até 70% em casa de vegetação (RUBINI et al. 2005). Em outro estudo também para avaliar o controle de *Clonostachys* sp. para o *M. pernicioso* demonstrou que a taxa de controle foi de aproximadamente 50% (OLIVEIRA; ASSIS; LEAL, 2014).

C. rosea também reduziu a incidência de lesões em vagens de cacau causadas por *M. royeri* in vivo em 10% (MEJÍA et al. 2008). Em outro estudo realizado em fazendas abandonadas de cacau, *C. rosea* G-4 foi ineficaz contra monilíase, VDB e a podridão parda e quando aplicado sozinho na plantação (KRAUSS; SOBERANIS, 2002).

A fotossíntese é o processo fisiológico mais essencial para o crescimento das plantas e o teor de clorofila é usado como um indicador desse processo (SAYYAD-AMIN et al. 2016). Os pigmentos fotossintéticos são importantes marcadores de estresse (KALAJI et al.). A clorofila *a* é o principal pigmento fotossintético, enquanto a clorofila *b* e os carotenóides são pigmentos acessórios que protegem os fotossistemas de danos fotobiológicos (KITAJIMA; HOGAN 2003; DOMÍNGUEZ et al. 2016).

Neste estudo os teores de clorofila total e clorofila *a* nas repetições contendo os fungos endofíticos *C. blaskeleeana* e *T. tawa* foram significativamente mais alta que os controles. Não há registros de outros experimentos com *C. blaskeleeana* e seu efeito na teor de pigmentos fotossintéticos em cupuaçuzeiro ou em outra cultura. Um estudo com *Cunninghamella bertholletiae* inoculado em *Solanum lycopersicum* mostrou que a ação do fungo aumentou os teores de clorofila, carotenóides, glicose, frutose e sacarose e reduzindo o peróxido de hidrogênio, proteínas, metabolismo lipídico, aminoácidos, atividades antioxidantes e ácido abscísico (KAZEROONI et al. 2022)

Os achados de nosso estudo são validados ao observar o efeito de *Trichoderma* sp. sob a espécie mais próxima do cupuaçuzeiro, *T. cacao*. Mudanças de cacau inoculadas com *T. asperellum* apresentaram taxa de clorofila significativamente alta em comparação com os controles (TCHAMENI, et al 2017; ROSMANA et al. 2016).

Raffiudin et al. 2020, verificou o crescimento de mudas de cacau com aplicação de diversas composições de serragens enriquecida com 4 g de *Trichoderma* sp. e obteve resultados semelhantes onde, no tratamento com a proporção de 1:2 serragem-esterco obteve melhores resultados em diversas variáveis, entre elas o índice de clorofila e quantidades de clorofila *a*, *b* e clorofila total. Da mesma forma, outro estudo com cacau demonstrou que a aplicação de *T. breve* no ecótipo de cacau nativo de aroma fino apresentou o maior índice de clorofila aos 75 dias após o plantio, assim como uma porcentagem de colonização nos pelos radiculares de 66,67%, influências positivas para altura da planta, número de folhas e índice de clorofila (CHAVEZ et al. 2022).

Sabe-se que o desenvolvimento de pigmentos fotossintéticos nas plantas é influenciado pela presença de *Trichoderma* sp. que aumenta a matéria orgânica do solo e minerais essenciais, como nitrogênio, potássio, fósforo e magnésio, o que estimula (SOFY et al., 2021b; MARTINEZ-MEDINA et al. 2011). Estes resultados sugerem que a promoção do crescimento por *Trichoderma* sp. está estritamente relacionada com a produção de pigmentos fotossintéticos.

