

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO CAMPUS RIO VERDE
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BACHARELADO)**

ISABELLA DE OLIVEIRA SILVA

**A INOCULAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS PARA CONTROLE DA
SEVERIDADE DA RAMULOSE EM PLANTAS DE *Gossypium hirsutum***

**RIO VERDE, GO
DEZEMBRO/2022**

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO CAMPUS RIO VERDE
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BACHARELADO)**

ISABELLA DE OLIVEIRA SILVA

**A INOCULAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS PARA CONTROLE DA
SEVERIDADE DA RAMULOSE EM PLANTAS DE *Gossypium hirsutum***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Rio Verde, como parte das exigências da disciplina TCC214 – Trabalho de Curso II, do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas.

ORIENTADORA: Dr^a LUCIANA CRISTINA VITORINO

RIO VERDE, GO

DEZEMBRO/2022

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

OOL48i Oliveira Silva, Isabella
A inoculação de fungos endofíticos no controle da
severidade da ramulose em plantas de *Gossypium*
hirsutum / Isabella Oliveira Silva; orientadora Dr^a
Luciana Vitorino. -- Rio Verde, 2022.
25 p.

TCC (Graduação em Bacharelado em Ciências
Biológicas) -- Instituto Federal Goiano, Campus Rio
Verde, 2022.

1. Biocontrole. 2. Fitopatógeno. 3. Doenças
Fúngicas. 4. Antibiose. 5. *Colletotrichum*. I.
Vitorino, Dr^a Luciana, orient. II. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica (assinale com X)

- Tese
- Dissertação
- Monografia - Especialização
- Artigo - Especialização
- TCC - Graduação
- Artigo Científico
- Capítulo de Livro
- Livro
- Trabalho Apresentado em Evento
- Produção técnica. Qual: _____

Nome Completo do Autor: Isabella de Oliveira Silva

Matrícula: 2019102230540220

Título do Trabalho: **A INOCULAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS NO CONTROLE DA SEVERIDADE DA RAMULOSE EM PLANTAS DE *Gossypium hirsutum***

Restrições de Acesso ao Documento [Preenchimento obrigatório]

Documento confidencial: Não Sim, justifique:

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 01/01/2023

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

1. O documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
2. Obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
3. Cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Rio Verde, 13 de dezembro de 2022

Isabella de Oliveira Silva

Assinado eletronicamente pelo o Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:

Dr^a Luciana Cristina Vitorino

Orientador(a)

Assinatura eletrônica do(a) orientador(a)

Documento assinado eletronicamente por:

- Isabella de Oliveira Silva, 2019102230540220 - Discente, em 13/12/2022 20:42:05.
- Luciana Cristina Vitorino, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 13/12/2022 19:45:35.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 13/12/2022. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 452839
Código de Autenticação: 524d268c01



INSTITUTO FEDERAL GOIANO
Campus Rio Verde
Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, 01, Zona Rural, RIO VERDE / GO, CEP 75901-970
(64) 3624-1000



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Ata nº 82/2022 - GGRAD-RV/DE-RV/CMPRV/IFGOIANO

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CURSO

Aos dois dias do mês de dezembro de dois mil e vinte e dois, às 08 horas, reuniu-se a banca examinadora composta pelos docentes: Luciana Cristina Vitorino (Orientadora, IF Goiano Campus Rio Verde), Ana Flávia de Souza Rocha (Superintendente da Secretaria Municipal de Agricultura de Quirinópolis) e Mateus Neri Oliveira Reis (IF Goiano Campus Rio Verde), para examinar o Trabalho de Conclusão de Curso (TC2) intitulado "A inoculação de fungos endofíticos para controle da severidade da ramulose em plantas de *Gossypium hirsutum*" do(a) estudante Isabella de Oliveira Silva, matrícula nº 2019102230540220 do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas do IF Goiano – Campus Rio Verde. A palavra foi concedida à estudante para a apresentação oral do TC, houve arguição do candidato pelos membros da banca examinadora. Após tal etapa, a banca examinadora decidiu pela **APROVAÇÃO** da estudante com as indicações para reformulação. Ao final da sessão pública de defesa foi lavrada a presente ata que segue assinada pela orientadora em nome dos demais membros da banca.

(Assinado Eletronicamente)

Luciana Cristina Vitorino

Orientadora

(Assinado Eletronicamente pela orientadora)

Ana Flávia de Souza Rocha

Membro

(Assinado Eletronicamente)

Mateus Neri Oliveira Reis

Membro

Documento assinado eletronicamente por:

- **Mateus Neri Oliveira Reis, 2021202320140009 - Discente**, em 05/12/2022 09:39:32.
- **Luciana Cristina Vitorino, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO**, em 05/12/2022 09:24:39.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 05/12/2022. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 449621

Código de Autenticação: 1dcc7a0ac2



INSTITUTO FEDERAL GOIANO
Campus Rio Verde
Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, 01, Zona Rural, RIO VERDE / GO, CEP 75901-970
(64) 3624-1000

SUMÁRIO

1. RESUMO	4
2. ABSTRACT	5
3. INTRODUÇÃO	6
4. OBJETIVOS	8
4.1. Objetivo geral	8
4.2. Objetivos específicos	8
5. MATERIAIS E MÉTODOS	9
5.1. Obtenção dos isolados fúngicos e sementes contaminadas por Colletotrichum gossypii	9
5.2. Teste de antibiose In Vitro	11
5.3. Preparo do solo e plantio	12
5.4. Avaliações biométricas, fotossintéticas e fotoquímicas	13
5.5. Delineamento experimental e análises estatísticas	14
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
6.1. Inibição In Vitro	15
6.2. Inibição In Vivo	16
6.3. Parâmetros fotossintéticos	19
6.3.1. Fluorescência da clorofila a	19
6.3.2. Trocas gasosas	22
7. CONCLUSÃO	22
8. REFERÊNCIAS	23

1. RESUMO

Microrganismos fitopatogênicos, como *Colletotrichum gossypii* var. podem atacar plantas de *Gossypium hirsutum* durante seu desenvolvimento, comprometendo seu potencial fisiológico. Como micro-organismos rizosféricos e endofíticos competem com fitopatógenos por nichos ecológicos, levantou-se a hipótese de que fungos simbióticos à palmeira *Butia purpurascens*, endêmica do cerrado, pudessem ser utilizados na proteção de plantas de algodão, na tentativa de se reduzir os efeitos deletérios da ramulose provocada pelo fungo deteriorador *Colletotrichum gossypii* var. na planta adulta. Para testar esta hipótese, foram avaliadas plantas resultantes da inoculação com quatro fungos simbióticos, selecionados a partir de testes de antibiose previamente realizados in vitro. As sementes infestadas por *Colletotrichum gossypii* var. e associadas aos fungos endofíticos, foram cultivadas em mistura solo e substrato previamente autoclavado, em sistema de vasos, em casa de vegetação. As avaliações foram realizadas no estágio fenológico vegetativo do algodão, sendo avaliados caracteres biométricos de crescimento, incluindo biomassa seca e fresca, síntese de pigmentos fotossintéticos, padrões fotossintéticos e fluorescência da clorofila *a*. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e testes de média para se verificar o efeito inoculação dos fungos endofíticos sobre o controle do fitopatógeno *Colletotrichum gossypii* var, diminuindo os efeitos deletérios da ramulose sobre crescimento e manutenção das características fisiológicas da planta. No geral, o endofítico *Hamigera insecticola* (BP33EF) demonstrou melhor desempenho para controle da severidade fisiológica dos sintomas da ramulose provocado por *Colletotrichum gossypii* em plantas de algodão, induzindo o maior acúmulo de biomassa seca e fresca, desempenho fotoquímico acima do verificado nas plantas controle e maiores índices de estresse fotoquímico. Plantas inoculadas com o endofítico BP328EF = *Codinaeopsis* sp., no entanto, tenderam a apresentar maiores médias para taxa fotossintética (A), condutância estomática (gsw) e transpiração (E), indicando uma melhora relativa na capacidade fotossintética das plantas em relação às plantas controle. Os resultados obtidos neste trabalho estimularão novos estudos acerca dos endofíticos endêmicos do Cerrado, abrindo perspectivas para aplicações futuras no controle total da ramulose do algodão.

Palavras – Chave: Biocontrole; Fitopatógeno; Doenças fúngicas; Antibiose; *Colletotrichum*.

2. ABSTRACT

Phytopathogenic microorganisms such as *Colletotrichum gossypii* var. can attack *Gossypium hirsutum* plants during their development, compromising their physiological potential. As rhizospheric and endophytic microorganisms compete with phytopathogens for ecological niches, avoiding the hypothesis that symbiotic fungi to the *Butia purpurascens* palm tree, endemic to the cerrado, could be used in the protection of cotton plants, in an attempt to epheriosites selectors the reducing effects of ramulosis caused by the spoilage fungus *Colletotrichum gossypii* var. on the adult plant. To test this hypothesis, plants resulting from inoculation with four symbiotic fungi, selected from antibiosis tests previously performed in vitro, were evaluated. Seeds infested by *Colletotrichum gossypii* var. and associated with endophytic fungi, were grown mixed in soil and previously autoclaved, in a vase system, in a greenhouse. Estimates were performed at the vegetative phenological stage of cotton, evaluating biometric growth traits, including dry and fresh biomass, synthesis of photosynthetic pigments, photosynthetic patterns and chlorophyll a fluorescence. The data obtained were examined by analysis of variance and mean tests to verify the effect of inoculation of endophytic fungi on the control of the phytopathogen *Colletotrichum gossypii* var, observing the deleterious effects of ramulose on growth and maintenance of plant characteristics. In general, the endophytic *Hamigera inseticola* (BP33EF) showed better performance to control the physiological severity of the symptoms of ramulosis induced by *Colletotrichum gossypii* in cotton plants, inducing the highest accumulation of dry and fresh biomass, photochemical performance above the verifice and control plants higher rates of photochemical stress. Plants inoculated with the endophytic BP328EF = *Codinaeopsis* sp., however, tended to show higher means for photosynthetic rate (A), stomatal conductance (gsw) and transpiration (E), indicating a relative improvement in the photosynthetic capacity of the plants in relation to the control. The results obtained in this work will stimulate new studies about the endemic Cerrado endophytes, opening perspectives for future applications in the total control of cotton ramulose.

Keywords: Biocontrol; Phytopathogen; Fungal diseases; Antibiosis; *Colletotrichum*.

3. INTRODUÇÃO

Popularmente conhecido como Algodoeiro, a espécie *Gossypium hirsutum* é anexada à família Malvaceae, caracterizado como um subarbusto de ambiente semiárido, não endêmico do Brasil (DANTAS, 2018). A cultura do algodoeiro é cultivada a bastante tempo e de sua planta se aproveita desde o caroço para a extração do óleo e farelo vegetal, até a fibra muito utilizada na área têxtil (MALERBO & COUTO, 1990).

Por se tratar de uma espécie não endêmica, o Algodoeiro apresenta certa sensibilidade em relação ao seu cultivo, necessitando de um clima quente e úmido adequado para concluir seu ciclo (DANTAS, 2018). Durante sua cultura, pragas como insetos, lagartas e microrganismos fitopatogênicos acometem as plantas causando danos em diferentes partes do organismo que incorre em grandes perdas econômicas (CONSTANTIN et al, 2020).

Microrganismo interagem com as plantas ao se associarem às raízes, caules e folhas (SCHARNAGL, 2019). Essas interações podem ser negativas provocando determinadas doenças para a planta ou, positivas trazendo benefícios ao indivíduo ao estabelecerem uma relação de simbiose (SCHARNAGL, 2019). Dentre os muitos efeitos da associação planta-microrganismo, destacam-se a habilidade em promover o crescimento vegetal e aumentar a produtividade ao ativarem metabolismos de tolerância a estresse bióticos e abióticos, como a resistência a fitopatógenos (AHMED et al., 2016).

Vários fatores podem interferir na produtividade do algodoeiro e, dentre eles, são citadas inúmeras doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides (TANAKA, 1990).

Causada pelo fungo *Colletotrichum gossypii* a Ramulose do algodoeiro é uma das principais doenças que acometem o cultivo de algodão (MORENO-MORAN & BURBANO-FIGUEROA, 2019). *Colletotrichum* é um dos gêneros mais importantes de fungos fitopatogênicos com mais de 200 espécies conhecidas por causar doenças em plantações ao redor do mundo (DE SILVA, 2019). Este fungo infecta as folhas, pecíolos e caule provocando nanismo e superbrotamento dos ramos o que prejudica a formação de capulhos e, conseqüentemente, o rendimento do algodoeiro (NOGUEIRA et al., 2013).

Segundo Talhinhos e Baroncelli (2021), as espécies de *Colletotrichum* são caracterizadas por um estilo de vida hemibiotrófico distinto, nesse sentido, os fungos pertencentes a este gênero infectam inicialmente através de uma breve fase biotrófica, associada a grandes hifas primárias intracelulares. Posteriormente, o fungo muda para uma fase necrotrófica, associada a hifas secundárias mais estreitas que se espalham por todo o tecido do hospedeiro (TALHINHAS & BARONCELLI, 2021).

Este fungo patogênico é transmitido através de sementes contaminadas e/ou infectadas (LIMA et al., 1985). As sementes portadoras do patógeno constituem a principal fonte de inóculo e as lesões de plantas infectadas representam uma fonte de inóculo secundário (ARAÚJO et al., 2006). A incidência desta doença sobre o cultivo de algodão pode gerar perdas de até 80% da produção (OLIVEIRA et al., 2022).

O controle biológico tem sido uma das áreas de aplicações de microrganismos simbióticos e uma importante área em ascensão, uma vez que, microrganismos antagonistas que atuam contra patógenos de plantas estão sendo amplamente exploradas para o manejo

biológico de doenças em plantas (SAMPATHKUMAR, 2022). Um exemplo disto são alguns fungos produtores de substâncias secundárias que podem atuar como inibidores de herbivoria (VENUGOPLAN & SRIVASTAVA, 2015), ou outros que sintetizam biomoléculas que podem auxiliar no controle de fitopatógenos (PARMAR et al., 2015).

De acordo com Ginnan (2020), microrganismos simbióticos podem apresentar potencial para minimizar o emprego de pesticidas químicos na atividade agrícola. Desafios persistentes associados ao uso de fungicidas convencionais incluem toxicidade para humanos e organismos não-alvo, poluição ambiental e desenvolvimento de resistências a fungicidas (JOSHUA, 2020).

Com o aumento da conscientização dos consumidores sobre os riscos de toxicidade dos químicos agrícolas, há uma demanda por produtos orgânicos. Nesse sentido, o controle biológico pode minimizar estes impactos causados, já que constitui uma prática chave na agricultura sustentável, não apenas para controlar as doenças causadas por fitopatógenos, mas também para reduzir os custos empregados na produção (CABANILLAS et al., 2017).

Ao enfrentar os desafios impostos por patógenos fúngicos, há uma necessidade de explorar o uso de novos endofíticos fúngicos, robustos e naturalmente abundantes que possam colonizar as plantas internamente sem causar danos e, dessa forma competir pelo nicho ecológico a fim de inibir o desenvolvimento do patógeno (JOSHUA, 2020). Sendo assim, desenvolveu-se a hipótese de que fungos endofíticos previamente isolados das raízes de *Butia purpurascens*, uma *Arecaceae* endêmica do Cerrado, pudessem atuar como controladores do desenvolvimento da Ramulose em plantas de Algodão derivadas de sementes infectadas com o patógeno.