As repetições dos tratamentos contendo apenas os endofíticos *C. blaskleeana* e *T. tawa* também apresentaram maiores valores do teor de carotenoides. Os carotenoides (chamados pigmentos acessórios) são capazes dissipar o excesso de energia, ou seja, quanto maiores os teores destes pigmentos, menor será o estresse, sabendo que esses pigmentos são indicadores da suscetibilidade da planta à intensidade da luz, podendo amenizar esse processo através da dissipação do excesso de energia luminosa (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Apesar dos efeitos de *C. rosea* sobre o teor de clorofila não ficar claro neste estudo há relatos de que contribuiu para o aumento dos teores de clorofila para outras culturas como em Shadmani et al. 2021 onde o teor de clorofila foi maior nas plantas de cevada (*Hordeum vulgare*) infectadas com os fungos endofíticos ($p < 0,05$) do que as plantas não inoculadas sob estresse de cádmio Cd. Por outro lado, dendezeiros (*Elaeis guineenses*) inoculados com *C. rosea*, apresentaram teores de clorofila (a e b) e carotenóides semelhantes, inclusive com os controles (GOH et al. 2020). Novos experimentos são necessários para afirmar o efeito de *C. rosea* nos teores de clorofila do cupuaçuzeiro.

5. CONCLUSÃO

Microrganismos endofíticos são grandes fontes de compostos e mecanismos de interação onde beneficiam a si próprio, e seu hospedeiro conferindo-lhe resistência e maior absorção de nutrientes. Como já relatado em outros estudos o gênero *Trichoderma* sp. tem forte potencial antagonista e promotor de crescimento, e seus benefícios já vem sendo utilizados ao redor do mundo na manutenção de culturas. O gênero *Cunninghamella* sp., apesar de ser muito examinado quanto a seus metabólitos, pouco se tem estudos sobre a interação com outro microrganismo *in vitro* ou *in vivo*. Nesse estudo, além de relatarmos o primeiro experimento com *C. blaskleeana* no controle biológico

de fitopatógenos em plantas, demonstramos que ele possui potencial para próximas pesquisas envolvendo controle biológico.

6. CONCLUSÕES GERAIS

A espécie *M. pernicioso* possui um nicho e distribuição geográfica ampla e quem sabe, ainda desconhecida. O primeiro relato de *M. pernicioso* em *H. acutifolia* foi descrito no estado do Acre, abrindo possibilidades de que provavelmente outros biótipos ocorram em nossa região.

Os microrganismos endofíticos são uma fonte promissora de compostos, metabólitos e mecanismos de inibição de outro indivíduo. Esse potencial tem sido cada vez mais observado e utilizado ao redor do mundo. Na Amazônia, um dos biomas mais diversos, os gêneros mais testados foram *Trichoderma* sp. e *Bacillus* sp. demonstrando a eficácia e multiação desses indivíduos. Os hospedeiros mais utilizados foram *P. cupana*, *T. cacao* e *H. brasiliensis* sugerindo a urgência de alternativas de controle e manutenção para espécies comerciais.

A utilização de microrganismos endofíticos é uma alternativa mais sustentável, barata e, principalmente, eficaz de manutenção e controle de doenças. Nos estudos já realizados, é possível verificar o efeito positivo desses indivíduos na promoção de crescimento em diversas variáveis, que podem ser utilizadas para diversos fins, desde comprovar a eficácia do microrganismo a medir a produtividade de uma cultura. Nosso estudo é pioneiro utilizando *C. blaskeleeana* no controle biológico de fungos patogênicos em plantas, além disso, obtemos resultados promissores. Novos estudos são necessários para avaliar essa interação, a fim de obter um microrganismo eficiente e aplicável de fato nas culturas para controle biológico da vassoura-de-bruxa no cupuaçuzeiro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEBO-GUERRERO, Y. et al. Management of black pod rot in cacao (*Theobroma cacao* L.): a review. **Fruits**, v. 67, n. 1, p. 41-48, 2012.
- AGUIRRE-GÜITRÓN, et al. Application of powder formulation of *Meyerozyma caribbica* for postharvest control of *Colletotrichum gloeosporioides* in mango (*Mangifera indica* L.) **LWT**, v. 113, p.108271, 2019.
- ALASMARY, F. A. et al. Evaluation of the chemical constituents and potential biological activities of *Cunninghamella blakesleeana*. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 28, n. 10, p. 1197-1202, 2020.
- ALVES R. M.; RESENDE M. D. V. Avaliação genética de indivíduos e progênes de cupuaçuzeiro no estado do Para e estimativas de parâmetros genético. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, p. 696-701, 2008.
- ALVES, R. M. et al. Evolução da vassoura-de-bruxa e avaliação da resistência em progênes de cupuaçuzeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, p. 1022-1032, 2009.
- ALVES, R M. et al. Avaliação e seleção de progênes de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*), em Belém, Pará. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 1, p. 204-212, 2010.
- ALVES R. M. et al. Diversidade genética em coleções amazônicas de germo-plasma de cupuaçuzeiro [*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.]. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, 818–828, 2013.
- ANDREWS, S. FastQC: a Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. **Babraham Bioinformatics version 0.11.7**. 2010.
- ANEJA, M.; GIANFAGNA, T. J.; HEBBAR, P. K. *Trichoderma harzianum* produces nonanoic acid, an inhibitor of spore germination and mycelial growth of two cacao pathogens. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 67, n. 6, p. 304-307, 2005.
- ARAÚJO, W. L. et al. **Guia prático: Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: Copiadora "Luiz de Queiroz", 2010, 167 p.
- ARGOUT, X. SALSE, J. AURY, J. M. GUILTINAN, M. J. DROC, G. GOUZY, J. LANAUD, C. The genome of *Theobroma cacao*. **Nature genetics**, v. 43, n. 2, p. 101-108, 2011.
- ARSLAN, M.; AFZAL, M.; AMIN, I.; IQBAL, S.; KHAN, Q. M. Nutrients can enhance the abundance and expression of alkane hydroxylase CYP153 gene in the rhizosphere of ryegrass planted in hydrocarbon-polluted soil. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e111208, 2014.