Este trabalho reforça a necessidade na busca por estratégias conservacionistas em prol do controle de pragas, de forma que atuem anulando ou diminuindo o uso de pesticidas, utilizando recursos diretamente disponíveis na biodiversidade dos biomas nacionais. Entre estes biomas, o Cerrado tem se mostrado uma importante fonte de microrganismos de interesse biotecnológico capazes de estabelecerem relações simbióticas com as espécies agrícolas. O aproveitamento de cepas da microbiota do Cerrado para produção de biocontroladores atribui valor à biodiversidade do bioma, chamando atenção para a conservação do mesmo.

Este trabalho tem sua importância ressaltada pelo estímulo atual à busca de tecnologias que substituam ou minimizem a utilização de fertilizantes ou defensivos agrícolas. Insumos biológicos geralmente são mais baratos e impactam menos no meio ambiente, dessa forma a busca por esses produtos alimenta a corrida atual pela disponibilização dos mesmos no mercado (VITORINO et al., 2020).

Segundo a consultoria Mordor Intelligence, as vendas globais de biodefensivos em 2020 somaram 3,1 bilhões de dólares o que equivale a 6,4% do mercado total de biodefensivos agrícolas, e devem crescer 14% ao ano até 2024. Na América do Sul, as vendas desses produtos chegaram a 291 milhões de dólares em 2018, com projeção de crescimento de 16,4% por ano até 2023.

O sucesso dos inoculantes biológicos se deve não somente ao potencial de mercado, mas também à facilidade de cultivo e aplicação. Espécies como *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense* e *Trichoderma harzianum* têm dominado o mercado de bioinsumos acarretando em ótimos resultados na produção agrícola.

Na região Centro-Oeste do Brasil, a Ramulose é atualmente uma das doenças com maior relevância devido severidade de seus sintomas (MEDEIROS et al., 2020). Em decorrência disto, torna-se cada vez mais necessário a busca por alternativas biológicas sustentáveis que possam auxiliar no combate à Ramulose do Algodoeiro, ou mesmo na minimização dos sintomas.

Nesse contexto, muitos trabalhos têm atestado a capacidade de fungos endofíticos ou rizosféricos de inibir fitopatógenos em sistemas *in vitro*. Este trabalho foi o primeiro a testar fungos encontrados em *Butia purpurascens*, espécie nativa do cerrado, na redução dos sintomas provocados pelo fitopatógeno *Colletotrichum gossypii*. em plantas de algodão, cultivadas em sistema de casa de vegetação.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial de fungos endofíticos radiculares isolados de *Butia purpurascens* em amenizar os efeitos provocados pela Ramulose em plantas de algodão (*Gossypium hirsutum*) infectadas por *Colletotrichum gossypii*, abrindo perspectivas para o controle biológico desta praga.

4.2 Objetivos específicos

Avaliar a severidade de sintomas provocados pelo fitopatógeno *Colletotrichum gossypii* em plantas de algodão na presença de fungos antagonistas inibidores;

Avaliar a resposta fotossintética e fotoquímica de plantas algodão infectadas por *Colletotrichum gossypii*, na presença de fungos simbióticos antagonista inibidores;

Avaliar a resposta fisiológica da planta em termos de pigmentos fotossintéticos em plantas de algodão infectadas por *Colletotrichum gossypii*;

Obter *in vivo*, fungos com potencial antagonista ao fitopatógeno testado;

Testar a capacidade de inibição de fungos derivados de uma planta nativa do cerrado, através de análises de antibiose a *Colletotrichum gossypii*.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Obtenção dos isolados fúngicos e sementes contaminadas por *Colletotrichum gossypii*

Os testes foram conduzidos utilizando isolados de endofíticos radiculares de *Butia purpurascens*, previamente isolados a partir das raízes desta *Arecaceae* (Tabela 1) e atualmente pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Agrícola do Instituto Federal Goiano campus Rio Verde. Os isolados foram cultivados em meio Ágar Batata Dextrose (BDA) a fim de obter réplicas de cada cultura, para utilização no experimento *in vivo*.

Isolado	Tipo	Código do Isolado
<i>Gibberella moniliformis</i>	Fungo	BP10EF
<i>Hamigera insecticol</i>	Fungo	BP33EF
<i>Codinaeopsis</i> sp	Fungo	BP328EF
<i>Gibberella moniliformis</i>	Fungo	BP335EF
<i>Aspergillus</i> sp.	Fungo	BP340EF

Tabela 1. Isolados microbianos avaliados no controle da severidade da Ramulose em sistema de casa de vegetação, para identificação EF = Endofítico.

Sementes contaminadas por *Colletotrichum* foram obtidas por meio de testes de qualidade microbiológicas das sementes de algodão. Para isso, lotes de sementes da variedade TMG47-B2RF/2021, livres de tratamento com fungicidas ou inseticidas foram avaliados em papel germiteste. Para isso, as sementes foram dispostas sobre folhas deste papel e umedecidas com água destilada, em seguida, cobertas por papel filme e levadas para B.O.D. onde permaneceram durante 4 dias a 35°C. Dada a confirmação de ocorrência de *Colletotrichum*, o lote foi destinado para a etapa de experimento *in vivo*.



Figura 1. Sementes de algodão microbiolizadas com *Colletotrichum sp.* Em A e C, uma semente isolada revestida com esporos fúngicos; em B, sementes dispostas sobre o papel germitest para o teste de qualidade sendo possível identificar esporos dispersos sobre toda a área.

A partir de sementes contaminadas, culturas de *Colletotrichum* foram purificadas através do método de repicagem em meio Ágar Batata Dextrose (BDA) sólido, até obtenção da amostra pura de *Colletotrichum gossypii*. (Figura 2). Amostras puras foram encaminhadas ao Instituto Biológico de São Paulo para identificação molecular e confirmação da ocorrência de *Colletotrichum gossypii*.

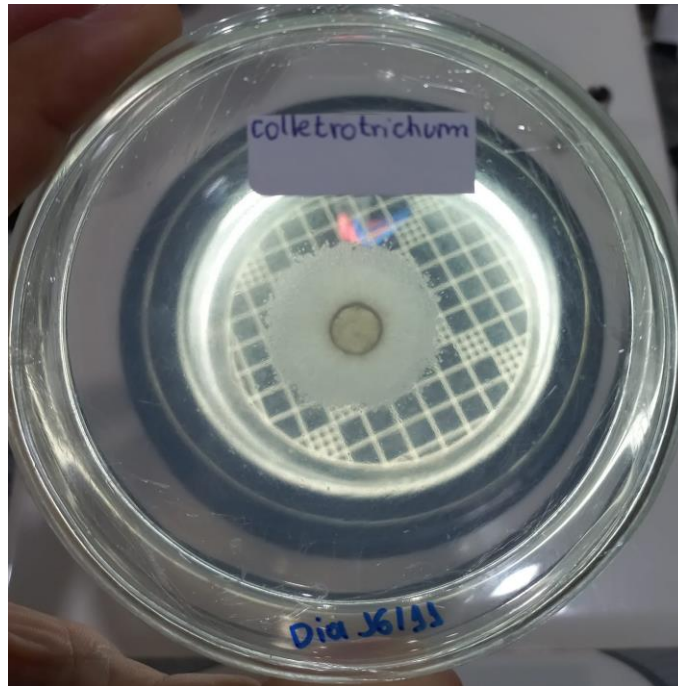


Figura 2. Cepa de *Colletotrichum gossypii*. após 3 repiques para purificação do mesmo.

5.2. Teste de antibiose *in vitro*

Os testes de antibiose foram conduzidos em sistema *in vitro* utilizando placas de petri contendo meio de cultura Ágar Batata Dextrose (BDA). Em uma mesma placa foi inoculado um disco micelial de 5 cm de diâmetro do fungo endofítico testado e um disco micelial do fungo fitopatogênico *Colletotrichum gossypii* em uma distância de aproximadamente 7 cm. As placas inoculadas foram levadas à incubadora a uma temperatura de 30°C.

As análises foram realizadas em um período de 48 horas, cujo diâmetro dos halos fúngicos foram medidos. O teste foi conduzido em triplicata para cada endofítico testado e os dados foram utilizados para estimar o para se determinar a porcentagem de inibição do crescimento do fungo fitopatogênico na presença do endofítico, calculada através do índice de inibição relativo (IR):

$$\text{IR (\%)} = \frac{\text{RC} - \text{RX}}{\text{RC}} \times 100, \text{ sendo:}$$

RC

RC = raio da colônia do fitopatógeno no tratamento controle

RX = raio da colônia do fitopatógeno pareada com o isolado endofítico.

5.3. Preparo e Plantio do Solo

O experimento foi conduzido em casa de vegetação pertencente ao Laboratório de Cultura de Tecidos do Instituto Federal Goiano Campus Rio Verde, entre os períodos junho a agosto de 2022, com temperatura média de 30,26°C e umidade relativa a 29,43%.

Antes do plantio, as sementes foram sanitizadas através do processo de assepsia descrito por Reis et al., (2022) para a remoção de micro-organismos epifíticos, garantindo que apenas o contaminante endógeno *Colletotrichum gossypii* permanecesse associado. As sementes foram deixadas em repouso por apenas 30 min. As sementes foram plantadas em vasos de 3kg com 70% de solo misturado a 30% de substrato (Substrato Bioplant Garden). Esta mistura foi previamente esterilizada em autoclave a 121°C durante 30 minutos.

Foram semeadas cinco sementes de algodão por vaso a uma profundidade de aproximadamente 3 cm, em seguida, discos miceliais dos fungos endofíticos selecionados foram colocados juntamente à semente como uma forma de inoculação direta (Figura 3) afim de proporcionar um desenvolvimento simultâneo.



Figura 3. Plantio das sementes em contato com fragmentos miceliais de fungos endofíticos de acordo com o tratamento.

No estágio V2 de desenvolvimento, foi realizado o desbaste, mantendo-se apenas plântulas com sintomas de ramulose nos vasos (apenas duas por vaso). As plantas foram irrigadas diariamente durante o período de 30 dias, de acordo com a necessidade, quando foram realizadas as avaliações.

5.4. Avaliações biométricas, fotossintéticas e fotoquímicas

As avaliações foram realizadas no estágio fenológico vegetativo, entre 35 e 45 dias após a inoculação e plantio do algodão, considerando o crescimento biométrico (Figura 4), síntese de pigmentos fotossintéticos, padrões fotossintéticos, fluorescência da clorofila *a* e biomassa fresca e seca. Para crescimento biométrico foram consideradas a altura da planta, diâmetro do colmo, número de folhas e biomassa fresca e seca da parte aérea.



Figura 4. Registro das avaliações biométricas em plantas de Algodão advindas de sementes contaminadas por *Colletotrichum gossypii*, 30 dias após o plantio em estágio fenológico 1 (Vegetativo).

As análises fisiológicas foram realizadas quando as plantas atingiram o estágio V5. Foram realizadas medições das trocas gasosas para registro da taxa de fotossíntese ($A \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), taxa respiratória ($E \text{ mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e a relação entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a). As análises foram realizadas por meio de um analisador de gás no infravermelho (IRGA), cujas leituras foram realizadas entre 9h e 11h com registro de unidade relativa do ar, temperatura e radiação da casa de vegetação.

A fluorescência transiente OJIP da clorofila *a* foi determinada com o uso de um fluorômetro portátil FluorPen FP100 (Photon Systems Instruments, Drasov, Czech Republic) (Figura 5). Para isso, a primeira folha completa de todas as unidades amostrais foi previamente adaptada ao escuro por 30 minutos para oxidação completa do sistema fotossintético de transporte de elétrons. Posteriormente foram submetidas a pulso de $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz azul, medindo-se a fluorescência mínima (F_0) em $50 \mu\text{s}$ quando todos os centros de reação PSII estão abertos e definido como o passo O, seguida pelo passo J (a 2 ms), o passo I (a 30 ms) e a fluorescência máxima (F_M) quando todos os centros de reação PSII estão fechados, conhecido como passo P. Estes valores foram utilizados para a estimativa de vários índices bioenergéticos do PSII, conforme Strasser et al. (2000).



Figura 5. Avaliação da florescência 30 dias após o plantio em plantas de algodão infectadas com *Colletotrichum gossypii* var.

Foram estimados os valores relativos ao fluxo específico de absorção luminosa por centro de reação (ABS/RC); o fluxo de energia capturado por centro de reação em $t = 0$ (TRo/RC); o fluxo de transporte de elétrons por centro de reação (ETo/RC); o fluxo específico de dissipação da energia ao nível das clorofilas do complexo antena (DIO/RC); o índice de desempenho fotossintético (Pi_Abs) que incorpora os processos da cascata de energia dos primeiros eventos de absorção até a redução de PQ; o rendimento quântico máximo da fotoquímica primária (PHI_Po); probabilidade de um éxciton mover um elétron pela cadeia transportadora de elétrons após a Quinona (PSI_O) e o rendimento quântico do transporte de elétrons (PHI_Eo), após adaptação das folhas ao escuro (30 min).

5.5. Delineamento experimental e análises estatísticas

O experimento foi delineado em blocos casualizados, com os testes conduzidos em quintuplicadas, considerando uma repetição, duas plantas por vaso. Foi avaliada a inoculação de 05 fungos endofíticos e um tratamento controle, consistindo de plantas não submetidas à ação de endofíticos. Os dados obtidos para os 06 tratamentos foram submetidos a análise de variância e teste de média utilizando o pacote estatístico R.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Inibição *in vitro*

A avaliação foi realizada 48h após a incubação, quando foi possível notar o desenvolvimento exponencial dos fungos endofíticos que conseqüentemente inibiram o crescimento do fitopatógeno (Figura 6).

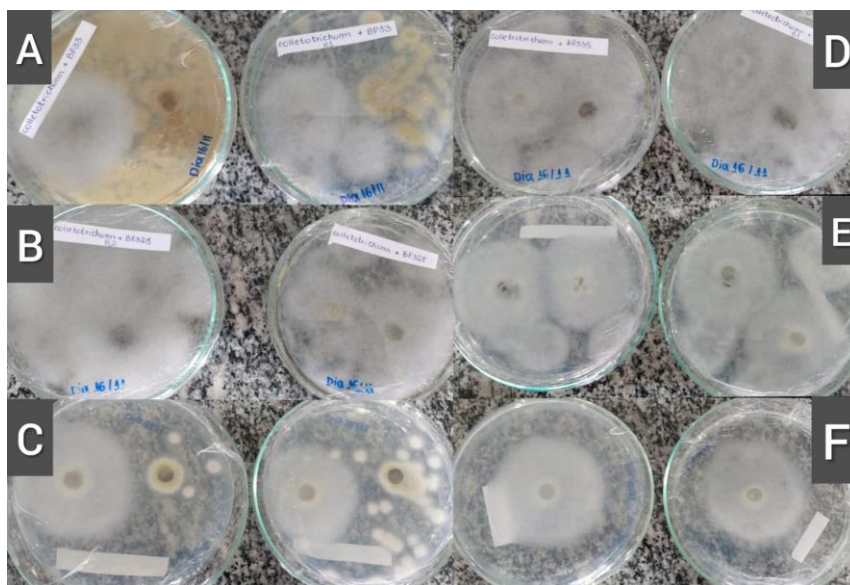


Figura 6. Avaliação com 48h de crescimento. Em A, *Colletotrichum sp.* e *Hamigera insecticol* (BP33EF) sendo possível observar a repressão do patógeno *Colletotrichum* por parte do endofítico; Em B, *Colletotrichum sp.* e *Codinaeopsis sp.* (BP328EF), houve repressão do patógeno com o domínio da placa por parte do endofítico BP328EF; Em C, *Colletotrichum sp.* e *Gibberella sp.* (BP340EF) não houve inibição do crescimento visto que ambos os fungos cresceram em harmonia; Em D, *Colletotrichum sp.* e *Gibberella moniliformis* (BP335EF) com domínio da placa por parte do fungo endofítico BP335EF; Em E, *Colletotrichum sp.* e *Gibberella moniliformis* (BP10EF) nota-se predominância do fungo endofítico mas o patógeno não foi reprimido; Em F, Espécimes controle de *Colletotrichum sp.* com aumento do halo fúngico.