AZEVEDO, H.; LINO-NETO, T.; TAVARES, R. M. An improved method for high-quality RNA isolation from needles of adult maritime pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 21, n. 4, p. 333-338, 2003.

BAĆMAGA, M.; WYSZKOWSKA, J.; KUCHARSKI, J. Bioestimulação como processo auxiliando na degradação do tebuconazol no solo. **Journal of Soils and Sediments**, v. 19, n. 11, pág. 3728-3741, 2019.

BAILEY, B. A. et al. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. **Biological control**, v. 46, n. 1, p. 24-35, 2008.

BAMISILE, Bamisope S. et al. Endófitos fúngicos: além do manejo de herbívoros. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 544, 2018.

BOLGER, A M.; LOHSE, M; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014.

BRUNO, V. M. et al. Anotação abrangente do transcriptoma do patógeno fúngico humano *Candida albicans* usando RNA-seq. **Pesquisa do genoma**, v. 20, n. 10, pág. 1451-1458, 2010.

BUELL, C. B.; WESTON, W. H. Application of the mineral oil conservation method to maintaining collections of fungous cultures. **American Journal of Botany**, v. 34, n. 10, p. 555-561, Dec. 1947.

BUSBY, P. E.; PEAY, K. G.; NEWCOMBE, J. Fungos foliares comuns de *Populus trichocarpa* modificam a severidade da ferrugem *Melampsora*. **New Phytologist**, v. 209, n. 4, pág. 1681-1692, 2016.

CASTELLANI, A. The "water cultivation" of pathogenic fungi. **The Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n.1, p. 283 - 4, 1963.

CHAVEZ-JALK, A. et al. Effect of Endophytic *Trichoderma sp.* Strains on the Agronomic Characteristics of Ecotypes of *Theobroma cacao* L. under Nursery Conditions in Peru. **International Journal of Agronomy**, v. 2022, 2022.

CHRISTIAN, N.; HERRE, E. A.; CLAY, K. Fungos endofíticos foliares alteram os padrões de absorção e distribuição de nitrogênio em *Theobroma cacao*. **New Phytologist**, v. 222, n. 3, pág. 1573-1583, 2019.

CLEMENT, C. R. 1492 and the loss of Amazonian crop genetic resources. I. The relation between domestication and human population decline. **Economic Botany**, v. 53, n. 2, p. 188-202, 1999.

COMPANT, S. et al. Uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas para o biocontrole de doenças de plantas: princípios, mecanismos de ação e perspectivas futuras. **Microbiologia Aplicada e Ambiental**, v. 71, n. 9, pág. 4951-4959, 2005.

CONESA, A.; GÖTZ, S. Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. **International journal of plant genomics**, v. 2008, 2008.