O índice de inibição relativa (IR) revelou que todos os fungos avaliados demonstraram potencial para inibição de *Colletotrichum gossypii*, se sobressaindo ao tratamento controle (Figura 7). Isto ocorre, pois, microrganismos potencialmente benéficos ou patogênicos são altamente competitivos na colonização dos nichos e na obtenção de nutrientes (HAAS & KEEL, 2003). Contudo, foi verificado que os isolados BP328EF (*Codinaeopsis sp.*) e BP335 (*Gibberella moniliformis*), foram mais efetivos em inibir o fitopatógeno, mostrando os maiores índices médios de inibição, respectivamente, 81,11 e 79,81%.

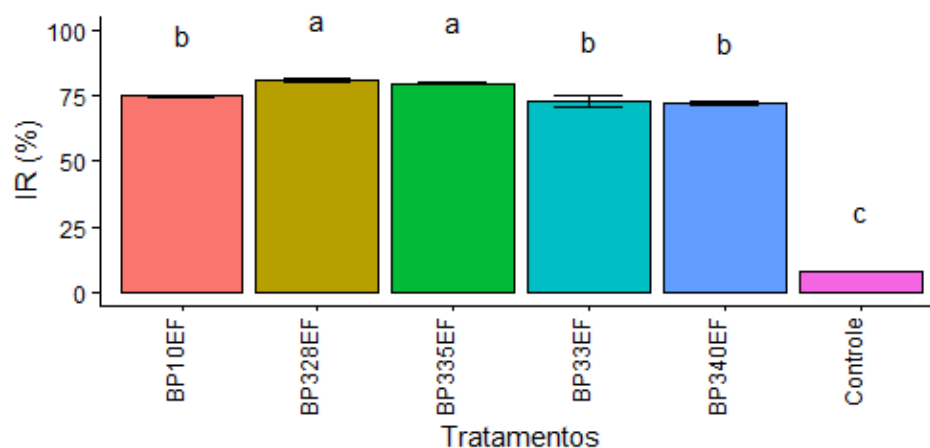


Figura 7. Índice de inibição relativa observada entre fungos endofíticos e o fitopatógeno *Colletotrichum gossypii*. BP10EF = *Gibberella moniliformis*, BP328EF = *Codinaeopsis* sp., BP33EF = *Hamigera insecticola*, BP335EF = *Gibberella moniliformis*, BP340EF = *Aspergillus* sp., Controle = tratamento sem fungo.

6.2. Inibição In Vivo

Os primeiros sintomas da doença surgiram ainda nos estágios iniciais de desenvolvimento da planta (V0 - Cotilédone) 14 dias após o plantio (Figura. 8A), onde foi possível observar a presença de pequenas lesões necróticas escuras em formato circular como descrito anteriormente por Talhinas e Baroncelli (2021). Com 21 dias após o plantio, foi possível observar que o patógeno *Colletotrichum gossypii* afetou o crescimento foliar causando desigualdade no desenvolvimento e enrugamento do limbo foliar. Com o surgimento das primeiras lesões foliares notou-se a paralisação do crescimento do ramo e a emergência de novas gemas laterais (Figura. 8B). Segundo Araujo (2006), os novos ramos tendem a formar um aglomerado característico por excesso de nós e entrenós, trazendo um aspecto envassourado para a planta (Figura. 8C).

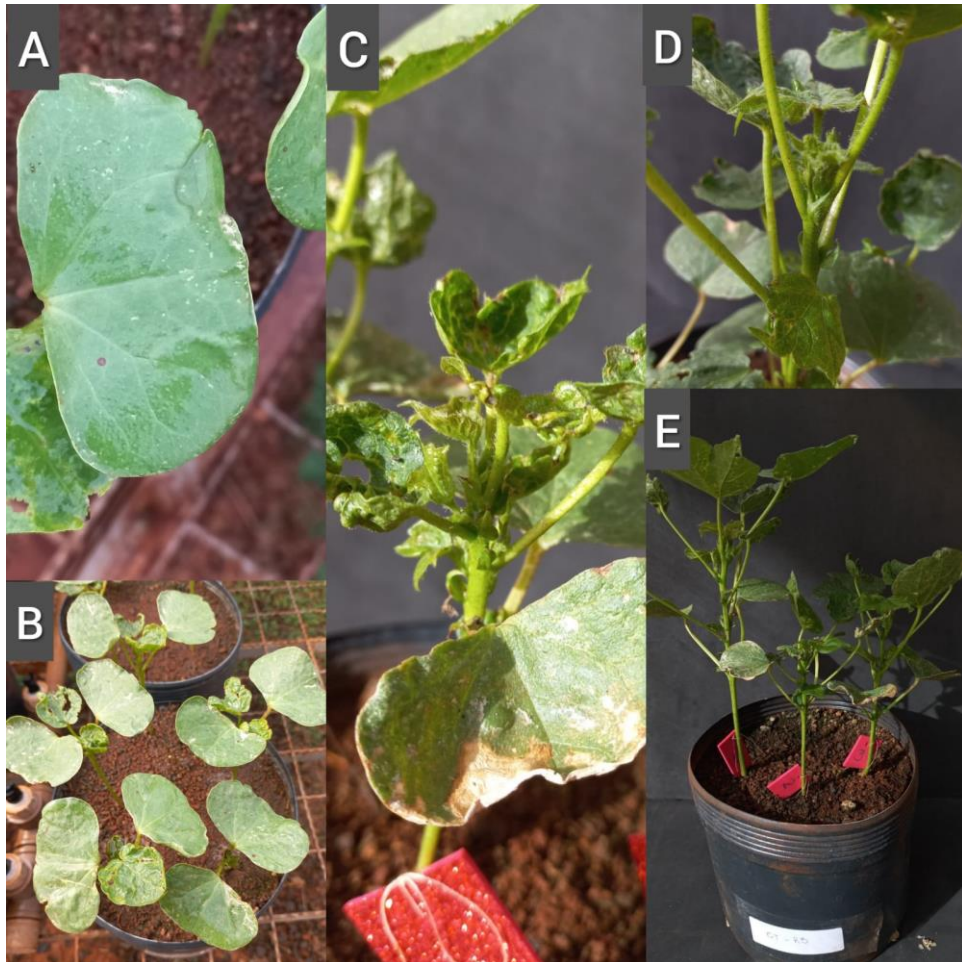


Figura 8. Em A é possível identificar as primeiras lesões foliares necróticas, ainda nos cotilédones em estágio V0; Em B, o enrugamento foliar das primeiras folhas verdadeiras afetou o crescimento e desenvolvimento da planta; Em C, a presença de aglomerados de nós e entrenós inibindo o desenvolvimento foliar; Em D, é visível o excesso de ramos e gemas laterais que se desenvolvem interferindo no desenvolvimento vertical da planta; Em E, demonstra a altura da planta em estágio vegetativo, muito afetada pelo fitopatógeno *Colletotrichum gossypii*.

Em relação à altura das plantas (Figura 9A), de forma geral, a inoculação dos fungos endofíticos não afetou diferencialmente a altura, o diâmetro do colmo ou o número de folhas das plantas com ramulose. Segundo Nogueira (2013), isso ocorre, pois, plantas infectadas com *Colletotrichum gossypii*, enfrentam distúrbios de desenvolvimento, tornando a planta pobre em espessura e com excesso de ramos laterais.

Contudo, quando o crescimento vegetal foi mensurado através da biomassa fresca e seca, plantas inoculadas com BP33EF (*Hamigera insecticola*) apresentaram os maiores valores médios de biomassa fresca e seca (Respectivamente 51.5 e 12.5) (Figura 9D/9E).