COTA, L. V. et al. Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions. **Biological Control**, v. 46, n. 3, p. 515-522, 2008.

CUERVO-PARRA, J. A. et al. 2011. Efeito antagônico de *Trichoderma harzianum* VSL291 em fungos fitopatogênicos isolados de frutos de cacau (*Theobroma cacao* L.). **Afr J Biotechnol**. v. 10, n.52, p. 10657-10663, 2011.

DA SILVA SANTOS, S. D. S., DA SILVA, A. A. D., POLONIO, J. C., POLLI, A. D., ORLANDELLI, R. C., DOS SANTOS OLIVEIRA, J. A. D. S., ... & PAMPHILE, J. A. Influence of plant growth-promoting endophytes *Colletotrichum siamense* and *Diaporthe masirevici* on tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Mycology**, p. 1-14, 2022.

DE SILVA, N. I. et al. Uso de endófitos como agentes de biocontrole. **Revisões de Biologia Fúngica**, v. 33, n. 2, pág. 133-148, 2019.

DINIZ, F. V.; DE ARAÚJO, A. V.; DA SILVA FARIA, M. A.; ELISABETE, M.; MORSELLI, P.; RAMOS, L. J.; CARVALHO, C. M. Cultivable endophytic fungi associated with the murumuru Amazon palm (*Astrocaryum ulei* Burret). **Scientia Vitae**, v. 12, n. 34, p. 23-32, 2021.

DOMINGUEZ, S. et al. Nitrogen metabolism and growth enhancement in tomato plants challenged with *Trichoderma harzianum* expressing the *Aspergillus nidulans* acetamidase amdS gene. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1182, 2016.

ELJOUNAIDI, K.; LEE, S. K.; BAE, H. Endófitos bacterianos como potenciais agentes de biocontrole das doenças da murcha vascular – revisão e perspectivas futuras. **Controle Biológico**, v. 103, p. 62-68, 2016.

FERRAZ DOS SANTOS, Lucas et al. Desenvolvimento do fruto do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* [Willd. ex Sprengel] Schumann): genes-chave envolvidos no metabolismo primário e na resposta ao estresse. **Agronomia**, v. 12, n. 4, pág. 763, 2022.

FERREIRA, E. M. S. et al. Verificação da produção de substâncias antimicrobianas por fungos endofíticos associados à Soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Revista Cereus**, v. 10, n. 3, p. 92-102, 2018.]

FRIAS, G. A.; PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. An inoculation method for evaluating resistance of cacao to *Crinipellis pernicioso*. **Plant Diseases**, v. 79, p. 787-791, 1995.

GABARDO, G. et al. Physiological responses of soybean cultivars NA5909 and TMG7062 submitted to different products to control fungal diseases in the field. **Brazilian Journal of Development**, vol. 6, no. 3, p. 15673-15689, 2020.

GABARDO, G. et al. Respostas fisiológicas das cultivares de soja NA5909 e TMG7062 submetidas a diferentes produtos para controle de doenças fúngicas em campo. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 3, p. 15673-15689, 2020.