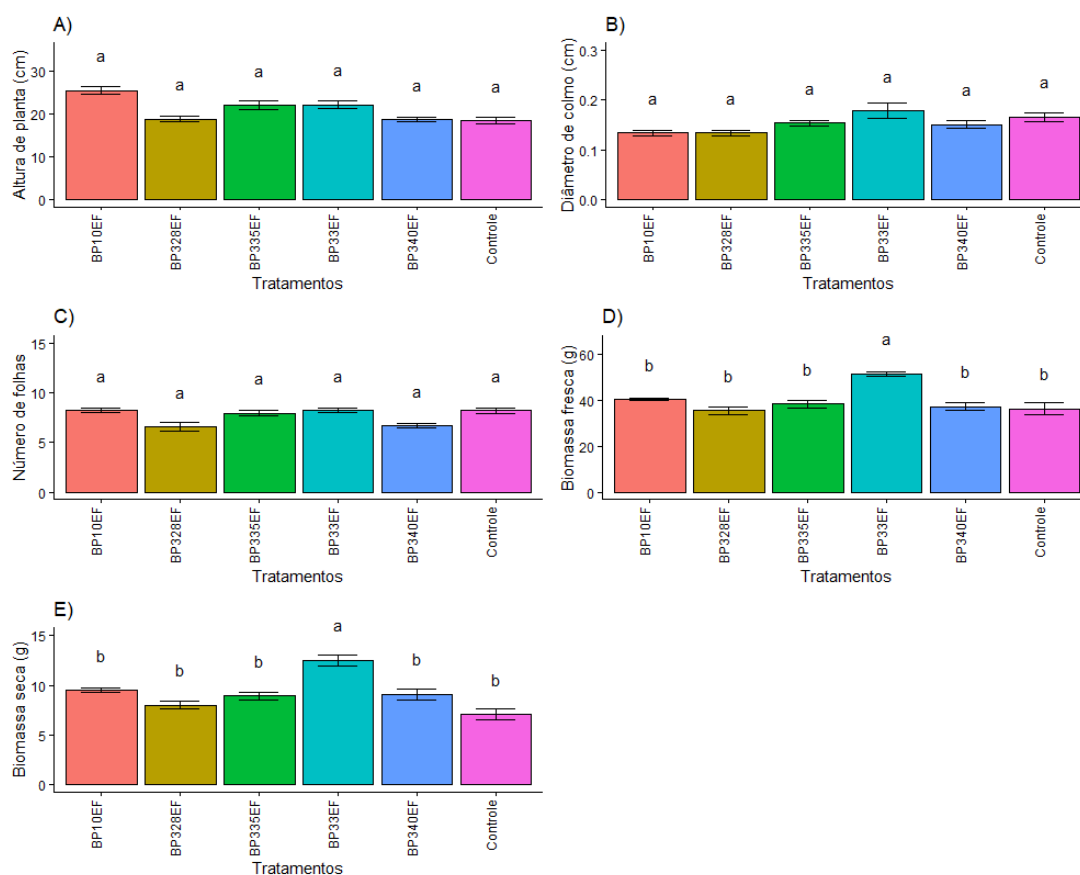


Figura 9. Crescimento biométrico de plantas de *Gossypium hirsutum* sob o ataque de *Colletotrichum gossypii* e inoculadas com fungos endofíticos. Em A, altura da planta (cm); Em B, diâmetro do colmo (cm); Em C, número de folhas; Em D, biomassa fresca da parte aérea (g); Em E, a biomassa seca da parte aérea (g). BP10EF = *Gibberella moniliformis*, BP328EF = *Codinaeopsis* sp., BP33EF = *Hamigera insecticola*, BP335EF = *Gibberella moniliformis*, BP340EF = *Aspergillus* sp., Controle = tratamento sem fungo.

In vivo, as plantas controle (*Colletotrichum* sp.) exibiram sintomas acentuados da doença da Ramulose e seu desenvolvimento foi retardado com o aumento das gemas laterais afetando sobretudo o acúmulo de biomassa. No entanto, plantas tratadas com *Hamigera insecticola* (BP33EF) obtiveram maiores valores médios de biomassa aérea fresca e seca.

Apesar das análises de antibiose *in vitro* ter demonstrado ótimo rendimento de inibição do fitopatógeno para todos os fungos, os testes de campo destacaram apenas BP33EF como potencial antagonista à doença da ramulose causada por *Colletotrichum gossypii*. Isso ocorre pois, em sistemas controlados um microrganismo se desenvolve em condições favoráveis a ele com temperatura e nutrientes constantes (SENA, 2021), cenário que não se repete no sistema *in vivo*, visto que, é um ambiente não controlado e que sofre diversas interferências.

6.3. Parâmetros fotossintéticos

6.3.1. Fluorescência da clorofila *a*

No geral, foi possível observar melhor desempenho fotoquímico nas plantas inoculadas com microrganismos. Em relação aos parâmetros cinéticos da fluorescência da clorofila *a*, o rendimento quântico máximo de fotossíntese (Φ_{po}) foi maior para as plantas inoculadas com os microrganismos BP10EF, BP328EF, BP33EF e BP340EF (respectivamente 0.810, 0.812, 0.802, 0.810) (Figura 10^a); assim como o índice de desempenho fotossintético (Φ_{Abs}) que foi superior em plantas inoculadas com os microrganismos BP10EF, BP328EF, BP33EF e BP340EF (2.704, 2.832, 2.522 e 2.826) (Figura 10D).

Plantas inoculadas com BP335EF (*Gibberella moniliformis*) não se mostraram eficazes em reduzir o estresse fotoquímico dado pela severidade da doença, visto que, assim como as plantas controle, o índice de desempenho fotossintético (Φ_{Abs}) e o rendimento quântico máximo de fotossíntese (Φ_{po}) foram relativamente menores nas plantas inoculadas com este endofítico (Respectivamente 2.201, 2.178 e 0.768 e 0.784) (Figura 10^a/10D).

A probabilidade de um éxciton mover um elétron pela cadeia transportadora de elétrons após a Quinona (Qa) (Ψ_o) e o rendimento quântico do transporte de elétrons (Φ_{Eo}) não foram afetados por nenhum dos tratamentos com endofíticos, não sendo verificada diferença significativa (Figura 10B/10C).

Como esperado, os fluxos de energia específica dos centros reativos também foram afetados pela inoculação microbiana. O fluxo de absorção pelo centro reativo (Abs_{RC}) apresentou menores valores médios em plantas microbiolizadas com BP10EF, BP328EF, BP335EF e BP340EF, os maiores valores foram observados em plantas não inoculadas com microrganismos e no tratamento BP33EF = *Hamigera insecticola* como no tratamento controle (Figura 10E). Os menores valores de fluxo específico da dissipação de energia (Dio_{RC}) foram obtidos em plantas submetidas aos tratamentos BP10EF, BP328EF, BP335EF e BP340EF (Respectivamente, 0.444, 0.420, 0.471, 0.445) (Figura 10H).

Por se tratar de dois indicadores de estresse fotoquímico, os valores de Abs_{RC} e Dio_{RC} , quanto maiores indicam que a planta está sob estresse. Nesse sentido, as plantas do tratamento BP33EF = *Hamigera insecticola* que apresentaram os maiores valores médios (Figura 10E/10H) parecem estar mais estressadas, contudo, estas plantas tiveram um bom rendimento fotossintético e acumularam mais biomassa, indicando que este pode ser um importante mecanismo utilizado por este endofítico para induzir a resistência em plantas de algodão afetadas pela ramulose.

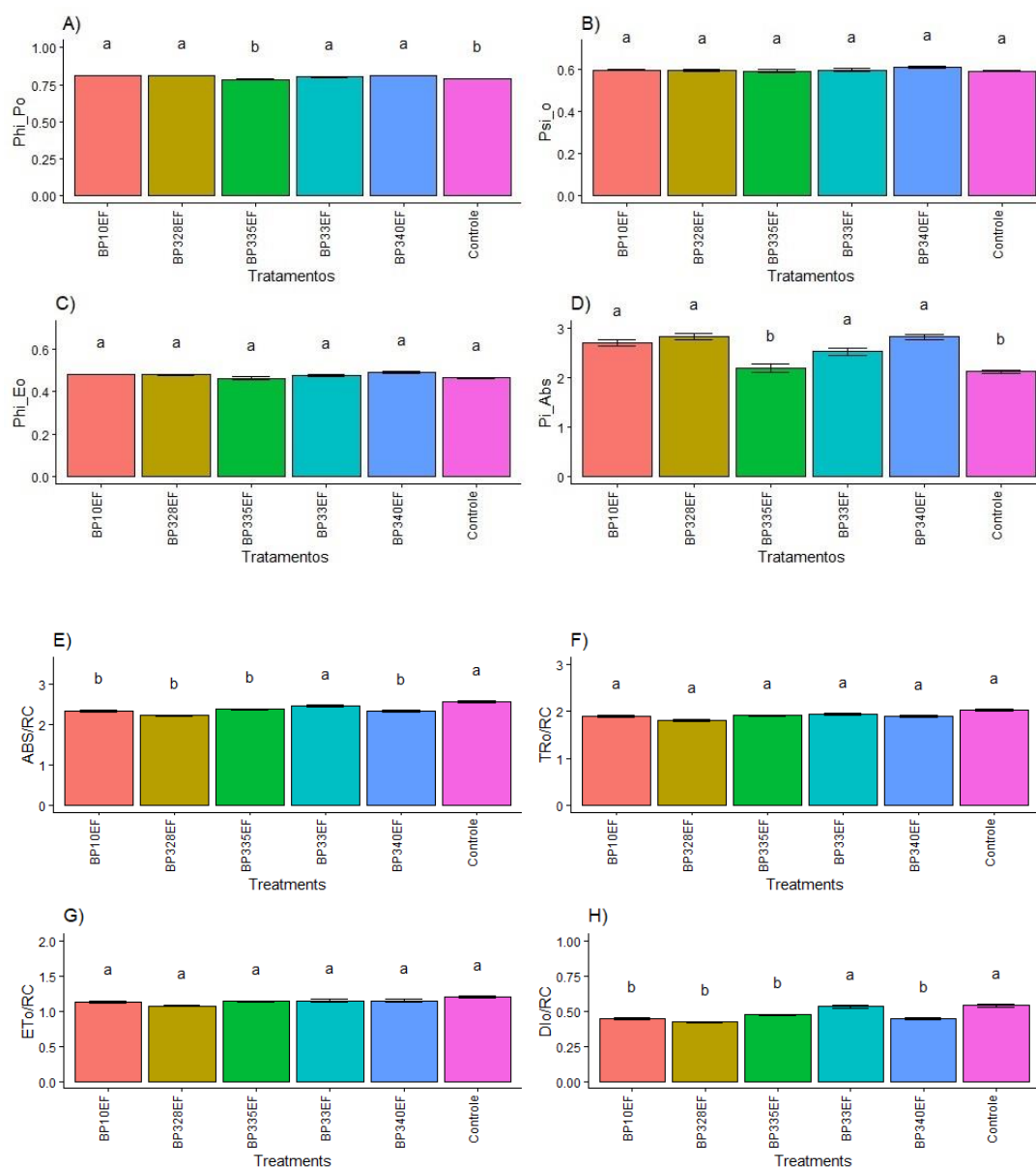


Figura 10. Fotoquímica primária por fluorescência da clorofila a em plantas de *Gossypium hirsutum* sob o ataque de *Colletotrichum gossypii* e inoculadas com fungos endofíticos. Rendimento quântico máximo de fotoquímica primária (PHI_Po) (A), probabilidade de um éxciton mover um elétron pela cadeia transportadora de elétrons após a Quinona (Qa) (PSI_O) (B), rendimento quântico do transporte de elétrons (PHI_Eo) (C) e índice de desempenho fotossintético (Pi_Abs) (D), Fluxo de absorção por RC (ABS/RC) (E), fluxo de energia capturado por RC em t = 0 (TRo/RC) (F), fluxo de transporte de elétrons por RC em t = 0 (ETo/RC) (G) e fluxo específico de dissipação da energia (DIo/RC) (H) em plantas de algodão (*Gossypium* L.). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 0,05% de probabilidade. BP10EF = *Gibberella moniliformis*, BP328EF = *Codinaeopsis* sp., BP33EF = *Hamigera insecticola*, BP335EF = *Gibberella moniliformis*, BP340EF = *Aspergillus* sp., Controle = tratamento sem fungo.

Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas para as médias de TRo/RC e ETo/RC (Figura 10F/10G).

6.3.2. Trocas gasosas

Apesar de não verificarmos diferenças significativas, observamos uma tendência geral de a inoculação microbiana afetar positivamente a taxa fotossintética (A), com as médias variando entre o máximo de 18.963 em plantas do tratamento BP328EF (*Codinaeopsis sp.*) e o mínimo de 13.782 em plantas do controle (Figura 11A).

Em relação à taxa de transpiração (E), também foi verificada uma tendência de efeito, com o maior valor obtido em plantas inoculadas com BP328EF (*Codinaeopsis sp.*) e o menor valor registrado em plantas do controle (Figura 11E). A taxa de transpiração se relaciona com a condutância estomática (Gsw) da planta, nesse sentido, as plantas tratadas com BP328EF (*Codinaeopsis sp.*) demonstraram tendência estatística para as maiores taxas de condutância estomática, sendo a menor, também verificada no tratamento controle (Figura 11D).

Isto sugere que, por estar em situação de estresse fisiológico, as plantas investiram em mecanismos de defesa ao fechar os estômatos impedindo assim a perda de água para o ambiente (COSTA E MARENCO, 2007). No entanto, essa ferramenta de defesa inibe o funcionamento integral do sistema vegetal causando irregularidades, como é o caso do aumento da temperatura interna e menor taxa fotossintética (COSTA E MARENCO, 2007).

Os tratamentos não afetaram a concentração interna de carbono (Ci) e a concentração externa de carbono (Ca), não sendo observada uma variação significativa (Figura 11B/11C).