- GALAL, A. M. Microbial transformation of pyrethrosin. **Journal of natural products**, v. 64, n. 8, p. 1098-1099, 2001.
- GALARZA, L. et al. Characterization of *Trichoderma* species isolated in Ecuador and their antagonistic activities against phytopathogenic fungi from Ecuador and Japan. **Journal of General Plant Pathology**, v. 81, n. 3, p. 201-210, 2015.
- GAN, X. et al. Multiple reference genomes and transcriptomes for *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, v. 477, no. 7365, pg. 419-423, 2011.
- GERIN, D. et al. RNA-Seq reveals transcriptional alterations of OTA-related genes in *Aspergillus carbonarius*. *PLoS One*, v. 11, no. 1, pg. e0147089, 2016.
- GOH, Yit Kheng et al. Biocontrol and plant-growth-promoting traits of *Talaromyces apiculatus* and *Clonostachys rosea* consortium against Ganoderma basal stem rot disease of oil palm. **Microorganisms**, v. 8, n. 8, p. 1138, 2020.
- GRABHERR, M. G. et al. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. **Nature biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 644, 2011.
- GRAMACHO, K. P. et al. Pathogenic variability of *Moniliophthora perniciosa* in three agroecological zones of the cacao region of Bahia, Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 16, p. 7-13, 2016.
- GUIDA, A. et al. Using RNA-seq to determine the transcriptional landscape and hypoxic response of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *BMC genomics*, v. 12, no. 1, pg. 1-14, 2011.
- HARRISON, J. G.; GRIFFIN, E. A. The diversity and distribution of endophytes across biomes, plant phylogeny and host tissues: how far have we come and where do we go from here? **Environmental microbiology**, v. 22, n. 6, p. 2107-2123, 2020.
- HAZARIKA, D. J., et al. Lipopeptide mediated biocontrol activity of endophytic *Bacillus subtilis* against fungal phytopathogens. **BMC Microbiology**, v. 19, n.71, 2019.
- HOYOS CARVAJAL, L. M. et al. Evaluación de *Trichoderma asperellum* como biorregulador de *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*. **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, v. 61, n. 2, p. 4496-4502, 2008.
- HUANG, L. et al. The potential of endophytic fungi isolated from cucurbit plants for the biocontrol of soil fungal diseases in cucumber. **Microbiological research**, v. 231, p. 126369, 2020.
- IBGE. **Produção de cupuaçu**. Acesso em 25 novembro de 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/cupuacu/ac>
- IQBAL, M. et al. Evaluation of *Clonostachys rosea* for control of plant-parasitic nematodes in soil and in roots of carrot and wheat. **Phytopathology**, v. 108, n. 1, p. 52-59, 2018.

- JENSEN, B.; KNUDSEN, I.; JENSEN, D. F. Biological seed treatment of cereals with fresh and long-term stored formulations of *Clonostachys rosea*: biocontrol efficacy against *Fusarium culmorum*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 106, n. 3, p. 233-242, 2000.
- JENSEN, B. et al. Biopriming of infected carrot seed with an antagonist, *Clonostachys rosea*, selected for control of seedborne *Alternaria* spp. **Phytopathology**, v. 94, n. 6, p. 551-560, 2004.
- JENSEN, B.; LÜBECK, P. S.; JØRGENSEN, H. J. L. *Clonostachys rosea* reduces spot blotch in barley by inhibiting prepenetration growth and sporulation of *Bipolaris sorokiniana* without inducing resistance. **Pest management science**, v. 72, n. 12, p. 2231-2239, 2016.
- JOHNSON, X.; ALRIC, J. Central carbon metabolism and electron transport in *Chlamydomonas reinhardtii*: metabolic constraints for carbon partitioning between oil and starch. **Eukaryotic cell**, v. 12, n. 6, p. 776-793, 2013.
- KARLSSON, M. et al. Insights on the evolution of mycoparasitism from the genome of *Clonostachys rosea*. **Genome biology and evolution**, v. 7, n. 2, p. 465-480, 2015.
- KEERTHANA, M.; VIDYAVATHI, M. Screening and evaluation of fungal resources for loratadine metabolites. **Journal of biosciences**, v. 43, n. 5, p. 823-833, 2018.
- KITAJIMA, K.; HOGAN, K. P. Increases of chlorophyll a/b ratios during acclimation of tropical woody seedlings to nitrogen limitation and high light. **Plant, Cell & Environment**, v. 26, n. 6, p. 857-865, 2003.
- KAZEROONI, E. A. et al. Effects of the rhizosphere fungus *Cunninghamella bertholletiae* on the *Solanum lycopersicum* response to diverse abiotic stresses. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 16, p. 8909, 2022.
- KRAUSS, U.; W. SOBERANIS. Effect of fertilization and biocontrol application frequency on cacao pod diseases. **Biological Control**, v. 24., p.82-89. 2002.
- KUHN, D. N. et al. Evaluating *Theobroma grandiflorum* for comparative genomic studies with *Theobroma cacao*. **Tree Genetics & Genomes**, v. 6, n. 5, p. 783-792, 2010.
- KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chemistry and Biology**, v.19, p.7, p.792-798, 2012.
- KUSARI, S.; SINGH, S.; JAYABASKARAN, C. Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi: hope versus hype. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n.6, p.297- 303, 2014.
- LACAVALA, P. T.; AZEVEDO, J. L. Biological control of insect-pest and diseases by endophytes. In: **Advances in Endophytic research**. Springer, New Delhi, 2014. p. 231-256.

- LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature methods**, v. 9, n. 4, p. 357, 2012.
- LATA, R. et al. Indução de tolerância ao estresse abiótico em plantas por micróbios endofíticos. **Cartas em microbiologia aplicada**, v. 66, n. 4, pág. 268-276, 2018.
- LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. **Bioinformatics**, v. 25, n. 14, p. 1754-1760, 2009.
- LICHTENTHALER, H. K.; WELLBURN, A R. **Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents**. 1983.
- LIU, L. et al. Capability of *Cunninghamella blakesleana* to transform verapamil. **CHINESE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY**, v. 16, n. 4, p. 292-298, 2002.
- LOPES, U. V. et al. Cacao breeding in Bahia, Brazil: strategies and results. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** [online], v. 11, n. spe, pp. 73-81, 2011.
- KALAJI, H. M. et al. Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. **Acta physiologiae plantarum**, v. 38, n. 4, p. 1-11, 2016.
- MÁRQUEZ, L. M. et al. Um vírus em um fungo em uma planta: simbiose de três vias necessária para tolerância térmica. **Ciência**, v. 315, n. 5811, pág. 513-515, 2007.
- MARTÍNEZ-MEDINA, A.; ROLDÁN, A.; PASCUAL, J. A. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma harzianum* under conventional and low input fertilization field condition in melon crops: growth response and *Fusarium wilt* biocontrol. **Applied Soil Ecology**, v. 47, n. 2, p. 98-105, 2011.
- MOODY, J. D.; FREEMAN, J. P.; CERNIGLIA, C. E. Biotransformation of doxepin by *Cunninghamella elegans*. **Drug metabolism and disposition**, v. 27, n. 10, p. 1157-1164, 1999.
- MORTAZAVI, A. et al. Mapeamento e quantificação de transcriptomas de mamíferos por RNA-Seq. **Métodos da natureza**, v. 5, n. 7, pág. 621-628, 2008.
- MORIYA, Y. et al. An automatic genome annotation and pathway reconstruction server. **Nucleic acids research**, v. 35, n. suppl_2, p. W182-W185, 2007.
- NGUYEN, T. T. T.; CHOI, Y. J.; LEE, H. B. Isolation and characterization of three unrecorded Zygomycete fungi in Korea: *Cunninghamella bertholletiae*, *Cunninghamella echinulata*, and *Cunninghamella elegans*. **Mycobiology**, v. 45, n. 4, p. 318-326, 2017.
- NUNES, A.M.L. et al. Epidemiologia da vassoura-debruxa do cupuaçuzeiro. In: EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental. **Geração de**

tecnologia agroindustrial para o desenvolvimento do trópico úmido. Belém, 1996. p.83-105. (Documentos, 85).

OROS, G.; NAÁR, Z. Mycofungicide: *Trichoderma* based preparation for foliar applications. **American Journal of Plant Sciences**, v. 8, n. 2, p. 113-125, 2017.

PANACCIONE, D. G.; BEAULIEU, W. T.; COOK, D. Bioactive alkaloids in vertically transmitted fungal endophytes. **Functional Ecology**, v.28, n. 2, p. 299-314, 2014.

PUJADE-RENAUD, V. et al. Endophytes of wild rubber trees as antagonists of the pathogen *Corynespora cassiicola*. **Phytopathology**, v. 109, no. 11, pg. 1888-1899, 2019.

RAHMAN, L. et al. An assessment on the role of endophytic microbes in the therapeutic potential of *Fagonia indica*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.16, n.1, p. 53, 2017.

RAVNSKOV, S. et al. Soil inoculation with the biocontrol agent *Clonostachys rosea* and the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* results in mutual inhibition, plant growth promotion and alteration of soil microbial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, n. 12, p. 3453-3462, 2006.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139-140, 2010.

RODRIGUEZ, R. J. et al. Tolerância ao estresse em plantas via simbiose adaptada ao habitat. **A revista ISME**, v. 2, n. 4, pág. 404-416, 2008.