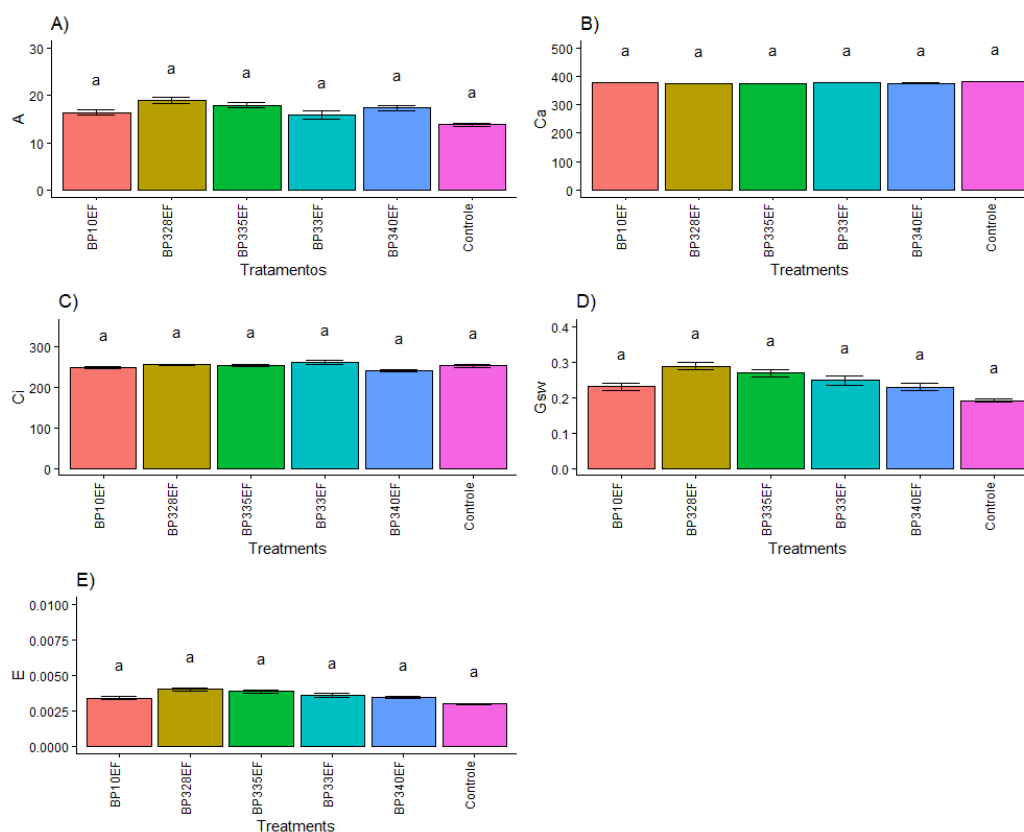


Figura 11. Parâmetros de trocas gasosas em plantas de *Gossypium hirsutum* sob o ataque de *Colletotrichum gossypii* e inoculadas com fungos endofíticos. Em A, Taxa fotossintética (A); Em B, a concentração externa de carbono (Ca); Em C, a concentração interna de carbono (Ci); Em D, a condutância estomática (Gsw); Em E, a taxa de transpiração (E).

7. CONCLUSÃO

O endofítico *Hamigera insecticola* (BP33EF) demonstrou melhor desempenho para controle da severidade fisiológica dos sintomas da ramulose provocado por *Colletotrichum gossypii* em plantas de algodão, induzindo o maior acúmulo de biomassa fresca e seca, desempenho fotoquímico acima do verificado nas plantas controle e maiores índices de estresse fotoquímico. Os valores mais altos de ABS/RC e DIo/RC observados nas plantas inoculadas com BP33EF, indicam que a manutenção de altos valores de estresse pode ser um mecanismo utilizado por esta espécie para induzir respostas de resistência sistêmica à ramulose em plantas de algodão, o que incorreu em maior crescimento. As plantas inoculadas com o endofítico BP328EF = *Codinaeopsis* sp., no entanto, tenderam a apresentar maiores medias para taxa fotossintética (A), condutância estomática (gsw) e transpiração (E), indicando uma melhora relativa na capacidade fotossintética das plantas em relação às plantas controle. Os resultados obtidos neste trabalho estimularão novos estudos acerca de endofíticos endêmicos do Cerrado, abrindo perspectivas para aplicações futuras no controle total da ramulose do algodão, bem como de outras doenças fúngicas, tornando estes, uma alternativa sustentável para a produção agrícola.

8. REFERÊNCIAS

- AHMAD, S. et al. **Applications of endophytic *Actinomycetes* and their role in protection.** Imperial Journal of Interdisciplinary Research, India, v. 2, n. 7, p. 854-858, 2016.
- ARAÚJO, D.V. et al. **Relação entre níveis de inóculo de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* nas sementes e o progresso da ramulose do algodoeiro.** Fitopatologia Brasileira 31:147-151. 2006.
- CABANILLAS, C. et al. **Sustainable management strategies focused on native bio-inputs in *Amaranthus cruentus* L. in agroecological farms in transition.** Journal of Cleaner Production, v. 142, n. 1, p. 343-350, 2017.
- CONSTANTIN, M.E.; BABETTE, V.V.; FRANK L.W. **Diminished pathogen and enhanced endophyte colonization upon inoculation of endophytic and pathogenic *Fusarium* Strains.** Microorganisms, v. 8, p.544, 2020.
- COSTA, G.F.; MARENCO, R.A. **Fotossíntese, condutância estomática e potencial hídrico foliar em árvores jovens de andiroba (*Carapa guianensis*).** Acta amazônica, v. 37, p. 229-234, 2007.
- DANTAS, J. **Produção de Algodão.** Caderno Setorial ETENE, [s. l.], n. 56, 2018.
- DE SILVA, Dilani D. et al. **Identification, prevalence and pathogenicity of *Colletotrichum* species causing anthracnose of *Capsicum annuum* in Asia.** IMA fungus, v. 10, n. 1, p. 1-32, 2019.
- GINNAN, N. et al. **Disease Induced Microbial shifts in citrus indicate microbiome derived responses to Huanglongbing across the disease severity spectrum.** Phytobiomes Journal, v. 4, n. 4, p. 375-387, 2020.
- HAAS, D; KEEL, C. **Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease.** Annual review of phytopathology, v. 41, n. 1, p. 117-153, 2003.
- JOSHUA, J., MMBAGA, M.T. **Potential biological control agents for soilborne fungal pathogens in Tennessee snap bean farms.** HortScience, v. 755, n. 7, p. 988-994, 2020.
- LIMA, E.F. et al. **Transporte e transmissibilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* através da semente do algodoeiro.** Fitopatologia Brasileira 10:105-115. 1985.

MALERBO, D.T.S.; COUTO, R.H.N. **Abelhas no algodão**. Revista Brasileira de Apicultura, n.38, p.24-26,1990.

MEDEIROS E.P. et al. **Método para identificação dos agentes causais da ramulose e antracnose em algodoeiro pela tecnologia de imagens químicas**. Embrapa algodão, 2020.

MORENO-MORAN, M.; BURBANO-FIGUEROA, O. **Field resistance of advanced breeding lines of upland cotton to ramulosis caused by *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides***. Crop Protection, v. 122, p. 49-56, 2019.

NOGUEIRA, A.M. et al. **Aspectos bioquímicos da resistência do algodoeiro à ramulose potencializada pelo silício**. Fitossanidade , Bragantina, Campinas, v. 72, ed. 3, p. p.292-303, 12 ago. 2013.

OLIVEIRA, M.D. et al. **Caracterização morfo-cultural e patogênica de *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* sob diferentes temperaturas**. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v. 26, n. 6, p. 420-424, 2022.

PARMAR, H.J. et al. **Production of lyticenzymes by Trichoderma strains during in vitro antagonism with *Sclerotium rolfsii*, the causal agent of stem rot of groundnut African**. Journal of Microbiology Research. v. 9, n. 6, p. 365-372, 2015.

REIS, M.N.O.; VITORINO, L.C.; LOURENÇO, L.L.; BESSA, L.A. **Microbial Inoculation Improves Growth, Nutritional and Physiological Aspects of Glycine max (L.) Merr**. Microorganisms 2022, 10, 1386. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071386>.

SAMPATHKUMAR, A. et al. **Bacillus species: The multifaceted bioagents for the management of cotton bacterial blight caused by *Xanthomonas citri* pv. *malvacearum***. Biological Control, 10 nov. 2022.

SCHARNAGL, K. **The scale of symbiosis**. Symbiosis, v.78, p. 7–17, 2019.

SENA, E.S.G. et al. **Promoção de crescimento de plântulas de soja, in vitro, por microrganismos**. 2021.

STRASSER, R.J.; SRIVASTAVA, A.; TSIMILLI-MICHAEL, M. **The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation**, p. 445-483, 2000.

TALHINHAS, P.; BARONCELLI, R. **Espécies e complexos de *Colletotrichum*: distribuição geográfica, gama de hospedeiros e estado de conservação**. Mushroom research foundation, p. 109-198, 2020.

TANAKA, M.A. **Patogenicidade e transmissão por semente do agente químico causal da ramulose em algodoeiro.** 1990. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de São Paulo, 1990.

VENUGOPALAN, A.; SRIVASTAVA, S. **Enhanced camptothecin production by ethanol addition in the suspension culture of the endophyte, *Fusarium solani*.** Bioresource Technology, v. 188, p. 251-257, 2015.

VITORINO, L. et al. **Soil parameters affect the functional diversity of the symbiotic microbiota of *Hymenaeacourbaril* L., a Neotropical fruit tree.** Rhizosphere, v. 16, 2020.