ROILIDES, E.; IOSIFIDIS, E. Acquired resistance in fungi: how large is the problem? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 7, p. 790–791, 2019.

ROSMANA, A et al. Endophytic association of *Trichoderma asperellum* within *Theobroma cacao* suppresses vascular streak dieback incidence and promotes side graft growth. **Mycobiology**, v. 44, n. 3, p. 180-186, 2016.

SANJEEV, K.; MANIBHUSHAN, T.; ARCHANA, R. A. N. I. *Trichoderma*: Mass production, formulation, quality control, delivery and its scope in commercialization in India for the management of plant diseases. **African journal of agricultural research**, v. 9, n. 53, p. 3838-3852, 2014.

SAYYAD-AMIN, P., JAHANSOOZ, M., BORZOUEI, A. AND AJILI, F. (2016) Changes in photosynthetic pigments and chlorophyll-a fluorescence attributes of sweet-forage and grain sorghum cultivars under salt stress. *J Biol Phys* 42, 601–620

SCHROERS, HJ. et al. Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. **Mycologia**, v. 91, n. 2, p. 365-385, 1999.

- SHADMANI, L.; JAMALI, S.; FATEMI, A. Isolation, identification, and characterization of cadmium-tolerant endophytic fungi isolated from barley (*Hordeum vulgare* L.) roots and their role in enhancing phytoremediation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 1097-1106, 2021.
- SHARMA, K. K. et al. Seed treatments for sustainable agriculture-A review. **Journal of Applied and Natural Science**, v. 7, n. 1, p. 521-539, 2015.
- SIMÕES, M. L. G. et al. Evaluation of *Trichoderma* spp. for the Biocontrol of *Moniliophthora perniciosa* Subgroup 1441. **Journal of biology and Life Science**, v. 3, p. 18-36, 2012.
- SOOD, M. et al. *Trichoderma*: The “secrets” of a multitalented biocontrol agent. **Plants**, v. 9, n. 6, p. 762, 2020.
- SOFY, A. R. et al. Molecular characterization of the Alfalfa mosaic virus infecting *Solanum melongena* in Egypt and the control of its deleterious effects with melatonin and salicylic acid. **Plants**, v. 10, n. 3, p. 459, 2021.
- SOUZA, N. T. et al. Potencial antagonista e controle *in vivo* de *Moniliophthora perniciosa* por fungos endofíticos do cupuaçuzeiro. In: **52º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2021**. Anais do 52º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2021. v. 52.
- SUÁREZ CONTRERAS, L. Y.; RANGEL RIAÑO, A, L. Aislamiento de microorganismos para control biológico de *Moniliophthora roreri*. **Acta Agronómica**, v. 62, n. 4, p. 370-378, 2013.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 858 p.
- TCHAMENI, S. N. et al. Antagonism of *Trichoderma asperellum* against *Phytophthora megakarya* and its potential to promote cacao growth and induce biochemical defence. **Mycology**, v. 8, n. 2, p. 84-92, 2017.
- TRAPNELL, C. et al. RNA-Seq transcription assembly and quantification reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature's Biotechnology*, v. 28, no. 5, pg. 511-515, 2010.
- WAGNER, S. O. et al. Biological control of the bacterial wilt *Ralstonia solanacearum* by bioprotector with fungi chitosan from *Cunninghamella elegans* on tomatoes. **African Journal of Agricultural Research**, v. 12, n. 1, p. 42-49, 2017.
- WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: A Revolutionary Tool for Transcriptomics. **Nature reviews genetics**, v. 10, no. 1, pg. 57-63, 2009.
- YU, Z. et al. Biocontrol and growth-promoting effect of *Trichoderma asperellum* TaspHu1 isolate from *Juglans mandshurica* rhizosphere soil. **Microbiological Research**, v. 242, p. 126596, 2021.

ZHAO, C. et al. RNA-Seq analysis reveals new gene models and alternative splicing in the fungal pathogen *Fusarium graminearum*. **BMC genomics**, v. 14, no. 1, pg. 1-16, 2013.

ZUBROD, J. P. et al. Fungicides: An overlooked pesticide class? **Environmental Science and Technology**, v. 53, n. 7, p. 3347–3365, 2019.